



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA
LABORATORIO *DRUG DELIVERY*

**DISEÑO, DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN CAMPO
MAGNÉTICO QUE PERMITE GENERAR RESPUESTAS EN
MICROGELES QUE CONTIENEN NANOPARTÍCULAS DE
HIERRO**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

GONZALO IGNACIO ÁLVAREZ ACEVEDO

PATROCINANTE

Prof. Dr. Felipe Oyarzún Ampuero

Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile

DIRECTOR DE MEMORIA

Prof. Dr. Marcos Flores Carrasco

Departamento de Física

Facultad de Ciencias Físicas y
Matemáticas, Universidad de
Chile

Santiago de Chile
2017

Dedicatoria

“Llegué, pues, a la Universidad y allí fue abrir los ojos y los oídos. Todo fue para mí maravilla: la libertad, las cogitaciones, los diferentes pensares, la suelta lengua de los veteranos, su esclarecido ingenio, su alegría, su bienandanza. Todo deslumbró mi entendimiento tras de mi clerical encierro y recobré la suelta disposición en que corrió mi luminosa infancia. Por eso, al tiempo que yo entré en la Universidad, entróseme ella a mí en las entretelas del alma y, a fe mía, que de ellas no se ha de salir sino cuando la misma ánima del cuerpo se me salga y vaya de este valle hondo, oscuro, a la altitud de la gloria, si la alcanzo...”

El libro del buen Tunar, Emilio de la Cruz y Aguilar, 1967

Agradecimientos.

Agradezco a mi profesor patrocinante, el Dr. Oyarzún por la confianza y el apoyo para iniciar con este proyecto de investigación y al Dr. Flores por el buen recibimiento en la Facultad de Ingeniería. Paso a agradecer también al Profesor Boris Chornik por la excelente disposición a trabajar en conjunto para desarrollar el prototipo.

A mis compañeros del Laboratorio *Drug Delivery*, al Profesor Javier O. Morales y a Víc-Miranda, de quienes aprendí mucho e hicieron muy entretenida y llevadera mi estadía en el laboratorio.

Gracias por la colaboración y el apoyo recibido en el Laboratorio de Superficies y al Taller de la FCFM, al Laboratorio de Nanobiotecnología del Prof. M.J. Kogan y a sus integrantes. También, al laboratorio de Operaciones Unitarias.

A la colaboración fundamental de la Dra. María Del Puerto Morales del Instituto de Ciencias de los Materiales de Madrid (ICMM), que nos proporcionó las nanopartículas usadas en la presente investigación.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros durante estos años en la Universidad, con quienes compartí gratos momentos. También a mis hermanos Tunos, compañeros de andanzas y travesías.

Y, por último, pero más importante, gracias a mi familia en especial a mis padres, mi hermano y mi abuela. Quienes me apoyaron sin dudar durante todos estos años.

Se agradece los Proyecto FONDECYT 11121481, 1161450, 1140759 y FONDAP 1513001.

Tabla de contenido.

Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Tabla de contenidos	4
Resumen	6
Summary	7
1. Introducción	8
2. Fundamentación y formulación del problema.....	15
2.1 Hipótesis.....	17
2.3 Objetivos específicos	17
3. Materiales y métodos.....	18
3.1. Materiales	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Diseñar y desarrollar un generador de campo magnético alterno	19
3.2.2 Aplicar el campo magnético alterno (desde el generador desarrollado) a distintas formulaciones de NPs de hierro y seleccionar las que presenten mayor potencial calorífico.....	19
3.2.2.1 Caracterizar las NPs de óxido de hierro.	21
3.2.3 Recubrir y caracterizar NPs de óxido de hierro seleccionadas, con polímeros de carga complementaria.....	21
3.2.4. Encapsular NPs de óxido de hierro, junto a un analito de interés, en los microgeles de alginato de calcio.	23
3.2.4.1 Seleccionar y vehiculizar un analito de interés para que sea incluido en el microgel.	23
3.2.4.2 Elaborar microgeles de alginato de calcio coencapsulando nanoemulsiones cargadas con el analito de interés y NPs de óxido de hierro.	24
3.2.4.2.1 Elaboración automatizada de microgeles.....	25
3.2.4.2.2 Elaboración manual de microgeles	25
3.2.5 Exponer las microformulaciones a diversos estímulos magnéticos, y evaluar la respuesta en términos de generación de calor, liberación de nanosistemas y movilidad.....	26
3.2.6 Exponer las microformulaciones a estímulos térmicos y mecánicos y evaluar la estabilidad del sistema.	27

4. Resultados y Discusión.....	29
4.1 Diseñar y desarrollar un generador de campo magnético alterno	29
4.2 Aplicar el campo magnético alterno (desde el generador desarrollado) a distintas formulaciones de NPs de óxido de hierro y seleccionar las NPs que presenten mayor potencial calorífico.	31
4.2.1 Caracterizar NPs de óxido de hierro.	33
4.3 Recubrir y caracterizar NPs de óxido de hierro con polímeros de carga complementaria.....	36
4.4 Encapsular nanopartículas de óxido de hierro junto a un analito de interés en microgeles de alginato	38
4.4.1 Selección y vehiculización de un analito de interés para su inclusión en microgeles.....	39
4.4.2 Elaborar microgeles de alginato de calcio coencapsulando nanoemulsiones cargadas con analito de interés y NPs de óxido de hierro.	40
4.4.2.1 Elaboración automatizada de microgeles.....	41
4.4.2.2 Elaboración de microgeles	44
4.5 Exponer las microformulaciones a diversos estímulos magnéticos, y evaluar la respuesta en términos de generación de calor, liberación de nanosistemas y movilidad.....	47
4.5.1 Exponer las microformulaciones a un campo magnético oscilante y evaluar la generación de calor.....	48
4.5.2 Exponer las microformulaciones a un campo magnético oscilante y evaluar la liberación de nanosistemas	49
4.5.3 Exponer las microformulaciones a un campo magnético fijo y evaluar su movilidad	51
4.6 Exponer las microformulaciones a estímulos térmicos y mecánicos, y evaluar la estabilidad de la formulación	52
5. Conclusiones y discusión final	54
6. Referencias	56

Resumen

El uso de formulaciones como los microgeles es una alternativa para vehicular moléculas complejas, por ejemplo, fármacos sensibles al medio externo, tóxicas o de baja biodisponibilidad.

En teoría, es posible controlar la liberación de fármacos desde microgeles coencapsulando partículas superparamagnéticas que, al liberar calor después de ser sometidas a radiación electromagnética, alteran la estructura polimérica del microgel y promueven la liberación de otros analitos coencapsulados.

Para conocer el comportamiento de microgeles ante una respuesta térmica generada a partir de un estímulo magnético proponemos desarrollar un sistema de liberación de analitos basado en microgeles de alginato de calcio que incluyen analitos lipofílicos vehiculizados y nanopartículas de hierro (que liberan calor al ser expuestas a campos magnéticos alternos). Para ello, se desarrolló un equipo para aplicar campos magnéticos oscilantes sobre las formulaciones.

Adicionalmente, estas formulaciones se caracterizaron en términos de estabilidad (térmica y mecánica) y de movilización frente a un estímulo magnético.

Summary

DESIGN, DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A MAGNETIC FIELD THAT ALLOWS TO GENERATE RESPONSES IN MICROGELS CONTAINING IRON NANOPARTICULES

The use of formulations such as microgels is an alternative to vehiculize complex molecules, for example, drugs sensitive to the external environment, toxic drugs or with low bioavailability.

In theory, it is possible to control the release of drugs from microgels by coencapsulating superparamagnetic particles which, at releasing heat after being subjected to electromagnetic radiation, may modify the polymeric structure of the microgel and promoting the release of other coencapsulated analytes.

To know the behavior of microgels to a thermal response generated from a magnetic stimulus, we propose to develop a drug/analyte release formulation based on calcium alginate microgels that include lipophilic analytes and iron nanoparticles that release heat when been exposed to magnetic fields. For that, an equipment to apply oscillating magnetic fields to the formulations, was developed. Additionally, those formulations where characterized in terms of thermal and mechanical stability.

1. Introducción

A pesar de los grandes avances en medicina y farmacología, sigue siendo un desafío desarrollar nuevas terapias que presenten menos riesgos asociados en comparación con las terapias actuales. Nuevas tecnologías se están encargando del desarrollo e investigación acerca de las propiedades de materiales a escala nano y micrométrica, encontrando un atractivo polo de crecimiento en disciplinas científicas y del área de la salud. Así, el desarrollo de materiales a baja escala de tamaño se proyecta para mejorar los perfiles de seguridad, toxicidad y eficacia de medicamentos en beneficio del paciente.

Entre las aplicaciones de la nanotecnología que generan mayores expectativas destacamos la nanomedicina. Ésta se define como “la aplicación de los conocimientos de nanotecnología en las ciencias y procedimientos médicos y terapéuticos”. Entre las áreas de mayor proyección, destacan la entrega controlada de fármacos o *drug delivery* y el diagnóstico precoz de patologías¹. Dentro de los nanomateriales con aplicaciones terapéuticas podemos nombrar las nanopartículas (NPs) que son un tipo de nanoestructuras con formas y tamaños controlados. Existen diversos tipos de nanopartículas que se han desarrollado con fines terapéuticos y de diagnóstico. Entre estas podemos nombrar: NPs de oro, NPs de hierro, nanotubos de carbón, NPs de plata, NPs poliméricas, nanocápsulas y nanoemulsiones, entre otras.

Nanopartículas de óxido de hierro: generalidades

La amplia difusión de las NPs de óxido de hierro en terapéutica se debe a su adecuada biocompatibilidad y a su fácil síntesis que está descrita desde

comienzos de los 80's por co-precipitación de sales férricas². Por este método se pueden alcanzar tamaños de entre los 5 y 20 nm, con un buen índice de polidispersidad. Por otro lado, también se puede modificar la superficie de éstas por funcionalización con grupos tioles, aminos, etc. Adicionalmente, estas partículas también se han recubierto con polímeros (ej, poliestirensulfonato, ácidos acrílicos, entre otros) y decorado con moléculas funcionales específicas (ej., PEG, ácido oléico, citrato, ácido fólico, ácido láurico, dextrano, etc.). Estos últimos sistemas han recibido un interés creciente debido a que pueden mantener sus propiedades iniciales e inclusive mejorarlas, a la vez que mejoran su perfil de toxicidad y eficacia. Estos materiales híbridos son utilizados para proteger el núcleo de hierro de la NPs de factores externos como la oxidación al contacto con el aire o la luz. También ayudan a protegerlas del reconocimiento por parte del sistema inmune y a evitar la agregación a la que tienden naturalmente estas NPs en suspensión acuosa. La cubierta polimérica, además, puede incrementar la biocompatibilidad de éstas, ya que el núcleo ferroso no está expuesto, previniendo así el estrés oxidativo, la apoptosis indeseada y la generación de alteraciones en el ciclo celular.

Éstas partículas ya están siendo usadas en imagenología de resonancia magnética nuclear donde aparecen como puntos radio-opacos en la imagen debido a la absorción de la energía electromagnética³. Además, existen estudios en fase clínica para evaluar estas NPs en la terapia del cáncer ya sea promoviendo la generación de calor local y también promoviendo la liberación de fármacos desde vehículos secundarios^{4,5}, que es la base del presente trabajo de investigación.

Por otro lado, y considerando la propiedad más elemental que presentan las NPs de hierro (magnetismo), varios autores han propuesto su utilización para el tratamiento de patologías localizadas. La mayoría de estas propuestas consisten en la administración de las NPs, asociadas con algún fármaco, y promover su acumulación al sitio de interés (tumores principalmente) mediante la aplicación

de un imán desde el exterior o mediante la implantación de un imán en la cercanía del tejido a tratar⁶. Entre las variables a analizar para obtener un sistema óptimo de *targeting* podemos nombrar: tamaño de las NPs, composición de las NPs, modificaciones superficiales de las NPs, características del imán, etc.⁷. Varios autores han demostrado que estos sistemas aumentan significativamente la eficacia y el potencial para tratar patologías localizadas en diversos tejidos⁸.

NPs de óxido de hierro e hipertermia

Las NPs de óxido de hierro de tamaño inferior a los 40 nm tienen características superparamagnéticas (perdida inmediata de la magnetización al retirar el estímulo magnético) debido al ordenamiento de los distintos momentos magnéticos. En específico, NPs de magnetita, de un diámetro menor a 15 nm, generan energía térmica por mecanismos de relajación de *Néel* (tiempo medio para que cambie el momento magnético en una ubicación fija) y relajación browniana (tiempo medio para que cambie la posición de la partícula manteniendo el momento magnético fijo) luego de ser sometidos a un campo magnético alterno.

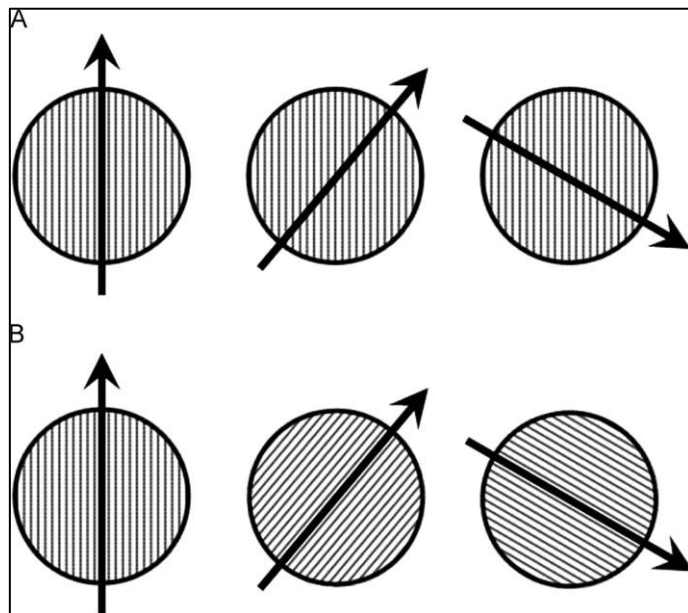


Figura 1. (A) rotación de Néel: el momento magnético gira mientras la partícula permanece fija. (B) rotación de browniana: el momento magnético permanece fijo con respecto a los ejes cristalinos mientras la partícula gira⁹.

Para lograr que un estímulo magnético produzca aumento de temperatura en el sistema, se debe generar un campo alterno oscilante con una fuerza de campo limitada por consideraciones fisiológicas¹⁰, ya que campos de alta frecuencia e intensidad inducen calor local en tejidos no magnéticos, generando daño celular⁹. Debido a su pequeño tamaño y alta sensibilidad a los campos magnéticos, la energía calórica desprendida por las NPs puede afectar los tejidos inmediatamente circundantes sin generar grandes efectos colaterales. Concretamente, si la temperatura generada alcanza valores cercanos a 42°C se denomina hipertermia, si alcanza valores superiores a 46°C se denomina termoablación con la consiguiente necrosis del tejido. Esta tecnología se ha utilizado para la destrucción selectiva de agregados tóxicos de proteínas (ej. Enfermedad de Alzheimer¹¹ y en terapias antineoplásicas¹²). Los parámetros a considerar al trabajar con NPs de óxido de hierro para generar calor, según estudios que teorizan al respecto, son los siguientes: tamaño de partícula, distribución de tamaño, morfología, propiedades magnéticas, anisotropía (variación de las propiedades según la dirección en la que son examinadas) y viscosidad del fluido en la que están dispersas. Como es de suponer, todos estos parámetros tienen relación con la magnitud del campo magnético aplicado para generar la hipertermia en las NPs de interés.

Microgeles y *drug delivery*

Los microgeles poliméricos entrecruzados se clasifican como hidrogeles si están compuestos por cadenas poliméricas solubles en agua o con la capacidad de absorber agua, lo que los hace posibles candidatos para su uso en sistemas biológicos. Estos sistemas, a diferencia de los sistemas convencionales de administración, ofrecen ventajas notables como sistemas de liberación de

fármacos (*drug delivery*). Entre estas propiedades podemos destacar: una mayor área superficial (debido a su menor tamaño), su gran contenido de agua (haciéndolos flexibles y con mayor biocompatibilidad) y su potencial biodegradabilidad (dependiendo de su composición). Además, debemos considerar la posibilidad de adaptar sus propiedades físicas y mecánicas para promover una liberación controlada o prolongada de los fármacos que pudiesen estar contenidos en ellos. Finalmente, estos sistemas pueden estar sujetos a modificaciones posteriores a su elaboración, lo que puede mejorar algunas características claves para su uso (carga superficial, porosidad, tamaño, estabilidad, etc.).

Los microgeles son generalmente preparados utilizando polímeros hidrofílicos que se entrecruzan por diferentes métodos. Entre los principales métodos destacamos el entrecruzamiento por métodos reversibles (gelificación mediada por interacciones iónicas) y por métodos irreversibles (interacciones covalentes). Siguiendo con las líneas investigativas del laboratorio de *Drug Delivery*, en la presente memoria se utilizarán microgeles de alginato entrecruzados por interacciones reversibles y generados por goteo/aspersión (*dripping*).

El alginato es un polisacárido hidrofílico lineal extraído desde algas pardas. Su composición consiste en cadenas de residuos de los ácidos β -D-manurónico (bloque M) y α -L-gulurónico (bloque G), enlazados por enlaces 1-4 glicosídicos. Cada bloque de este polímero posee un grupo funcional carboxilato, lo que convierte al alginato en un polielectrolito con carga negativa a pH superior a 4,5. La gelificación del alginato se produce, convencionalmente, por el intercambio iónico entre los iones sodio del bloque G (cuando se utiliza como reactivo el alginato de sodio) y cationes divalentes, como el calcio, que enlazan dos bloques G de las moléculas adyacentes (ver fig. 2).

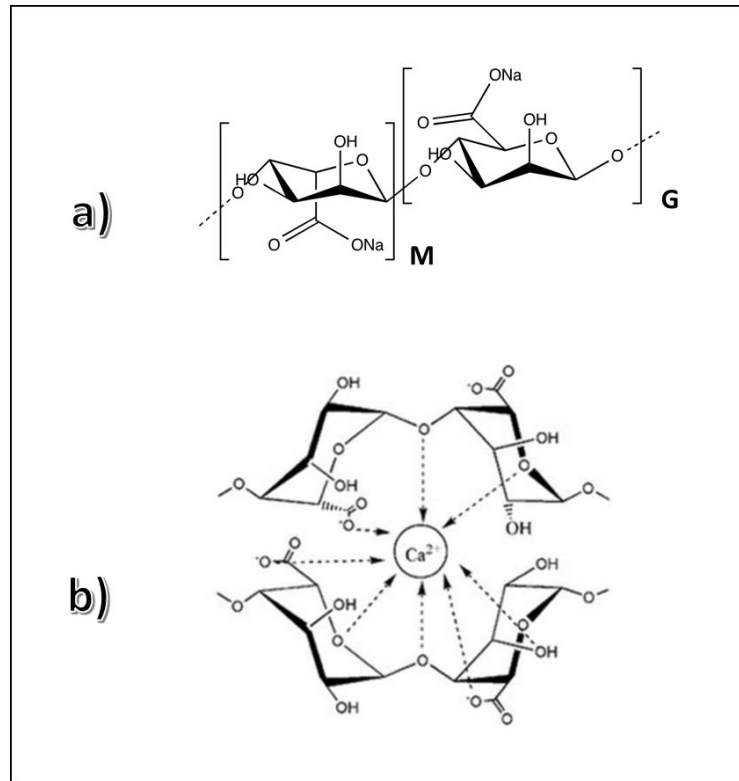


Figura 2. Estructura del alginato. a) estructura química de las unidades monoméricas de alginato de sodio, bloques M y G ¹³. b) representación del modelo de “la caja de huevos”¹⁴.

El método de *dripping* consiste en la extrusión de la solución de alginato mediante goteo y/o aspersion (por una boquilla de tamaño definido y con flujo predeterminado) sobre una solución que puede contener cationes divalentes (calcio, bario, etc.) lo que también se denomina como gelificación iónica; o sobre una solución más compleja que puede contener polímeros catiónicos y que se denomina coacervación compleja (ver fig. 3).

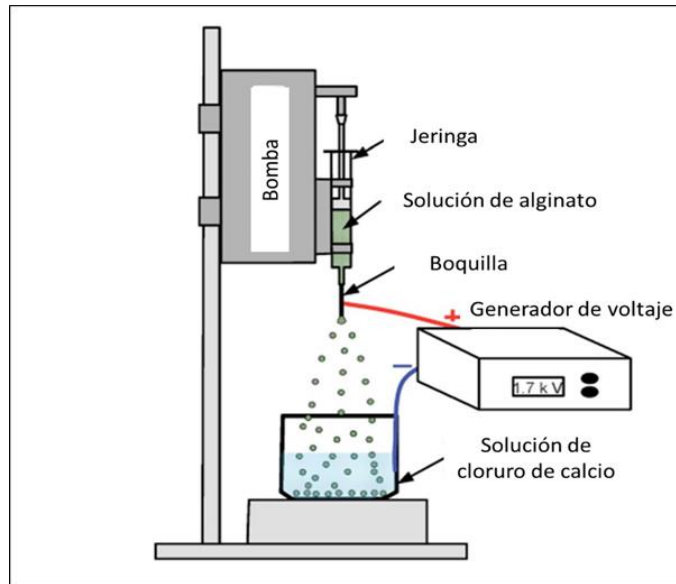


Figura 3. Diagrama de un dispositivo de goteo (*dripping*), utilizado para generar microgeles de alginato de calcio¹⁵.

Existe una extensa investigación acerca de microgeles y de la manera en que atrapan y/o encapsulan moléculas bioactivas como proteínas, ADN y su liberación *in-vitro*. También se ha estudiado la incorporación de nanoestructuras inorgánicas, que incluyen *quantum dots*, NPs magnéticas para imágenes por resonancia magnética nuclear y NPs de oro para terapia fotodinámica.

2. Fundamentación y formulación del problema

Existen varios trabajos en los que se propone la inclusión concomitante (coencapsulación) de NPs magnéticas y fármacos en microgeles. El objetivo ha sido, en la mayoría de los casos, el desarrollo de micromedicamentos con la capacidad para atrapar y liberar el fármaco de manera controlada, ya sea en el lugar de acción (actuando como vehículo¹⁶) y/o en el tiempo requerido (actuando como dispositivo sensible a estímulos externos¹⁷).

En el primer caso, ya se conoce la capacidad del microvehículo para responder al estímulo magnético (movilizando/manteniendo al medicamento hacia/en un área determinada y promoviendo allí la acumulación del fármaco). Sin embargo, no hay muchos estudios enfocados en identificar si el estímulo aplicado, y la consiguiente movilización del microgel, promueve la liberación del fármaco.

En el segundo caso, existen muy pocos trabajos enfocados en evaluar si la aplicación de un estímulo alterno aplicado al microvehículo que contiene el fármaco y las NPs de hierro, es capaz de promover la liberación del activo producto de un cambio conformacional del microvehículo originado por el aumento de la temperatura.

En este trabajo de investigación proponemos, a través de un estímulo externo controlado (con un campo magnético alterno generado por un equipamiento adaptado por nosotros), inducir calor local en las NPs de magnetita coencapsuladas en los microgeles de alginato. Con esto, buscamos promover un cambio conformacional en el microvehículo que desencadene la liberación del fármaco. La elección de las NPs de óxido de hierro, para ser co-encapsuladas con el fármaco en el microgel, se basa en que son biocompatibles y presentan gran sensibilidad al campo magnético aplicado. Éstas, además presentan un comportamiento superparamagnético, lo que se refiere a una pérdida total de la magnetización (y consiguiente incapacidad para generar calor), al suprimir el estímulo externo³. Esto permitiría repetir el proceso de generación de calor, y la

consiguiente liberación de fármaco, varias veces. De este modo, se podría diseñar un dispositivo medicamentoso para liberar varias dosis de fármaco en respuesta al número de estímulos aplicado.

2.1 Hipótesis

- El diseño, desarrollo y aplicación de un campo magnético adecuado, permite generar respuestas específicas en microgeles que contienen NPs de hierro. Estas respuestas tienen potenciales aplicaciones terapéuticas.

2.2 Objetivo general

- Demostrar que se pueden generar potenciales aplicaciones terapéuticas en microgeles que contienen NPs de hierro, luego de haber aplicado un campo magnético adecuado.

2.3 Objetivos específicos

1. Diseñar y desarrollar un generador de campo magnético alterno.
2. Aplicar el campo magnético alterno (desde el generador desarrollado) a distintas formulaciones de NPs de hierro y seleccionar las NPs que presenten mayor potencial calorífico.
3. Recubrir y caracterizar NPs de óxido de hierro seleccionadas, con polímeros de carga complementaria.
4. Encapsular NPs de óxido de hierro recubiertas, junto a un analito de interés, en los microgeles de alginato de calcio.
5. Exponer las microformulaciones a diversos estímulos magnéticos y evaluar la respuesta en términos de generación de calor, liberación de nanosistemas y movilidad.
6. Exponer las microformulaciones a estímulos térmicos y mecánicos y evaluar la estabilidad de la formulación.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

- Acetona (Merck, Darmstadt, Germany).
- Etanol (Merck, Darmstadt, Germany).
- Agua MiliQ (Millipore, Sao Paulo, Brazil).
- Alginato de sodio de baja viscosidad (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Germany).
- Alginato de sodio IL-6G (KIMICA Chile Ltda.).
- Sulfobutil β -ciclodextrina (Captisol, USA).
- Carragenina lambda (Gelymar, Chile).
- Epikuron 145V (Cargill, Germany).
- Waglinol 3/9280 (Industrial Quimica Lasem, España).
- Astaxantina (Astax S.A., Chile).
- Rojo Sudán III (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2 Métodos

3.2.1 Diseñar y desarrollar de un generador de campo magnético alterno.

Se diseña y desarrolla un prototipo capaz de generar un campo magnético oscilante (alterno) con la intensidad y frecuencia necesaria para producir una respuesta térmica en NPs de magnetita. El campo magnético es generado con la técnica de ZVS (*Zero voltage switching*), obteniendo una alta eficiencia de operación a una frecuencia de oscilación media (en el rango de los kHz). La potencia del equipo está restringida a un uso con potencial biológico por lo que se debe considerar los parámetros descritos por Briezovich⁹ (en general, indica que estímulos a frecuencias ≤ 200 kHz tienen bajo/nulo efecto sobre los tejidos biológicos normales). La caracterización del campo magnético se realiza mediante un osciloscopio conectado al circuito eléctrico ZVS, con la finalidad de caracterizar la onda generada en cuanto a forma, frecuencia y amplitud.

3.2.2 Aplicar el campo magnético alterno (desde el generador desarrollado) a distintas formulaciones de NPs de hierro y seleccionar las NPs que presenten mayor potencial calorífico.

La aplicación del campo magnético alterno se hizo siguiendo el siguiente esquema (ver fig. 4) en donde la muestra de NPs en solución contenidas en un tubo Eppendorf de 1,5 mL fue estimulada en el interior de la espira.

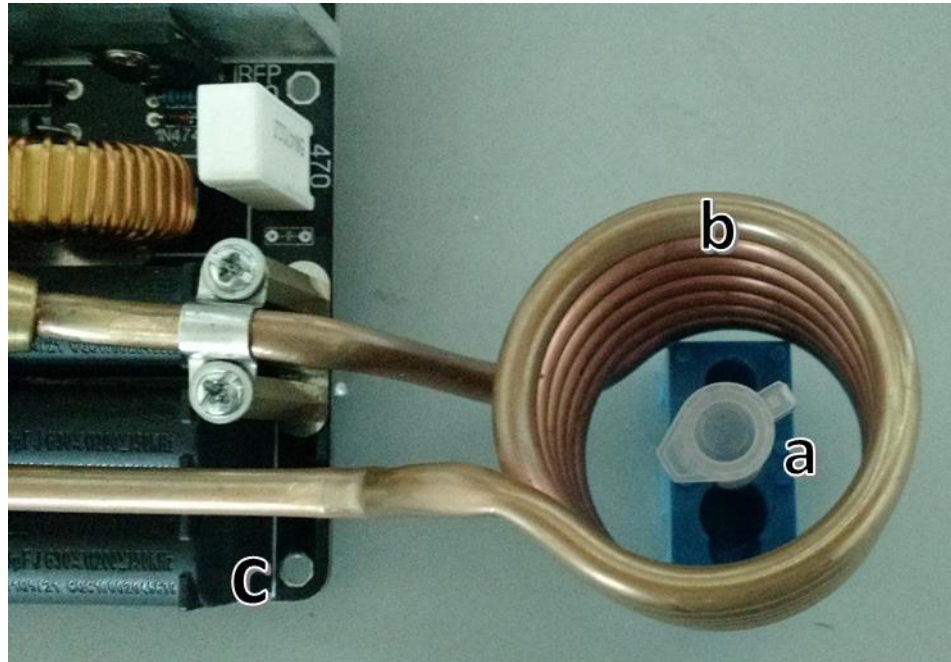


Figura 4. Disposición de los elementos. a) muestra con NPs de hierro, b) espira y c) circuito eléctrico.

Para evaluar la respuesta térmica de las NPs de hierro ante el estímulo magnético es necesario un sistema más preciso que un termómetro tradicional, debido a que las variaciones de temperatura son muy pequeñas en un corto periodo de tiempo y los volúmenes de las muestras son inferiores a 5 mL. Por tal motivo, fueron testeadas mediciones con termocupla y por termografía infrarroja (Cámara termográfica DALI LT3, *Zhejiang Technology*, P.R. China). La termocupla consta de una sonda de metal que está fabricada con dos alambres de distinto metal que se ponen en contacto con la muestra. La variación de temperatura en la sonda genera una variación de voltaje que es registrado por el equipo. El segundo método, termografía infrarroja, consiste en generar imágenes luminosas visibles al ojo humano a partir de las emisiones infrarrojas, el procesamiento de estas imágenes asigna colores arbitrarios de acuerdo al rango de intensidad de la longitud de onda medida. Una vez definidos los parámetros para medir la liberación de calor, se necesita optimizar la irradiación de la muestra, para ello se evaluaron distintas ubicaciones y concentraciones a los cuales se espera tener una respuesta de aumento de temperatura.

Las NPs usadas para los experimentos fueron nanoesferas de magnetita, provistas gentilmente por el laboratorio *Nanocrystals and Chemistry Group* del Instituto de Ciencias de los Materiales de Madrid (CSIC). El método de síntesis utilizado fue la co-precipitación de sales férricas en medio acuoso². Las características de las NPs utilizadas fueron ampliamente descritas por los autores Costo et al., 2012¹⁸.

3.2.2.1 Caracterizar las NPs de óxido de hierro.

En el Laboratorio de la Dra. Morales las NPs fueron caracterizadas en tamaño por la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la concentración de hierro presente en la solución de NPs fue medida por espectrometría de emisión óptica acoplada inductivamente a plasma (ICP). En nuestro laboratorio fue medido el radio hidrodinámico y potencial zeta (por el método de dispersión de luz dinámica y micro electroforesis de láser Doppler, Zetasizer ZS, Malvern) de cada muestra antes y después de un periodo de irradiación.

Se cuantificó la variación de temperatura por termografía infrarroja al estimular una muestra de NPs (12 nm, 30 mg/mL) con campo magnético. Además, se aumentó la temperatura ambiental a la cual se realiza la estimulación magnética con el objetivo de emular una experiencia más cercana a ser utilizadas en un medio biológico. Para ello se aisló el sistema dentro de un cubo de Aislapol con salida para el cableado y las mangueras conectadas a la recirculación y una abertura superior con tapa para hacer los registros de temperatura.

3.2.3 Recubrir y caracterizar NPs de óxido de hierro seleccionadas con polímeros de carga complementaria.

Con el fin de mejorar la compatibilidad iónica de las soluciones/suspensiones (es decir, que posean la misma carga negativa de modo de no interactuar atractivamente), se evalúa el efecto que tiene la adsorción iónica en medio acuoso de polímeros polianiónicos sobre las NPs de hierro con carga positiva en suspensión (con el fin de recubrirlas y que presenten carga negativa). El protocolo consistió en mezclar, bajo agitación, soluciones de polímeros polianiónicos en distintas proporciones con las NPs de hierro (suficiente para invertir la carga superficial de las NPs). Los polímeros aniónicos utilizados fueron: alginato de sodio IL-6G (rico en grupos G), sulfobutil β -ciclodextrina y carragenina lambda (ver fig. 5).

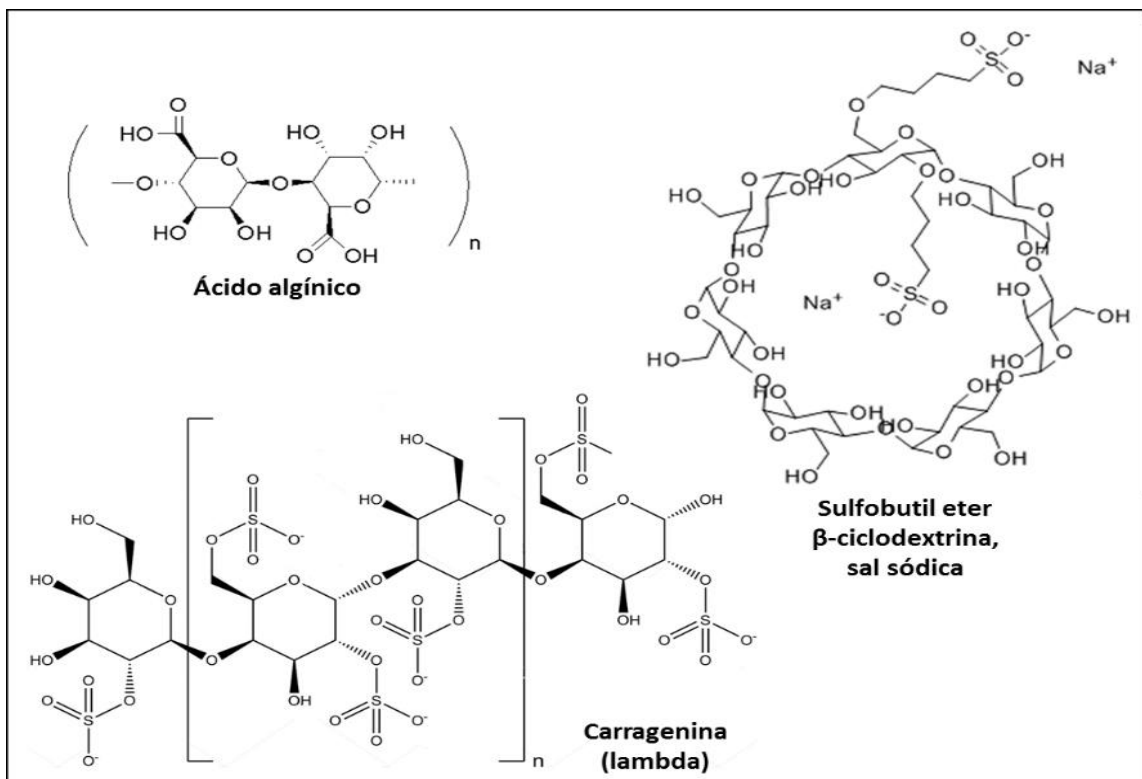


Figura 5. Representación de los polímeros aniónicos utilizados ¹⁹⁻²¹.

Se analizó el diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las NPs recubiertas, además de su capacidad de liberar calor en medio acuoso a través de termografía infrarroja (Cámara termográfica DALI LT3, *Zhejiang Technology*, P.R. China).

3.2.4 Encapsular NPs de óxido de hierro recubiertas, junto a un analito de interés, en los microgeles de alginato de calcio.

Para efectuar la inclusión de las NPs de hierro recubiertas y nuestro analito vehiculizado en los microgeles se mezclaron: alginato de sodio en solución, suspensión de NPs de hierro y el analito de interés vehiculizado. La estabilidad de la mezcla resultante está dada por la compatibilidad iónica de las soluciones/suspensiones, es decir, todos los componentes deberán tener carga superficial similar para evitar complejación e inestabilidad²². Luego de analizar las mejores condiciones para la encapsulación, se procede a gotear la mezcla sobre una solución de cloruro de calcio.

3.2.4.1 Seleccionar y vehiculizar un analito de interés para su inclusión en microgeles.

Debido a que existen muchas moléculas antineoplásicas con gran potencial biológico que presentan alta lipofilia (paclitaxel, docetaxel, dactinomicina, etc.), fue seleccionado un colorante no hidrosoluble de modo de imitar el comportamiento hidrofóbico de estos fármacos, y que además sea fácil de detectar por diversos métodos (espectrofotometría Uv-visible, HPLC, etc.). Considerando que el microsistema y las soluciones que lo conforman, al igual que la mayoría de los medios biológicos, son hidrofílicas, es necesario que la molécula sea dispersable en medio acuoso. Para ello, optamos por incluirla en nanoemulsiones de núcleo oleoso (OW). Estos sistemas se desarrollaron siguiendo el protocolo de desplazamiento de solvente²³⁻²⁵. Esta técnica consiste en mezclar un solvente orgánico, miscible en agua, (que contiene disueltos los

compuestos lipofílicos: fase interna, emulgente y analito) en una fase acuosa. Mediante agitación, la difusión del solvente orgánico (o mezcla de solventes) en la fase acuosa permite la formación de las nanoemulsiones. Posteriormente el solvente orgánico es eliminado por rota-evaporación.

La fase orgánica está compuesta por 30 mg de Epikuron 145 V, 125 µL de Waglinol (esteres de ácido caprílico/capróico), 2,76 mg de astaxantina y 1 ml de etanol. Posteriormente todo esto se disuelve en 9 mL de acetona y se agita hasta alcanzar la homogeneidad. La fase acuosa consta de 20 mL agua desionizada, la que se somete a agitación vigorosa y sobre ésta es añadida la fase orgánica. La mezcla es rota-evaporada hasta llegar a un volumen final de 10 mL.

La caracterización de las nanoemulsiones elaboradas se realiza midiendo el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad mediante dispersión de luz dinámica y el análisis de potencial zeta se realiza por microelectroforesis de láser Doppler en el equipo Zetasizer ZS(Malvern).

3.2.4.2 Elaborar microgeles de alginato de calcio coencapsulando nanoemulsiones cargadas con el analito de interés y NPs de óxido de hierro.

Los microgeles son elaborados por medio de "*dripping*"²⁵. Este método consiste en que una masa de biopolímero (alginato de sodio) es disuelta en agua desionizada (generando una solución aniónica), la cual es vertida/asperjada en pequeñas gotas sobre una solución de cloruro de calcio (solución catiónica) manteniendo una agitación constante dando como resultado la formación de microesferas gelificadas.

3.2.4.2.1 Elaboración automatizada de microgeles

Para la inclusión de nanoemulsiones y NPs fueron mezclados 20 mL de alginato de sodio al 2%, 150 μ L de una suspensión de NPs de hierro recubiertas con alginato (concentración de hierro final en la formulación: 30 mg/mL) y 19.85 mL de nanoemulsión (agitación en vórtex); ésta suspensión se asperja sobre una solución de cloruro de calcio al 2%. La elaboración automatizada de los microgeles se llevó a cabo usando un micro-encapsulador *Microencapsulator B-395 Pro* (Büchi) empleando *nozzles* (boquilla que dirige el flujo) de 150, 300 y 450 μ m de diámetro interno de acuerdo a los siguientes parámetros:

Nozzle	Flujo (mL/min)	Frecuencia (Hz)	Campo eléctrico (V)
150 μ m	3.5	6000	900
300 μ m	6.5	6000	1280
450 μ m	16.3	6000	900

Tabla 1. Condiciones de aspersión automatizada.

3.2.4.2.2 Elaboración manual de microgeles

Para la inclusión de NPs recubiertas con polímeros aniónicos se realizó una mezcla de 750 μ L de suspensión de alginato de sodio al 3% ajustada a pH 4 y 750 μ L de suspensión de NPs recubierta con alginato de sodio 6G (60 mg de Fe/mL), para obtener una suspensión de goteo con una concentración final de NPs de 30 mg de hierro por mL de suspensión y alginato al 1,5%. Los microgeles se elaboran manualmente mediante goteo con una jeringa de 10 mL y una aguja de calibre 27G (400 μ m).

La caracterización en términos de forma y tamaño se realizan en un microscopio óptico con un aumento de 4X, determinando el tamaño de una muestra utilizando el software Micrometrics SE Premium.

3.2.5 Exponer las microformulaciones a diversos estímulos magnéticos, y evaluar la respuesta en términos de generación de calor, liberación de nanosistemas y movilidad.

Se realizaron tres tipos de experiencias con los estímulos magnéticos. Para el caso del **campo magnético oscilante**, se observó la **generación de calor** de los microsistemas durante la irradiación con el campo generado por nuestro oscilador durante 20 minutos. Para ello se ubicó un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contiene una muestra de 30 mg de microgeles elaborados manualmente (alginato/quitosano y alginato/calcio), liofilizados y resuspendidos en 1 mL de agua desionizada. La temperatura se registró mediante termografía infrarroja. La variación de temperatura de la superficie del tubo Eppendorf que contiene las microformulaciones se obtiene de la sustracción del valor de temperatura del tubo irradiado con las microformulaciones menos el valor de la temperatura de un tubo Eppendorf que contiene agua desionizada.

Utilizando el estímulo de campo **magnético oscilante** también se evaluó la **liberación de nanosistemas** (nanoemulsiones cargadas con astaxantina) desde microformulaciones de tres tamaños distintos (elaboradas con *nozzle* de diámetro interno de 150, 300 y 450 μm) elaboradas automáticamente. En este caso, el porcentaje de liberación de astaxantina desde los microsistemas está representado por la relación entre la astaxantina liberada post-estímulo y el total de astaxantina contenida en éstos. La astaxantina liberada se calculó analizando una alícuota del sobrenadante de los microgeles estimulados y comparándola con una masa similar de microformulaciones no estimuladas, pero en un medio de digestión para los microgeles de citrato de sodio al 5% a pH 6,8²⁶, este método ha sido descrito en la literatura y sirve para desestabilizar los microsistemas producto de la quelación entre el citrato y el calcio de los microgeles de alginato de calcio. Posteriormente las muestras seleccionadas fueron disueltas en el doble de volumen de acetona (para obtener el 100% de astaxantina libre desde las nanoemulsiones). Se analizó la astaxantina de ambos experimentos (muestra

problema y control) a una longitud de onda de 470 nm en espectrofotómetro (UV-vis Lambda 25 Perkin Elmer)

Para la prueba de **campo magnético fijo**, se utilizó un imán de 2500 gauss que se ubicó en contacto con una celda de vidrio de 1 cm x 1 cm x 2,5 cm donde se evaluó la velocidad de **movilización** de los microgeles (con NPs y astaxantina). Para la realización del ensayo se utilizó 30 mg de microgeles de tres tamaños (*nozzle* de diámetro interno de 150, 300 y 450 μm) cargados con nanoemulsiones y NPs de hierro elaborados automáticamente, liofilizados y suspendidos en agua desionizada. Para cuantificar la movilización de las microformulaciones se midió el tiempo que tardan todos los microgeles en llegar del extremo inferior al superior de la celda (1 cm cuando se depositan horizontalmente sobre una superficie plana) cada vez que se estimulaba con un imán.

3.2.6 Exponer las microformulaciones a estímulos térmicos y mecánicos y evaluar la estabilidad del sistema.

Para conocer las consecuencias de la aplicación de calor en los microsistemas, se realizó un estudio de estabilidad. En esta experiencia los microgeles fueron liofilizados para conocer su masa seca (masa exacta). El estímulo de calor se aplicó a los microgeles (reconstituidos) dispersos en agua desionizada durante 3 horas a 60 °C y 150 rpm (se utilizó una incubadora de agitación orbital LSI-3016R, LabTech) para luego analizar el porcentaje de analito liberado (astaxantina y hierro). El porcentaje de astaxantina liberado se calculó analizando una alícuota del sobrenadante de los microgeles estimulados según el método utilizado en el punto **3.2.5** y comparándolas con una masa similar de microformulaciones no estimuladas, pero en un medio de digestión para los microgeles (citrato de sodio al 5% a pH 6,8). Posteriormente se analizó la astaxantina de ambos experimentos (muestra problema y control) a una longitud de onda de 470 nm en espectrofotómetro (UV-vis Lambda 25 Perkin Elmer). La cuantificación de hierro se realizó utilizando espectrometría de absorción atómica (PinAAcle 900 AA

Perkin Elmer). Para ello, se realizó una digestión ácida (HNO_3/HCl 2N) por 24 horas del sobrenadante de la muestra problema. La concentración de hierro se obtuvo por la interpolación del valor obtenido con una curva de calibración con estándar de hierro ($y = 0,0792 x + 0,0007$), lineal en concentraciones entre 0,25 mg/mL y 3 mg/mL.

4 Resultados y Discusión

4.1 Diseñar y desarrollar un generador de campo magnético alterno.

Con el objeto de conseguir una respuesta calorífica por parte de las NPs de óxido de hierro es necesario diseñar un aparato capaz de generar un campo magnético con la intensidad y frecuencia necesaria para estimular las NPs. De acuerdo a la literatura, una frecuencia de entre 50 ~ 200 kHz se considera adecuada para pruebas biológicas²⁷. La alternativa elegida como fuente de radiación magnética fue un oscilador del tipo ZVS (*zero voltage switching*, ver fig. 6) que fue adquirido como un circuito integrado con el nombre de *Induction Heating Driver* (SunrisePeak Store, China). El campo magnético es generado al hacer circular corriente directa a través una bobina o espira que es descargada de forma alternada desde los condensadores del circuito eléctrico.

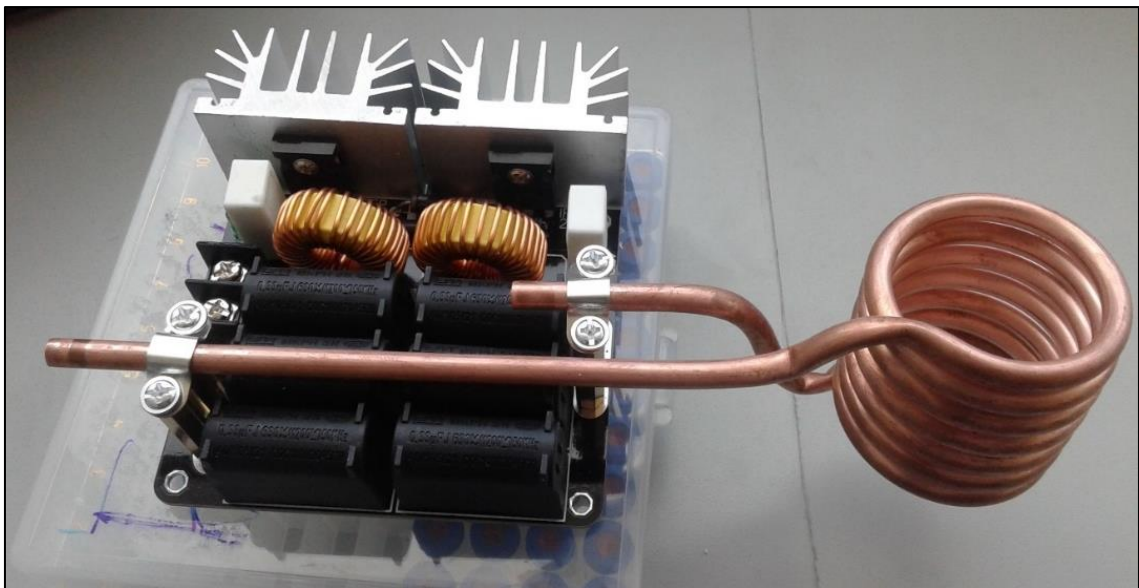


Figura 6. Circuito integrado ZVS adquirido para estimular las formulaciones.

Para el correcto funcionamiento del circuito, es necesario conectarlo a una fuente de poder adecuada. El fabricante recomienda un voltaje de entre 12V ~ 24V y

20A de corriente directa, la fuente usada es de 12 V y 20 A (fuente de poder 12V – 20A, CCTVCHILE). Además, se usó la espira conductora (tubo de cobre de 6 mm de diámetro incluido con el circuito) para crear el campo magnético al hacer circular alternadamente corriente continua por su interior. Durante las pruebas iniciales, quedó en evidencia la necesidad de refrigerar la espira debido a que la corriente eléctrica aumenta la temperatura del medio interfiriendo con las mediciones de las NPs (se genera calor por convección en la suspensión de NPs debido a la transferencia de calor entre la espira, el aire circundante y la muestra). Para ello, se acoplaron sistemas Racor (ver fig. 7) en los extremos de la espira con la finalidad de conectar el tubo de manera segura a un baño refrigerado circulante que utiliza agua desionizada.

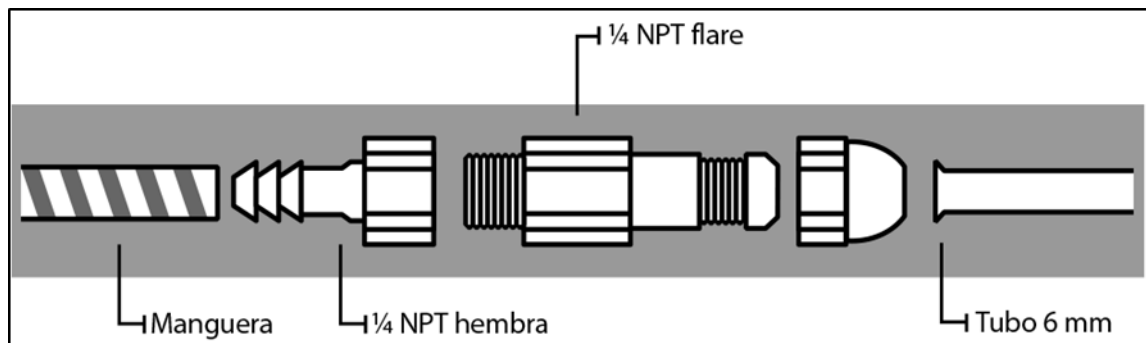


Figura 7. Diagrama del dispositivo Racor, usado para conectar el tubo de cobre al sistema de refrigeración.

Al analizar la onda generada con un osciloscopio conectado a los terminales del circuito, se observó una onda sinusoidal con una frecuencia de 100 kHz y una amplitud de ± 12 V. Lo anterior indica que el campo electromagnético es estable respecto de la frecuencia y la corriente circulante (datos no mostrados).

4.2 Aplicar el campo magnético alterno (desde el generador desarrollado) a distintas formulaciones de NPs de hierro y seleccionar las NPs que presenten mayor potencial calorífico.

Posterior a los ensayos preliminares, tuvimos que seleccionar un método para cuantificar el eventual calor liberado por las NPs mientras son estimuladas. Para ello, se contrastaron los resultados de la medición de temperatura por dos métodos distintos, la termocupla y la cámara infrarroja. Para ello se realiza una experiencia en donde una muestra de NPs de hierro de 12 nm (provistas desde el laboratorio *Nanocrystals and Chemistry Group* dirigido por la Dra. Morales) fue suspendida en agua destilada pH 4 (50 mg/mL) e irradiada con el campo magnético durante 30 minutos. Se midió la temperatura utilizando ambos métodos y se compararon los resultados (fig. 8).

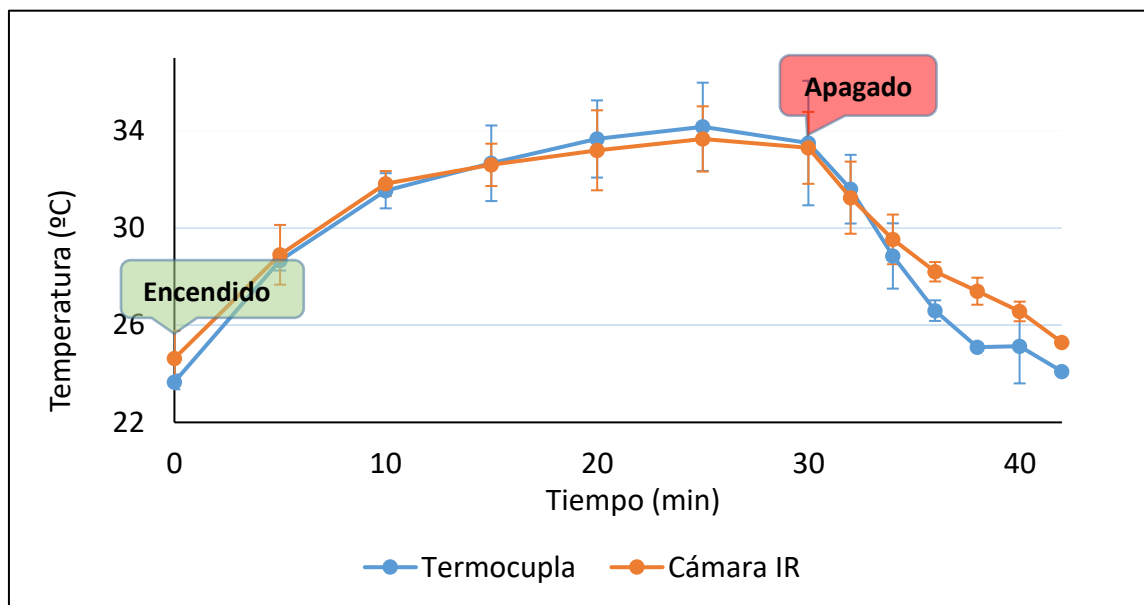


Figura 8. Comparación de la medición de temperatura con ambos métodos (termocupla y cámara infrarroja) durante la irradiación a una muestra de NPs de 12 nm por 30 minutos (pH 4 y 50 mg/mL). $n=3$, \pm desviación estándar.

Como se observa en la figura 8, no se aprecian diferencias entre las dos mediciones. Esto demuestra que la temperatura registrada por la cámara

infrarroja, correspondiente a la superficie externa del tubo *Eppendorf* donde está contenida la muestra de NPs en medio acuoso, es similar a la temperatura de la suspensión evaluada por la termocupla. Es importante destacar que la medición realizada con la termocupla requiere apagar el campo magnético al sumergir la termocupla en la solución, ya que al estar hecha de un metal magnetizable se calienta por si sola y crea un error en la medición de la muestra; esto evidentemente representa una limitante al utilizar esta estrategia. Por otro lado, el hecho de sumergir la termocupla en una solución viscosa (por ejemplo, las NPs en las concentraciones utilizadas) hace que una parte de la muestra se adhiera y se pierda con cada medición. Por lo tanto, se opta por la termografía infrarroja como método de cuantificación de la variación de la temperatura (fig. 9a).

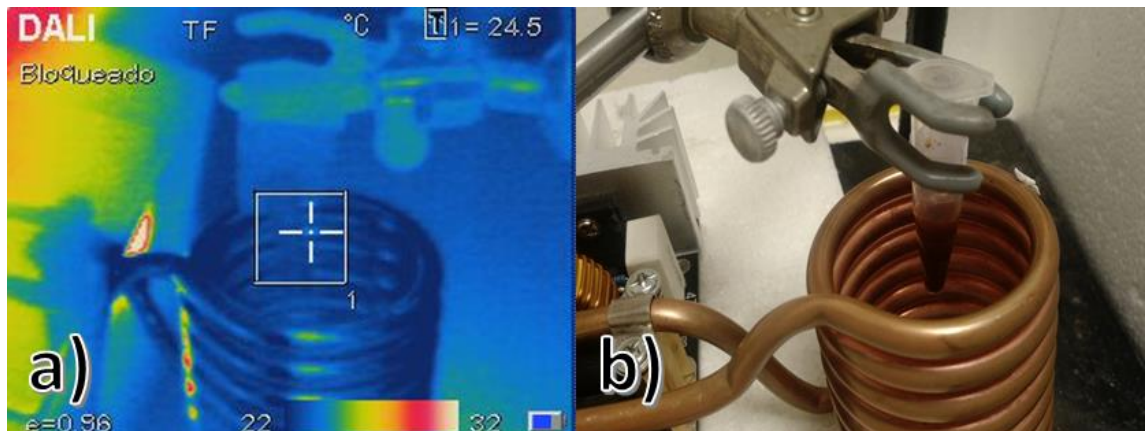


Figura 9: a) termografía infrarroja de la muestra irradiada. b) imagen óptica del sistema.

Una vez elegido el método por el cual se medirá la temperatura, se debe elegir la mejor forma de irradiar la muestra. Para ello, se comparó el irradiar una muestra ubicada en el centro de la espira conductora, que según la teoría es donde se concentra la mayor intensidad de campo, *versus* ubicar la muestra en el borde interno de la espira en donde suponemos el campo magnético es más estable. El experimento se llevó a cabo con tres muestras de NPs de distinto tamaño (10 nm, 12 nm y 14 nm), a la misma concentración (50 mg/mL), ubicándolas en el centro y en el borde interno de la espira conductora para luego

irradiarlas durante 30 minutos. Los resultados (ver fig. 10) arrojaron que las NPs ubicadas en el centro siempre liberan más calor que la misma muestra ubicada en el borde de la espira.

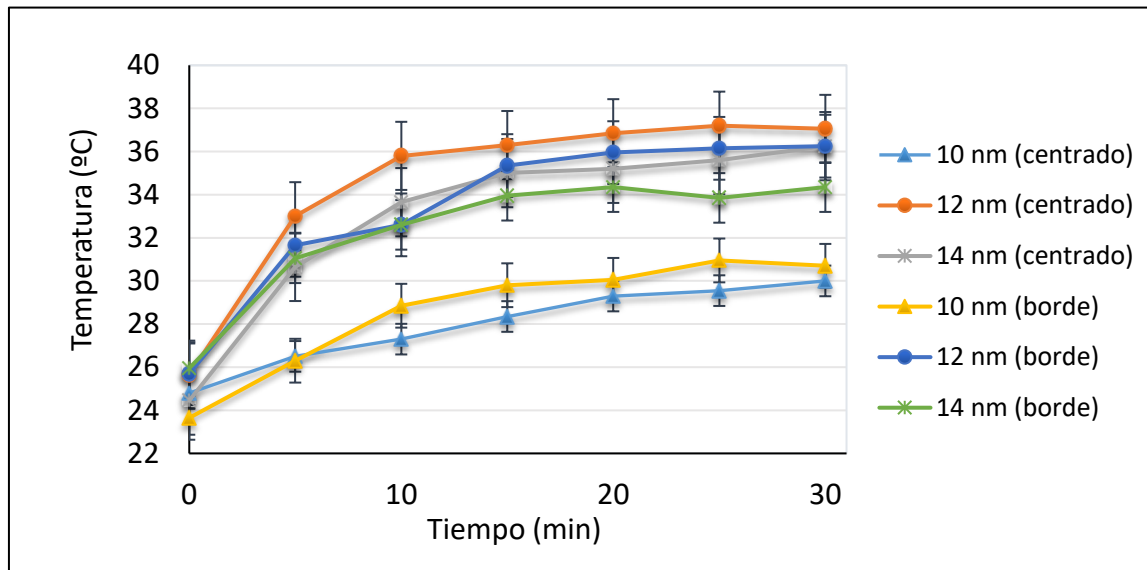


Figura 10. Comparación de las mediciones de temperatura de NPs de hierro (10, 12 y 14 nm y 50 mg/mL) durante irradiación constante (30 minutos). Las muestras fueron ubicadas al centro o al borde interno de la espiral conductora. ($n=3$, \pm desviación estándar)

4.2.1 Caracterizar NPs de óxido de hierro.

Las NPs de magnetita fueron sintetizadas por el método de co-precipitación de sales férricas en medio acuoso en el laboratorio “*Nanocrystals and Chemistry Group*” (Instituto de Ciencias de los Materiales de Madrid, CSIC). Las NPs fueron caracterizadas en dicho laboratorio en cuanto a tamaño por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la concentración de hierro en suspensión acuosa fue medida por espectrometría de emisión óptica acoplada inductivamente a plasma (ICP) (tabla 2).

NPs magnetita	[Fe] mg/mL
6 nm	196
8 nm	75
10 nm	307
12 nm	287
14 nm	268

Tabla 2.
Tamaño (evaluado por TEM) y concentración de hierro en las suspensiones stock de distintas NPs al ser sintetizadas.

Las NPs de distinto tamaño e igual concentración (30 mg/mL, que es una concentración inferior a la evaluada en la figura 10) fueron sometidas a estímulo magnético oscilante durante 30 minutos. La variación de temperatura fue medida por termografía infrarroja, dando como resultado que las NPs de 12 nm y 14 nm son las únicas que presentan aumentos de temperatura, siendo las NPs de 12 nm quienes más elevan la temperatura (7,2 °C) por sobre la temperatura basal. (ver fig. 11)

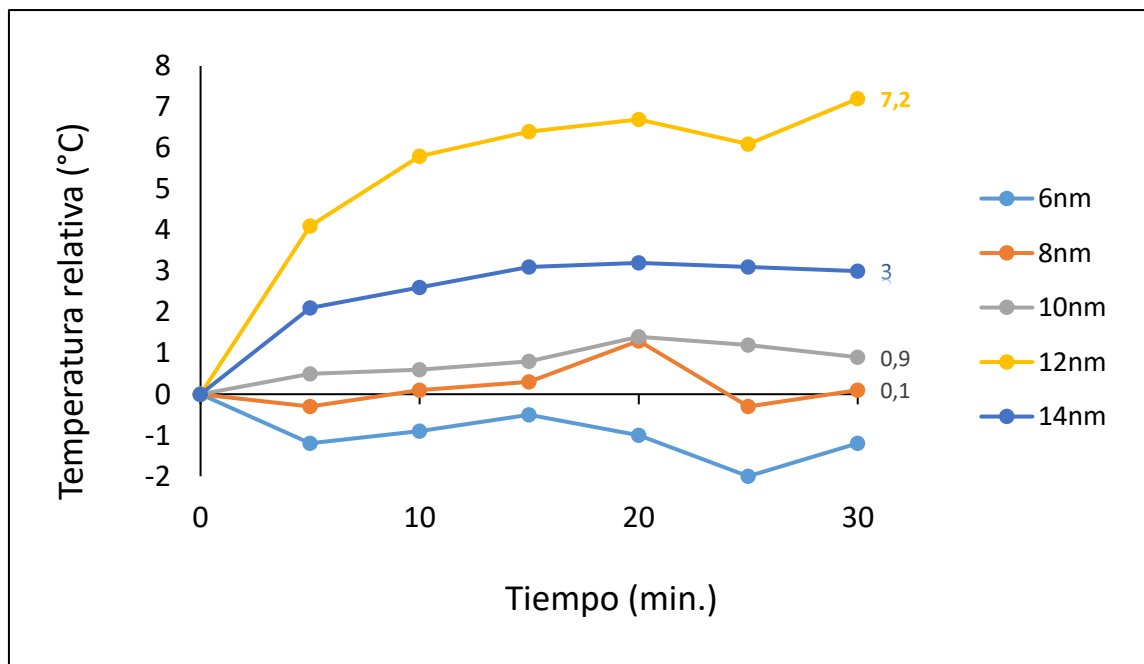


Figura 11. Comparación del diferencial de temperatura alcanzada por una solución de NPs de hierro (30 mg/mL) bajo estímulo magnético oscilante, respecto a una suspensión acuosa sometida al mismo estímulo. ($n=3$, \pm desviación estándar)

Además, medimos el radio hidrodinámico y potencial zeta de las NPs (concentraciones de 1 mg/ml), antes y después de ser sometidas al estímulo de campo magnético generado por nuestro prototipo. Como muestra la figura 12, no se aprecian diferencias en las características de las NPs después de liberar calor. Además, no se aprecian agregados de partículas que indiquen fusión del material, lo que haría posible someter las nanopartículas a ciclos repetitivos de irradiación.

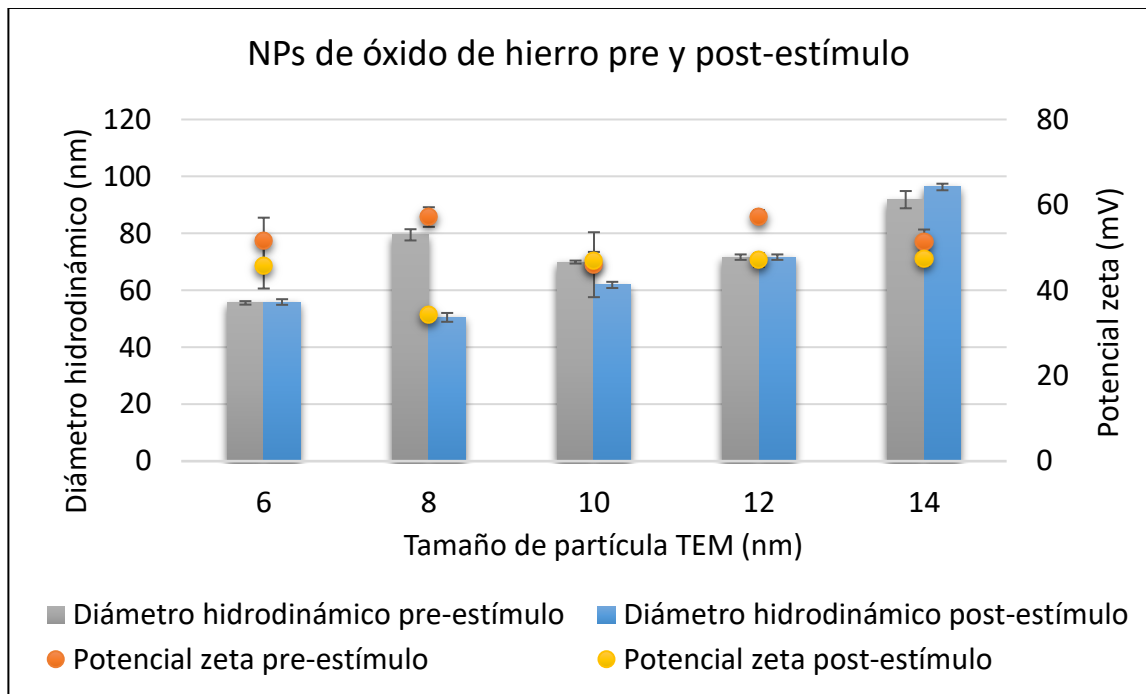


Figura 12. Comparación de las mediciones de diámetro hidrodinámico y potencial zeta antes y después de irradiar las NPs durante 30 minutos (30 mg/mL). ($n=3$, \pm desviación estándar)

Considerando que la temperatura basal a la que se encuentra el cuerpo humano es mayor a la temperatura ambiente ensayada en los experimentos previos, hemos desarrollado una estrategia que permite iniciar los experimentos a una temperatura inicial (basal) de $\approx 36 - 37$ °C en las muestras. Esta estrategia consiste, en aumentar la temperatura del agua circulante en el interior de la espira (baño termorregulado) y mantenerla constante aislando el sistema con una

cubierta aislante de Aislapol. En la figura 13, se puede apreciar una comparación, en términos de la temperatura liberada, cuando las NPs de hierro son estimulados a partir de la temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a partir de una temperatura similar a la corporal del humano ($\approx 36 - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). En ambos casos, el aumento de temperatura de las muestras es similar ($\approx 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) lo que indicaría que la ganancia de calor obtenida a temperatura ambiente, también se extrapolaría a un organismo vivo.

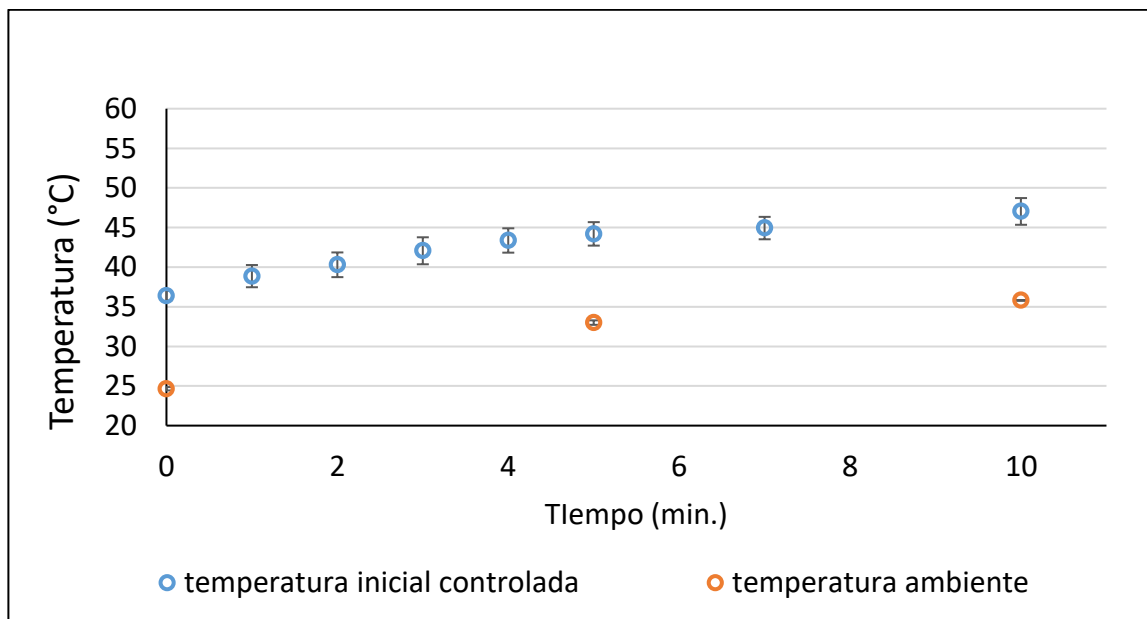


Figura 13. Comparación de la variación de temperatura de NPs óxido de hierro (12 nm y 30 mg/mL) estimuladas magnéticamente a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a temperatura inicial controlada ($\approx 36-37\text{ }^{\circ}\text{C}$). ($n=3$, \pm desviación estándar)

4.3 Recubrir y caracterizar NPs de óxido de hierro con polímeros de carga complementaria.

Debido a que las NPs de 12 nm (elegidas previamente por su mayor potencial para liberar calor) presentan potencial zeta positivo ($\geq 40\text{ mV}$), es necesario recubrirlas e invertir su carga superficial para hacerlas compatibles iónicamente con el resto de los componentes de la formulación micrométrica (microgel), como

el alginato de sodio y las nanoemulsiones que presentan carga negativa (se utilizan nanoemulsiones con el fin de nanovehiculizar una molécula lipofílica modelo). Para ello se seleccionaron los polisacáridos aniónicos alginato de sodio, carragenina lambda y sulfobutil β -ciclodextrina, que son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica. La razón de polímero ensayada en este trabajo va desde 0 hasta 1 miligramo por cada miligramo de NPs.

Como observamos en la figura 14, los valores de potencial zeta de las NPs incubadas con los distintos polianiones van desde leves apantallamientos hasta la inversión completa de la carga superficial, a medida que aumenta la concentración del polianión utilizado. Es interesante destacar que cuando utilizamos concentraciones de polímeros de 0,067mg por cada mg de NPs, se aprecia la presencia de precipitados debido a la neutralización de las cargas superficiales (potenciales zeta de partícula cercanos a 0 mV) y la consecuente incapacidad de las NPs para repelerse y mantenerse en suspensión.

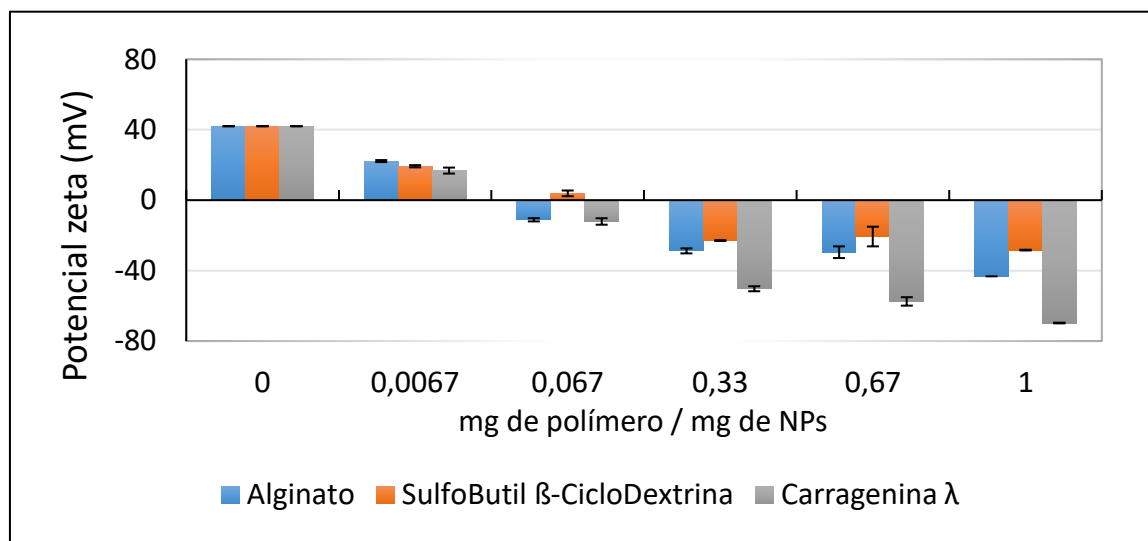


Figura 14. Potencial zeta de las NPs de óxido de hierro de 12 nm recubiertas con los distintos polianiones en concentraciones crecientes. ($n=3$, \pm desviación estándar)

Adicionalmente hemos observado, en todos los casos, un aumento del diámetro hidrodinámico de las NPs de óxido de hierro (≥ 150 nm) al añadir los polianiones.

Esto confirma la presencia de los polímeros en la superficie de las partículas (ver fig. 15).

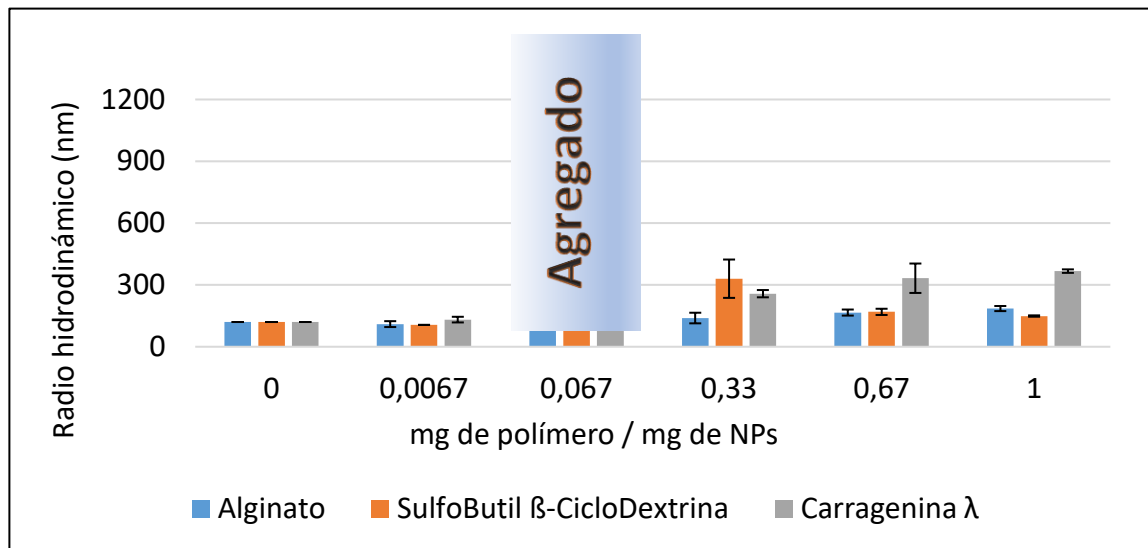


Figura 15. Tamaño de las NPs óxido de hierro de 12 nm recubiertas por los distintos polianiones. ($n=3 \pm$ desviación estándar)

Cabe destacar que, en los experimentos descritos de aquí en adelante, se utilizaron NPs óxido de hierro (magnetita) de 12 nm recubiertas con alginato en razón 0,67/1 (masa/masa), ya que poseen un radio hidrodinámico de 165 nm y potencial zeta de -30 mV. Se hará referencia a estas partículas como “**NPF_{Fe-alg}**”.

4.4 Encapsular nanopartículas de óxido de hierro, junto a un analito de interés, en microgeles de alginato.

Nuestra estrategia para coencapsular el analito vehiculizado y las NPs que liberan calor fue la inclusión de éstos sistemas en microgeles de alginato de calcio formados por la gelificación iónica al gotear/asperjar alginato de sodio sobre una solución de cloruro de calcio (*dripping*).

En busca de una formulación final (microsistemas conteniendo nanosistemas) estable y reproducible, se probaron distintas condiciones para generar una gota

esférica y homogénea que contenga todos los constituyentes seleccionados (polímero gelificante, NPFe-alg y nanoemulsiones con analito de interés) y que mantenga esta forma cuando interaccione con el agente reticulante (calcio) de modo de formar un microgel²⁸.

4.4.1 Seleccionar y vehicular un analito de interés para su inclusión en microgeles.

Los analitos de interés en esta investigación (colorantes lipofílicos de bajo peso molecular) presentan características similares a moléculas de uso farmacéutico y que tienen una baja solubilidad en medio acuoso. En particular, se seleccionó astaxantina (ver fig. 16, PM: 596,8 g/mol y logP: 8,16) pues posee propiedades fisicoquímicas similares a fármacos antineoplásicos como paclitaxel, docetaxel dactinomicina, etopósido y metotrexato, entre otros.

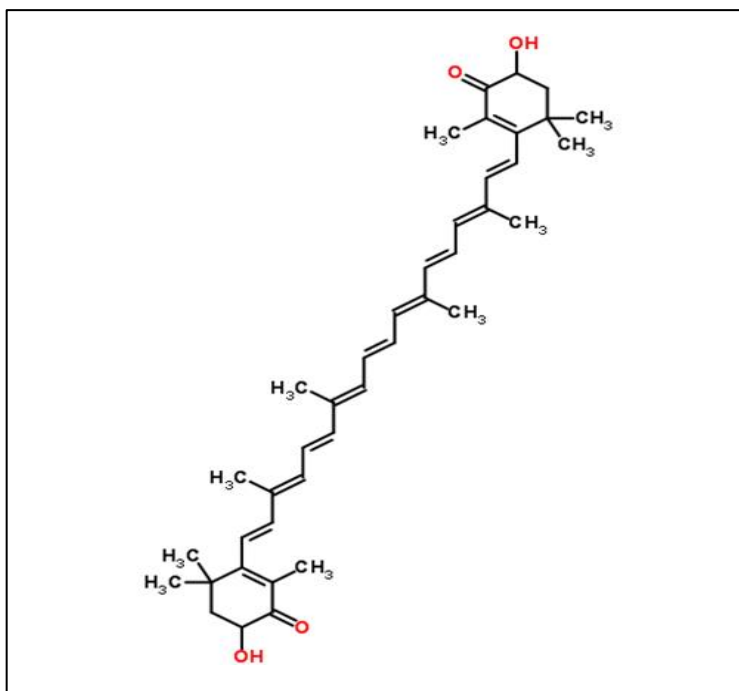


Figura 16. Representación gráfica del analito de interés (astaxantina) vehicularizado en nanoemulsiones.

Considerando que no es posible que la molécula lipofílica astaxantina se disuelva/disperse adecuadamente en el medio acuoso de formación del microgel (debe estar homogéneamente distribuida en este medio para que haya uniformidad de dosificación), hemos propuesto su inclusión en el núcleo oleoso de una nanoemulsión O/W, permitiendo así una adecuada distribución de la molécula en el medio acuoso. Las nanoemulsiones desarrolladas y que contienen astaxantina poseen un diámetro hidrodinámico de 228 ± 16 nm y un índice de polidispersidad de $0,21 \pm 0,02$. Las formulaciones tienen valor de carga superficial (potencial zeta) suficiente para mantenerse estables en suspensión (-44 ± 4 mV).

4.4.2 Elaborar microgeles de alginato de calcio coencapsulando nanoemulsiones cargadas con analito de interés y NPs de óxido de hierro.

Considerando que uno de los objetivos de esta investigación es co-encapsular dos nanoestructuras como son NPs de óxido de hierro (NPFe-alg, recubiertas con alginato) y nanoemulsiones de núcleo oleoso, es necesario crear una formulación (en este caso una microformulación) donde todos los componentes sean compatibles. Por un lado, las nanoestructuras (NPFe-alg y nanoemulsiones con astaxantina) ya presentan carga superficial negativa, lo que hace que el medio de formación de los microgeles (alginato, NPs de hierro y nanoemulsiones con astaxantina) sea compatible pues los componentes serían capaces de repelerse iónicamente, asegurando la estabilidad/homogeneidad de la formulación.

Por otro lado, también es importante considerar el pH al cual son estables las NPFe-alg utilizadas. La literatura demuestra que las nanopartículas de hierro, sintetizadas por coprecipitación, presentan mayor estabilidad a pHs ácidos¹⁸. Considerando esto, la estrategia utilizada consistió en ajustar a pHs ácidos la solución del polímero gelificante (que es el componente mayoritario de la formulación), para ello se evaluó la solubilidad del alginato de sodio al 2% a

distintos valores de pH (ver figura 17). Es importante destacar que a valores inferiores a pH 3, no se aprecia una adecuada disolución del polímero. Adicionalmente, se evaluó de manera preliminar la capacidad de las soluciones presentadas en la figura 17 para formar microgeles, la que se mantuvo intacta. A pH's inferiores, se observan estructuras aglomeradas y no esféricas (imágenes no mostradas), lo que haría inviable su posterior utilización. Es importante destacar que las nanoemulsiones son estables en un amplio rango de pH, por lo que no se ajustó el pH de éstas.

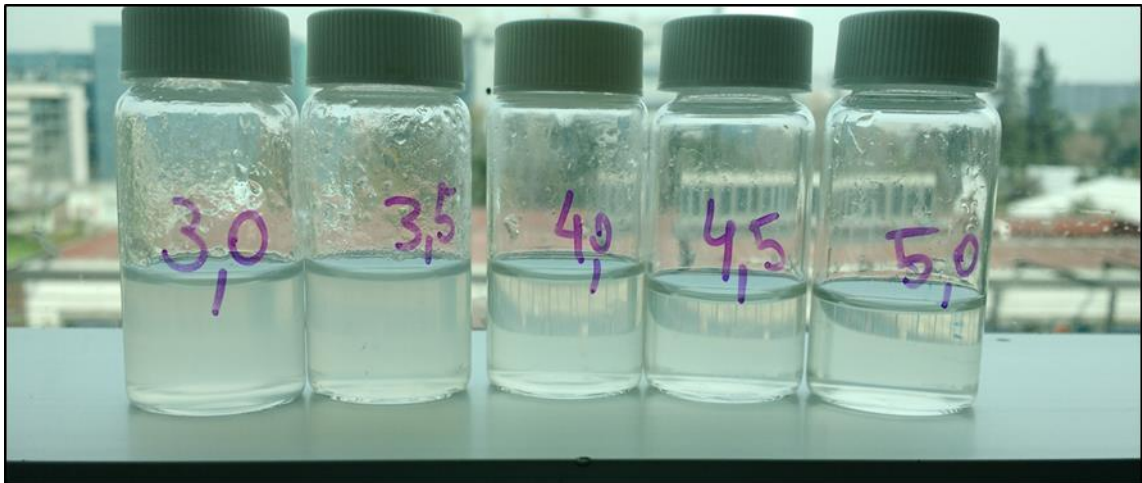


Figura 17. Soluciones de alginato de sodio ajustadas a distintos valores de pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5 y 5,0).

4.4.2.1 Elaboración automatizada de microgeles.

Se elaboraron microgeles utilizando el microencapsulador *Microencapsulator B-395 Pro* (Büchi, Suiza). Se clasificó a los microgeles elaborados en lotes de acuerdo al diámetro de la boquilla (*nozzle*) usado para generar el goteo/aspersión (**150 μm , 300 μm y 450 μm**).

Al realizar las formulaciones preliminares de microgeles por el método automatizado, surgió un problema con las nanopartículas de hierro debido a que, acoplado al sistema de flujo del equipo, se encuentra un material piezoeléctrico

(imán de neodimio inserto en la membrana por la que fluye la suspensión de goteo) encargado de proveer de vibración al sistema durante la aspersion de la solución de goteo. Esta pieza, debido a su capacidad magnética, atrapa un gran porcentaje de las NPs de hierro. Para resolver este problema, se cambió la base del material piezoeléctrico original, como se muestra en la figura 18, por una base de duraluminio (no presenta magnetismo) hecha a la medida.

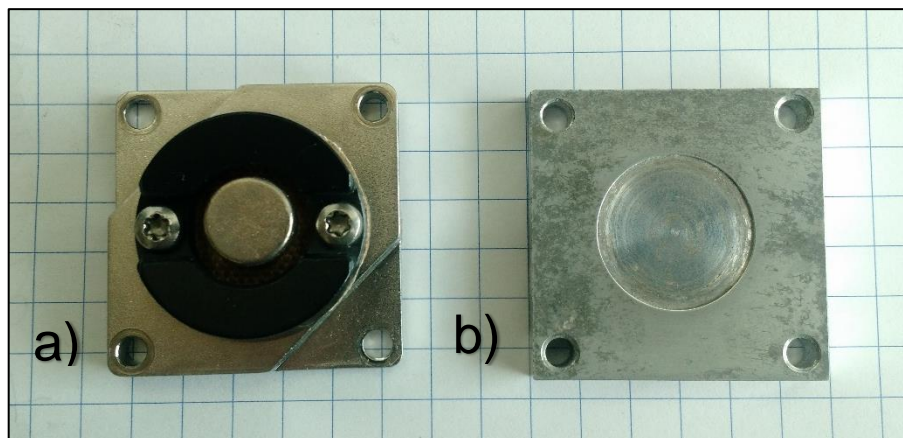


Figura 18. a) base del material piezoeléctrico del micro encapsulador “*Encapsulador PRO 395* (Büchi)”; b) pieza de reemplazo (sin magnetización) fabricada en el taller del Laboratorio de Superficies (FCFM, U. de Chile).

Una vez superado este inconveniente, se prosiguió con la elaboración de los microgeles. Un aspecto importante de éstas formulaciones es que se pudo transferir las propiedades de los nanosistemas a los microgeles. Por ejemplo, ahora los microgeles presentan magnetización, al igual que lo hacen las nanopartículas magnéticas por si solas (fig. 19A-19B). Además, adoptan el color anaranjado de las nanoemulsiones de astaxantina (fig. 19C-19D).

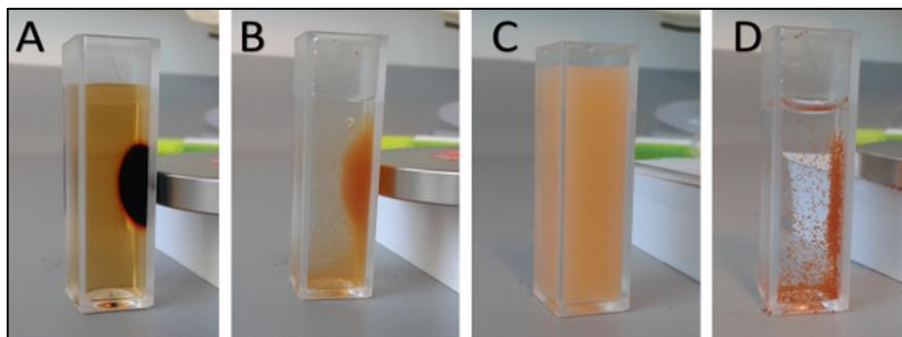


Figura 19. A) nanopartículas de hierro estimuladas con un imán, B) microgeles con nanopartículas de hierro estimuladas con un imán C) nanoemulsiones con astaxantina; y, D) microgeles conteniendo nanopartículas magnéticas y nanoemulsiones con astaxantina, estimuladas con un imán.

El tamaño de los microgeles resultantes se presenta en la tabla 3. Al observar el histograma de distribución de tamaños, notamos que la dispersión de tamaño aumenta a medida que crece el tamaño del *nozzle*. Esto podría deberse a que la formación de las gotas no fue regular y por tanto la aspersion sobre la solución reticulante generó microgeles de tamaños dispersos. Como se puede apreciar en la figura 20, la morfología de los microgeles es esferoide (ver fig. 20).

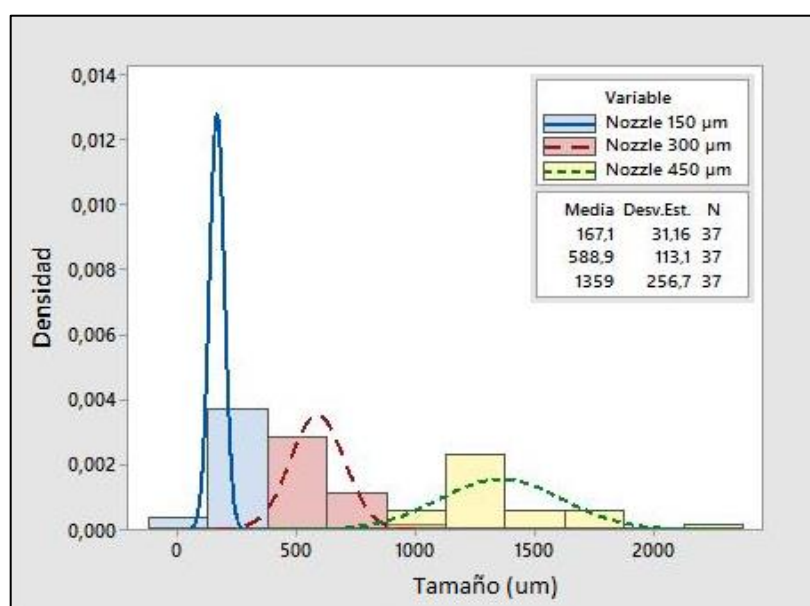


Tabla 3. Tamaño promedio de microgeles, generados por distintos nozzles, analizados por microscopía óptica.

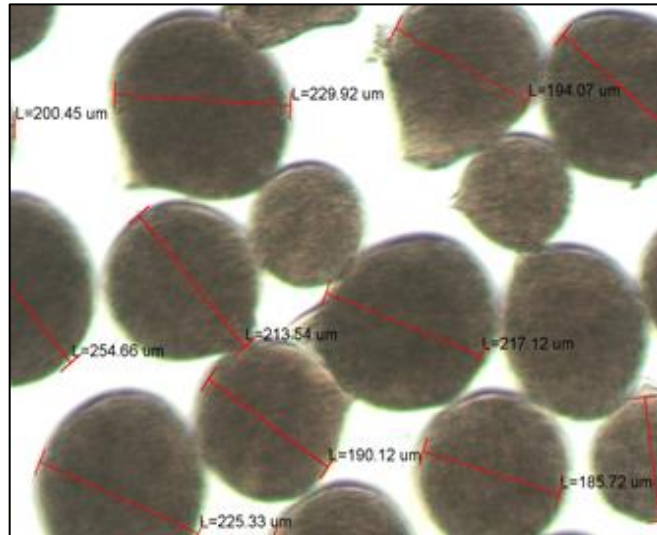


Figura 20. Fotografía de microgeles, generados por el *nozzle* de 150 µm, utilizando microscopía óptica (4X).

4.4.2.2 Elaboración manual de microgeles.

Se elaboraron microgeles por el método manual utilizando una jeringa de 10 mL con aguja 27G (procedimiento descrito en el punto **3.2.4.2.1**, síntesis manual) para gotear una suspensión compuesta por. Se realizó el goteo de esta suspensión sobre una solución de cloruro de calcio al 2% (gelificación iónica) y sobre una solución de quitosano al 0,5% (coacervación). Luego, estos sistemas fueron sometidos a liofilización durante 48 horas. El objetivo de la liofilización fue obtener una formulación que se pueda masar y de esa manera poder hacer experimentos con certeza analítica (es muy complicado uniformar la cantidad de microgeles a evaluar cuando estos están hidratados). Para evaluar la reconstitución de la formulación liofilizada, se masó 30 mg de microgeles liofilizados y se resuspendieron en 1 mL de agua desionizada durante 8 horas. Los tamaños de microgeles fueron medidos con un micrómetro. Como se puede apreciar en la figura 21, el tamaño varía según las condiciones de hidratación,

disminuyendo éste luego de extraer el agua mediante liofilización, y aumentando al rehidratarse, sin alcanzar el tamaño original.

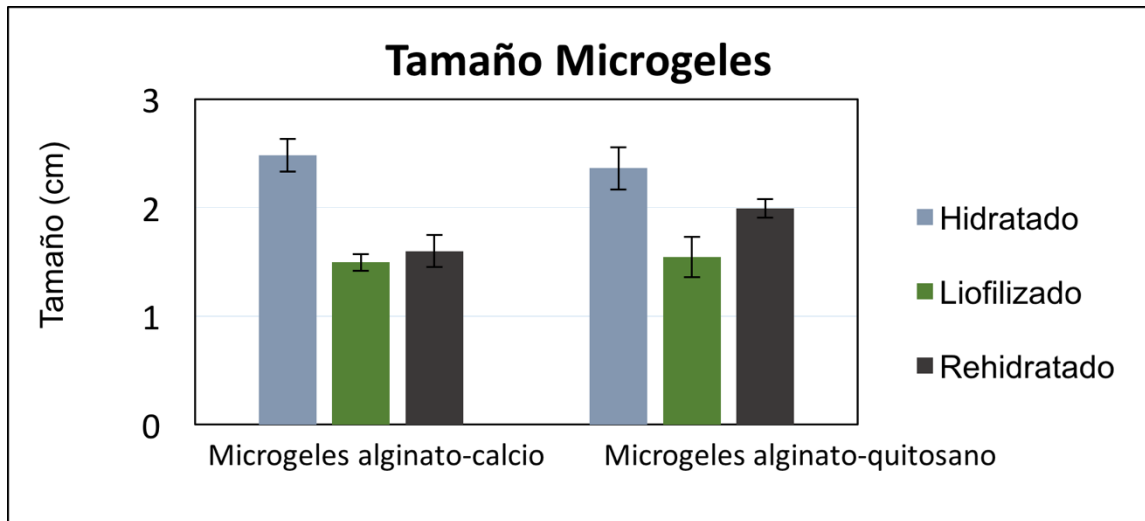


Figura 21. Medición de tamaño (micrómetro) de los microgeles al ser elaborados (hidratados), liofilizados y rehidratados ($n = 10 \pm$ desviación estándar)

Para conocer las características superficiales de los microgeles elaborados, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) a los microgeles elaborados manualmente (goteados sobre cloruro de calcio y sobre quitosano). La preparación para las muestras consistió en congelar y liofilizar los microgeles, y luego fueron sometidos a pulverización catódica de oro (*sputtering*). Como podemos observar en la figura 22, los microgeles luego de ser liofilizados pierden la esfericidad, pero no se desintegran.

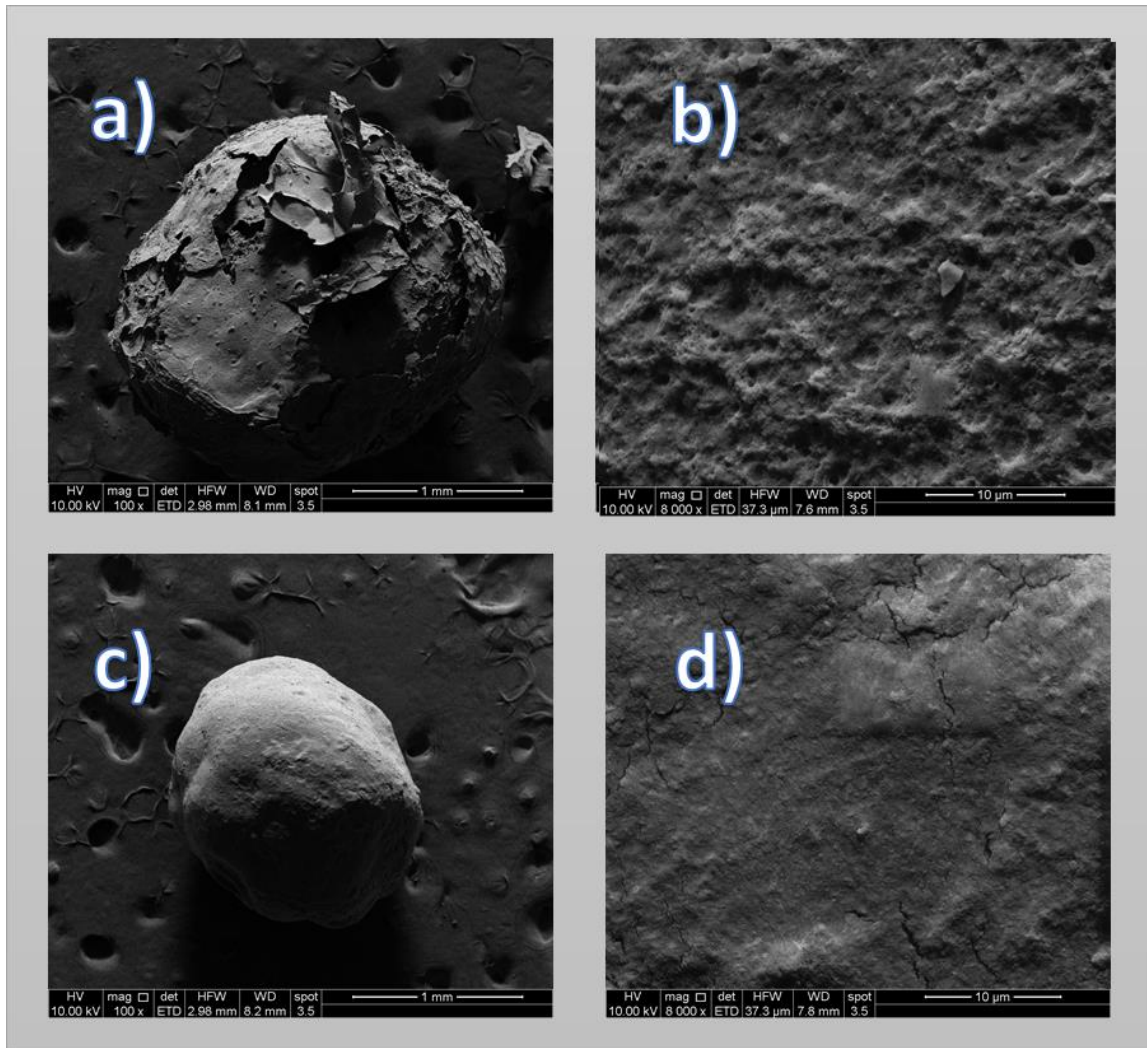


Figura 22. Imágenes de microscopía SEM a las formulaciones liofilizadas: a) microgel de alginato-quitosano (100x); b) superficie microgel alginato-quitosano (8000x); c) microgel de alginato de calcio (100x); y d) superficie microgel alginato de calcio (8000x).

Es interesante destacar que aprecia una diferencia significativa en la rugosidad de las dos formulaciones. En el caso del microgel de alginato–quitosano, se aprecia mayor rugosidad y/o una incapacidad de la capa de oro para adherirse a la superficie (ver fig. 22b), a diferencia del sistema alginato–calcio que se aprecia más liso (ver fig. 22d).

4.5 Exponer las microformulaciones a diversos estímulos magnéticos, y evaluar la respuesta en términos de generación de calor, liberación de nanosistemas y movilidad.

Para evaluar el efecto de los estímulos magnéticos a las NPs microencapsuladas se realizaron tres experiencias. La primera consistió en exponer a un **campo magnético oscilante** a los microgeles (elaboración manual) que contienen NPFe-alg y simultáneamente medir la variación de temperatura de la muestra (por termografía, método previamente descrito). En la segunda experiencia, se utilizaron microgeles que contienen NPFe-alg y astaxantina (elaboración automatizada) expuestos a un **campo magnético oscilante** en donde se midió la concentración de astaxantina liberada al medio para conocer su comportamiento e investigar sus posibles usos como sistema de liberación (tal como han descrito algunos autores^{29,30}). Finalmente, en la tercera experiencia utilizamos un imán (**campo magnético fijo**) observando el movimiento de los microgeles al interactuar con el estímulo. Las distintas experiencias se detallan a continuación:

4.5.1 Exponer las microformulaciones a un campo magnético oscilante y evaluar la generación de calor.

Para realizar este experimento se utilizaron los microgeles preparados manualmente. Para generar el campo magnético, se utilizó el prototipo de oscilador mostrado anteriormente en la sección 4.1. El ensayo se realizó bajo las condiciones de irradiación descritas en la sección 3.2.2 (ubicación de la muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL en el centro de la espira conductora y medición de la temperatura mediante termografía infrarroja) y se registra el aumento de temperatura durante la aplicación del estímulo magnético por 20 minutos.

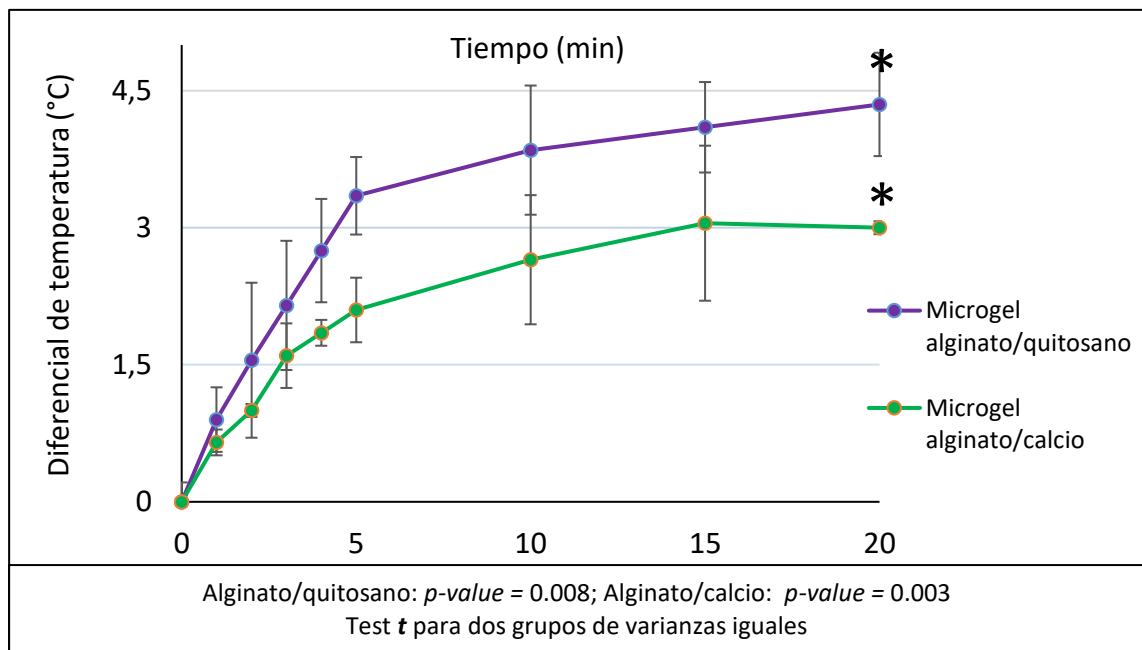


Figura 23. Comparación del aumento de temperatura generado por el estímulo magnético sobre las formulaciones de microgeles expuestas al campo oscilante. (*: presenta las diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas y el control de agua sometido al mismo estímulo) ($n=3 \pm$ desviación estándar)

En la figura 23 se aprecia un aumento significativo de la temperatura final alcanzada tras estimular la muestra que contiene las formulaciones (la línea base, es decir 0 grados de aumento, corresponde a una muestra que contiene agua expuesta al mismo estímulo). Además, se puede observar que la formulación alginato/quitosano alcanza una temperatura más alta en todos los tiempos de

medición, pero la diferencia no es significativa respecto a la formulación alginato/calcio ($p\text{-value} \geq 0,05$; *Test t* para dos grupos de varianzas iguales).

4.5.2 Exponer las microformulaciones a un campo magnético oscilante y evaluar de la liberación de nanosistemas.

En esta experiencia se utilizaron microgeles de alginato de calcio que contienen NPFe-alg y astaxantina vehiculizada en nanoemulsiones. Se seleccionaron estas formulaciones pues, como se demostró en el punto anterior, son las que presentan un mayor aumento de temperatura producto de la exposición al campo magnético oscilante. Los microgeles fueron elaborados de forma automatizada (utilizando *nozzles* de diámetro interno de 150, 300 y 450 μm). Las microformulaciones fueron liofilizadas y luego 30 mg de microgeles fueron resuspendidos en 1.5 mL de agua desionizada e irradiados con el campo magnético de 100 kHz por un periodo de 90 minutos. En la figura 24 se analiza la astaxantina liberada. Es importante recalcar que la astaxantina, presumiblemente, se liberaría al medio acuoso en su forma de nanoemulsión. Por ende, mezclamos la alícuota de sobrenadante a analizar con acetona, de modo de disolver la eventual astaxantina libre en el medio, y la contenida en las nanoemulsiones, obteniendo así cantidad total de astaxantina liberada.

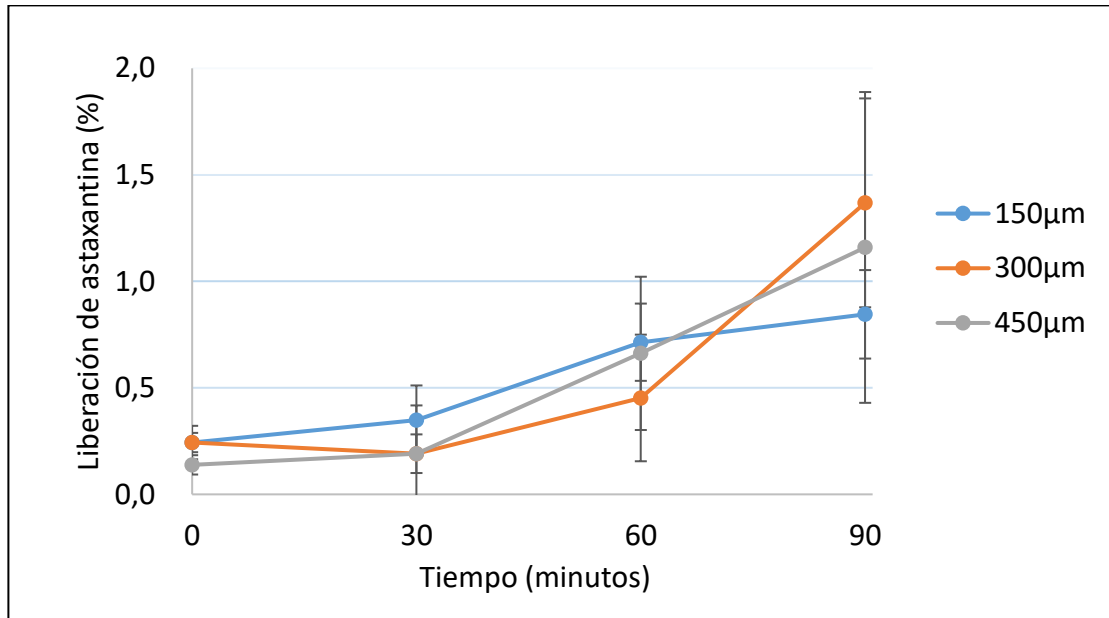


Figura 24. Liberación de astaxantina desde los microgeles de distintos tamaños, al someter las formulaciones al estímulo magnético oscilante durante 90 minutos. ($n=3 \pm$ desviación estándar)

Como se puede apreciar en la figura 24, la liberación del analito es muy baja, alcanzando un máximo de liberación del 1.5% luego de aplicar el estímulo durante 90 min. La escasa liberación del analito, se explicaría debido a un atrapamiento muy eficiente de las nanoemulsiones (O/W) en el interior de los microsistemas y una escasa/nula difusión hacia el medio. Los microgeles, en las condiciones ensayadas, no se verían alterados como para cambiar significativamente su conformación y permitir la liberación de las nanoemulsiones. El alginato no es inherentemente termo-sensible³¹ y ha sido reportado en la literatura que los microgeles de alginato de calcio no alteran su conformación entre los 20 °C y los 40 °C³² lo que puede ser modificado si el polímero es potenciado con otro polímero sensible a la temperatura. Algunas alternativas propuestas por algunos autores para mejorar la sensibilidad a la temperatura es co-polimerizar el alginato con derivados de la acrilamida³³ o mezclarlo con polipéptidos similares a la elastina³⁴.

4.5.3 Exponer las microformulaciones a un campo magnético fijo y evaluar su movilidad.

El estímulo con imán se probó con tres microformulaciones de distinto tamaño que contienen NPFe-alg y nanoemulsiones de astaxantina (microformulaciones elaboradas automatizadamente con *nozzle* de diámetro interno de 150, 300 y 450 μm). El estímulo consistió en acercar un imán a una celda en donde los microgeles se encuentran sumergidos en agua.

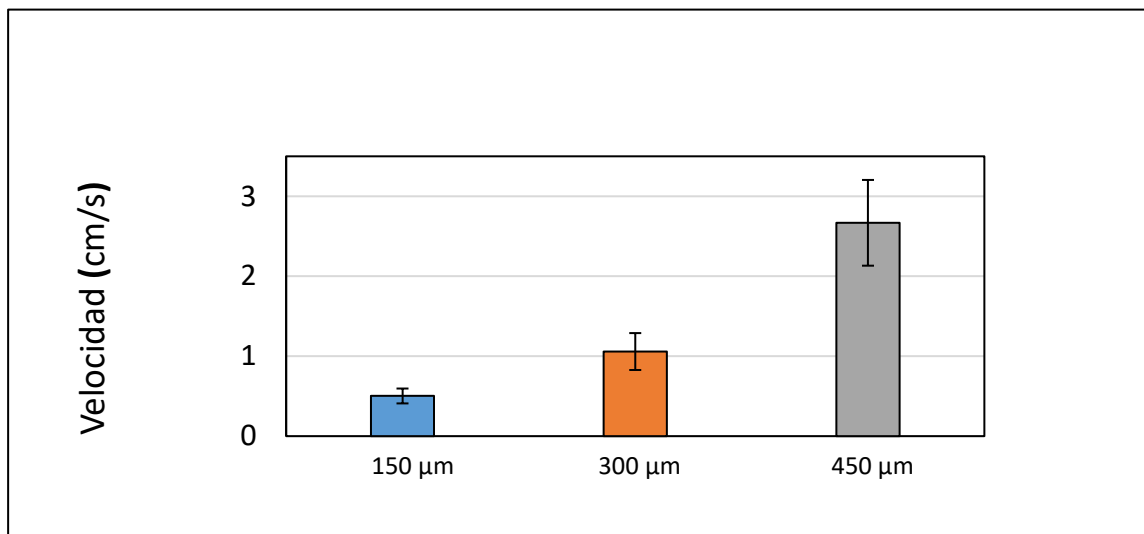


Figura 25. Cuantificación de la velocidad con la que se desplazan los microgeles dentro de la celda al ser atraídos por un imán. ($n=3 \pm$ desviación estándar)

De acuerdo a lo apreciado en la figura 25, existe una diferencia marcada entre la velocidad de movilización de los microgeles; son los de mayor tamaño, quienes adquieren mayor velocidad. Considerando que las formulaciones tienen igual composición cualitativa, este fenómeno se podría explicar debido a la diferencia de la razón entre superficie expuesta y masa de la formulación, que en los microgeles de menor tamaño se ve aumentada, porque existe mayor roce con el agua y mayor resistencia al movimiento. En cambio, los microgeles de mayor tamaño esta relación es menor, haciéndolos más reactivos al estímulo.

4.6 Exponer las microformulaciones a estímulos térmicos y mecánicos y evaluar la estabilidad de la formulación .

Para esta experiencia se utilizaron las microformulaciones de alginato de calcio conteniendo NPFe-alg y nanoemulsiones con astaxantina, preparados por el método de *dripping* de manera automatizada con *nozzle* de 150, 300 y 450 μm . Luego de congelar y liofilizar los distintos lotes de microgeles, se masaron 30 mg y se resuspendieron en 10 mL de agua desionizada para luego ser incubados durante 3 horas (60 °C y 150 RPM) y se procedió a cuantificar el hierro y la astaxantina contenida en los microsistemas (se cuantificó los analitos liberados y, por balance de masas, se obtuvo el porcentaje de retención).

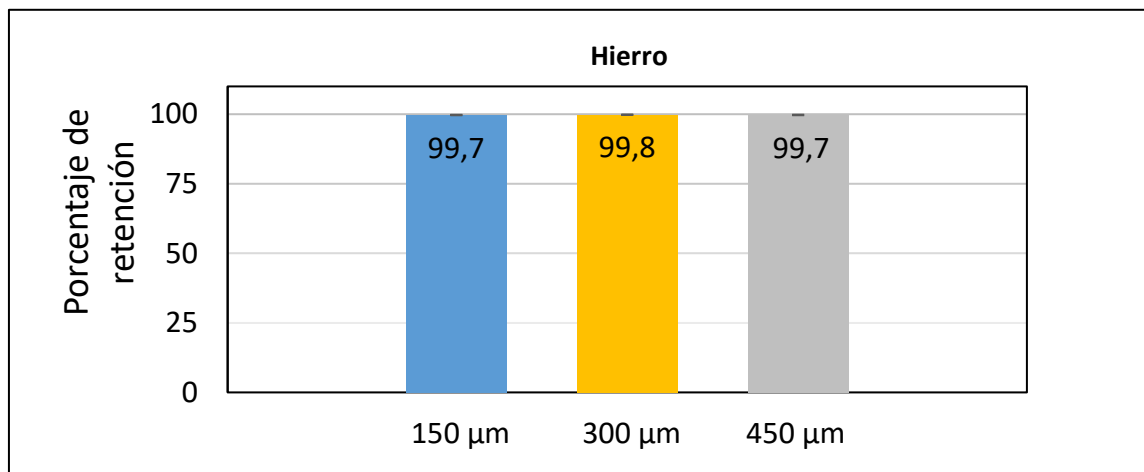


Figura 26. Retención de hierro en los microgeles de alginato de calcio luego de ser incubados a durante 3 horas (60 °C y 150 RPM). ($n=3 \pm$ desviación estándar)

Como se puede apreciar en la figura 26, el atrapamiento de hierro en todas las formulaciones fue superior al 99%. Es interesante destacar que los microgeles, en todos los casos, mantenían su forma.

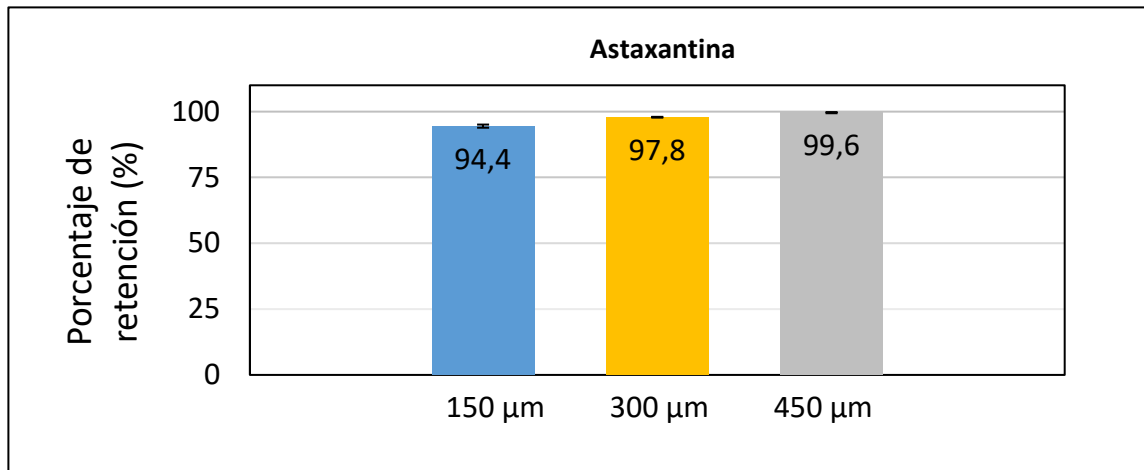


Figura 27. Retención de astaxantina dentro de los microgeles de alginato de calcio luego de ser incubados (60 °C y 150 RPM) durante 3 horas. ($n=3 \pm$ desviación estándar)

De manera similar a los experimentos de retención con hierro, el atrapamiento de la astaxantina también fue alto (superior al 90%). En este caso, se aprecia que la mayor liberación de astaxantina se observa en la formulación de menor tamaño (fig. 27), lo que se podría explicar porque estos sistemas poseen una mayor área superficial en contacto con el medio y presumiblemente, las nanoestructuras ubicadas cercanas a la interfase microgel/agua, serían las primeras en difundir. La energía térmica y mecánica aportada a los microsistemas en ambos experimentos, no fue suficiente para promover una alta liberación de las nanopartículas.

5 Conclusiones y discusión final

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

Se desarrolló el equipamiento necesario para generar un campo magnético oscilante capaz de generar una respuesta térmica en las NPs de óxido de hierro. El equipamiento es de bajo costo, de fácil armado y mantención, y tiene un bajo consumo de energía.

Existe liberación de calor por parte de nanopartículas de óxido de hierro, aplicando el campo magnético oscilante desarrollado, y es cuantificable en condiciones experimentales utilizando una cámara termográfica. La liberación de calor sigue ocurriendo al recubrir las NPs con polímeros. Además, este fenómeno se continúa apreciando al vehiculizar las NPs recubiertas en los microgeles sin que esto promueva una liberación significativa de astaxantina al medio acuoso (cuando se coencapsula astaxantina en el microgel).

Las microformulaciones son reactivas, en medio acuoso, a la presencia de un imán en la cercanía de éstas. Las formulaciones de mayor tamaño son las que se movilizan a mayor velocidad hacia el imán.

En el rango de temperatura estudiado (20 - 60 °C) y aplicando agitación (150 RPM), la liberación del analito de interés (astaxantina) es mínima, debido presumiblemente a que el alginato de calcio no presenta cambios significativos a estas temperaturas y también a que la formulación es muy estable.

Una proyección de estos resultados, y enfocándonos hacia la utilización de estas formulaciones para la liberación controlada de los analitos lipofílicos producto de la aplicación de un campo magnético alterno, debería contemplar el uso de polímeros termosensibles para generar un cambio estructural en la matriz a una temperatura superior a la temperatura corporal (36,5°C) pero inferior a una temperatura que genere daño celular (~42°C). También es importante destacar que, el hecho de que las NPs de óxido de hierro no varíen luego de ser irradiadas,

y que los microgeles también mantengan su estabilidad estructural ante este estímulo, se podría utilizar estas formulaciones repetidamente para liberar el analito de interés. Estas características permitirían generar un sistema de liberación pulsátil de moléculas de alta toxicidad y que requieran bajas liberaciones de fármacos, pero muy repetitivas en el tiempo.

6 Referencias

- 1) Debbage, P. (2009). Targeted Drugs and Nanomedicine: Present and Future. *CPD*, 15(2), 153-172. <http://dx.doi.org/10.2174/138161209787002870>
- 2) Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions On Magnetics*, 17(2), 1247-1248. <http://dx.doi.org/10.1109/tmag.1981.1061188>
- 3) Hanuš, J., Ullrich, M., Dohnal, J., Singh, M., & Štěpánek, F. (2013). Remotely Controlled Diffusion from Magnetic Liposome Microgels. *Langmuir*, 29(13), 4381-4387. <http://dx.doi.org/10.1021/la4000318>
- 4) Finotelli, P., Da Silva, D., Sola-Penna, M., Rossi, A., Farina, M., Andrade, L., Takeuchi, A. and Rocha-Leão, M. (2010). Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), pp.206-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.008>
- 5) Vinogradov, S. (2006). Colloidal Microgels in Drug Delivery Applications. *CPD*, 12(36), 4703-4712. <http://dx.doi.org/10.2174/138161206779026254>
- 6) Lyer, S., Singh, R., Tietze, R., & Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticles for magnetic drug targeting. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 60(5). <http://dx.doi.org/10.1515/bmt-2015-0049>
- 7) Bhattacharya, S., Eckert, F., Boyko, V. and Pich, A. (2007). Temperature-, pH-, and Magnetic-Field-Sensitive Hybrid Microgels. *Small*, 3(4), pp.650-657. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.200600590>
- 8) Tietze, R., Lyer, S., Dürr, S., & Alexiou, C. (2012). Nanoparticles for cancer therapy using magnetic forces. *Nanomedicine*, 7(3), 447-457. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.12.10>
- 9) Berry, C. and Curtis, A. (2003). Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), pp. R198-R206. <http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/36/13/203>

- 10) Deatsch, A. and Evans, B. (2014). Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 354, pp.163-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.11.006>
- 11) Atkinson, W., Brezovich, I., & Chakraborty, D. (1984). Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, BME-31(1), 70-75. <http://dx.doi.org/10.1109/tbme.1984.325372>
- 12) Stefani, M. & Dobson, C. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal Of Molecular Medicine*, 81(11), 678-699. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>
- 13) Zhu, Q., Jia, L., Gao, Z., Wang, C., Jiang, H., Zhang, J., & Dong, L. (2014). A Tumor Environment Responsive Doxorubicin-Loaded Nanoparticle for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Pharmaceutics*, 11(10), 3269-3278. <http://dx.doi.org/10.1021/mp4007776>
- 14) Liu, Y. (2016). Figure 6: Optimized egg-box and asymmetric egg-box-like structures within hybrid hydrogel via the B3LYP method and the corresponding schematic drawing of calcium coordination of the different structures.: Scientific Reports. Nature.com. Retrieved 24 November 2016, from <http://www.nature.com/articles/srep29858/figures/6>
- 15) Saunders, B., Laajam, N., Daly, E., Teow, S., Hu, X., & Stepto, R. (2016). *Microgels: From responsive polymer colloids to biomaterials*.
- 16) Zhang, W. & He, X. (2009). Encapsulation of Living Cells in Small (~100 μm) Alginate Microcapsules by Electrostatic Spraying: A Parametric Study. *Journal Of Biomechanical Engineering*, 131(7), 074515. <http://dx.doi.org/10.1115/1.3153326>
- 17) Sung, B., Shaffer, S., Sittek, M., Alboslemy, T., Kim, C., & Kim, M. (2016). Alternating Magnetic Field-Responsive Hybrid Gelatin Microgels for Controlled Drug Release. *Journal Of Visualized Experiments*, (108). <http://dx.doi.org/10.3791/53680>

- 18)Costo, R., Bello, V., Robic, C., Port, M., Marco, J., Puerto Morales, M., & Veintemillas-Verdaguer, S. (2012). Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: Improving the Colloidal and Magnetic Properties. *Langmuir*, 28(1), 178-185. <http://dx.doi.org/10.1021/la203428z>
- 19)Acid Algin G 2; Alginate 8; Alginate LV;Cecalgum S 500;Duckacid X2787;Grindsted PH 060;Inagel GS 30;Kelacid;Kimica Acid;Kimica Aci... dictionary - Guidechem.com. (2016). Guidechem.com. Retrieved 24 November 2016, from <http://www.guidechem.com/dictionary/9005-32-7.html>
- 20)SBE- β -CD|Sulfobutylether- β -Cyclodextrin|CAS 182410-00-0 Buy SBE- β -CD from supplier medchemexpress.com. (2014). Medchemexpress.com. Retrieved 24 November 2016, from https://www.medchemexpress.com/sbe-beta_cd.html
- 21)Molecular Structure of Carrageenan (Lambda Form). Carrageenans Are Widely Used in The Food Industry, Thickening, And Stabilizing Of Food. Stock Photo 284472344: Shutterstock. (2014). Shutterstock.com. Retrieved 24 November 2016, from <http://www.shutterstock.com/pic-284472344/stock-photo-molecular-structure-of-carrageenan-lambda-form-carrageenans-are-widely-used-in-the-food-industry.html>
- 22)Wong, J., Krishnakumar Gaharwar, A., Müller-Schulte, D., Bahadur, D., & Richtering, W. (2007). Layer-by-layer assembly of a magnetic nanoparticle shell on a thermoresponsive microgel core. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1), 219-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1201>
- 23)Fuenzalida JP, Flores ME, M3niz I, Feijoo M, Goycoolea F, Nishide H, Moreno-Villoslada I. Immobilization of hydrophilic low molecular-weight molecules in nanoparticles of chitosan/poly (sodium 4-styrenesulfonate) assisted by aromatic-aromatic interactions. *J Phys Chem B*. 2014;118(32):9782-9791.

- 24) Lozano MV, Torrecilla D, Torres D, Vidal A, Dominguez F, Alonso MJ. Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: docetaxel-loaded chitosan oligomer colloidal carriers. *Biomacromolecules*. 2008;9(8):2186-2193.
- 25) Lozano MV, Esteban H, Brea J, Loza MI, Torres D, Alonso MJ. Intracellular delivery of docetaxel using free-dried polysaccharide nanocapsules. *Journal of Microencapsulation*. 2012;30(2):181-188.
- 26) Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. *Frontiers in Microbiology*, 7, 494. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00494>
- 27) Müller, R., Dutz, S., Neeb, A., Cato, A., & Zeisberger, M. (2013). Magnetic heating effect of nanoparticles with different sizes and size distributions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 328, 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2012.09.064>
- 28) Hu, Y., Wang, Q., Wang, J., Zhu, J., Wang, H., & Yang, Y. (2012). Shape controllable microgel particles prepared by microfluidic combining external ionic crosslinking. *Biomicrofluidics*, 6(2), 026502. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4720396>
- 29) Kashevsky, B., Kashevsky, S., Korenkov, V., Istomin, Y., Terpinskaya, T., & Ulashchik, V. (2015). Magnetic hyperthermia with hard-magnetic nanoparticles. *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*, 380, 335-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.109>
- 30) Ramos, M. y Castillo C. (2011), "Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas", *ide@s CONCYTEG*, 6 (72), pp. 629 – 646.
- 31) Lee, K. and Mooney, D. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), pp.106-126.
- 32) Goh, C., Heng, P., & Chan, L. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12.

- 33) Wong, J., Gaharwar, A., Müller-Schulte, D., Bahadur, D., & Richtering, W. (2008). Dual-stimuli responsive PNIPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: Magnetic and thermoresponsive. *Journal of Colloid and Interface Science*, 324(1-2), 47-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.024>
- 34) Matsukuma, D. and Otsuka, H. (2015). Thermoresponsive Reversible Phase-transition of Alginate-based Semi-IPN Gel through Self-assembly of Interpenetrated Elastin-like Polypeptide. *Chemistry Letters*, 44(1), pp.26-28.