



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Medición dinámica de liberación de fármacos en ferrogel mediante hipertermia magnética

Autora:

María José Domingo Gracia

Director:

Gerardo F. Goya Rossetti

Codirectora:

Beatriz Sanz Sagué

Junio 2017



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

Índice

Abreviaturas utilizadas.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Nanociencia y nanotecnología.....	2
1.2. Partículas magnéticas: el Fe_3O_4 (Magnetita).....	2
1.3. Uso de campos magnéticos para calentamiento.....	3
1.4. Teoría de la absorción de potencia.....	4
1.5. Teoría de separación magnética.....	6
1.6. Mecanismo de la liberación remota por campos magnéticos.....	7
2. Objetivos.....	8
3. Caracterización fisicoquímica.....	9
3.1. Determinación de la concentración de las MNPs.....	9
3.2. Separación magnética y mecánica.....	10
a. Diseño y eficiencia del separador magnético.....	10
b. Filtro para la separación física.....	11
3.3. Distribución de tamaños de las partículas empleadas.....	12
3.4. Determinación del radio hidrodinámico.....	13
3.5. Medidas de la absorción de potencia específica.....	14
3.6. Ciclo de histéresis, campo coercitivo y magnetización.....	16
3.7. Componentes químicos de las muestras.....	17
3.8. Caracterización del ferrogel.....	17
3.9. Medida del SPA del ferrogel.....	18
4. Experimento de liberación.....	19
4.1.1. Liberación del fármaco.....	20
4.1.2. Liberación espontánea.....	20
4.1.3. Liberación dinámica.....	21
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía.....	24
7. Anexos.....	

Abreviaturas utilizadas.

HTM	Hipertermia magnética.
NPs	Nanopartículas. Por sus siglas en inglés, Nanoparticles.
MNPs	Nanopartículas magnéticas.
EM	Electromagnética.
K_B	Constante de Boltzmann.
FEMM	Software Finite Element Methods Magnetics. Para calcular el campo magnético en el imán.
TEM	Microscopio electrónico de transmisión. Por sus siglas en inglés, Transmission Electron Microscopy.
DM	Instrumento de medida de hipertermia magnética, serie DM100, de la compañía nB Nanoscale Biomagnetics.
DM1	Aplicador de campo para calorimetría y experimentos térmicos.
DM2	Aplicador de campo para usos múltiples. Mismo funcionamiento que el DM1 pero sin utilizar vacío.
SPA	Absorción de potencia específica. Por sus siglas en inglés, Specific Power Absorption.
LRT	Teoría de respuesta lineal, para medir la tasa de calentamiento del coloide. Por sus siglas en inglés, Linear Response Theory.
VSM	Magnetómetro de muestra vibrante. Por sus siglas en inglés, Vibrating Sample Magnetometer.
Alg	Alginato, polímero para la síntesis del ferrogel.
PNiPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida), polímero termorreversible utilizado para la síntesis del ferrogel.
LCST	Temperatura inferior de transición crítica. Por sus siglas en inglés, Low Critical Solution Temperature.
EtOH	Etanol.

1. Introducción.

1.1. Nanociencia y nanotecnología.

Este trabajo se enmarca en un ámbito de la ciencia y la tecnología que está en auge desde los últimos 30 años: la nanociencia y la nanotecnología. La nanociencia es una de las áreas de investigación más importantes de la ciencia moderna, ésta junto con la nanotecnología permite a los científicos e ingenieros trabajar en el nivel molecular y celular para producir importantes avances en las ciencias de la vida y de la salud. Ambas permiten el estudio, diseño, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales, así como la explotación de determinados fenómenos y propiedades que posee la materia a esta escala (1-100nm). [1] Las nanopartículas (NPs) son las protagonistas en estas ciencias. Son partículas con dimensiones comprendidas entre las moléculas y las estructuras microscópicas. En esta escala, las propiedades físicas de las NPs son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño macroscópico con la misma composición química. Así, la investigación del comportamiento de la materia a escala nanométrica abre una perspectiva de nuevos conocimientos y de aplicaciones en todos los campos científicos y/o tecnológicos. Pero sobre todo se usan en ciencias de la salud tanto en sistemas de diagnóstico como en administración de fármacos. [1]

1.2. Partículas magnéticas: el Fe₃O₄ (Magnetita)

Un tipo de nanopartícula que suscita gran interés son las nanopartículas magnéticas (MNPs) que pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo externo. Las MNPs están por lo general compuestas por metales de transición tales como hierro, níquel, cobalto o sus óxidos, y su formulación se realiza en forma coloidal, especialmente para sus numerosas aplicaciones en biotecnología o biomedicina. [1] Un problema intrínsecamente asociado a estas partículas es su inestabilidad coloidal debido a su tamaño, ya que tienden a formar aglomerados a fin de reducir la energía asociada con la elevada relación área superficial/volumen de estas partículas. Por este motivo en la mayoría de aplicaciones es crucial desarrollar estrategias de estabilización química para evitar la oxidación en el aire produciendo una pérdida de magnetismo. Algunas de las estrategias más utilizadas son los recubrimientos con especies orgánicas como polímeros. [1] Además, en usos biomédicos es necesario que las partículas magnéticas sean estables en agua a pH 7 y en un entorno fisiológico. La estabilidad coloidal del fluido dependerá de la carga y de la química de la superficie, que dará lugar a repulsiones coulombianas. Por último, otro factor importante a tener en cuenta, son las dimensiones de las partículas, que deben ser pequeñas para evitar o al menos minimizar la precipitación y que no tengan un tamaño mayor al de los capilares sanguíneos, para evitar posibles trombos [1]. La utilización de MNPs dentro del campo de la biomedicina viene realizándose desde la década de los 90 del S.XX. El hecho de que el hierro sea fácilmente metabolizado dentro del cuerpo, que las partículas tengan tamaños comparables al de las proteínas, células, virus y ADN, que la superficie de estas partículas pueda ser modificada a fin de unir moléculas de interés biológico, que las partículas posean un elevado momento magnético, así como que las líneas de campo puedan atravesar el cuerpo humano, hace que las partículas posean un futuro prometedor en la búsqueda de metodologías poco invasivas de asistencia al diagnóstico y tratamiento de enfermedades. [2]

La magnetita (Fe_3O_4) es, junto con el hierro metálico, uno de los materiales con mayor imanación de saturación entre todos los minerales naturales existentes en la Tierra. Además, cabe destacar que posee una alta estabilidad química gracias a su estructura de espinela. [2] Este óxido ferromagnético está formado por iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en una relación 1:2 $\text{FeO}\cdot\text{FeO}_3$, donde todos los iones Fe^{2+} están coordinados octaédricamente (sitios B) mientras que la mitad de los iones Fe^{3+} están coordinados tetraédricamente (sitios A) y la otra mitad octaédricamente (sitios B). En esta estructura, que se conoce como estructura de espinela inversa, los iones O^{2-} se encuentran formando un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras fcc en la dirección [111]. La estructura magnética resultante de esta distribución de iones es ferromagnética, es

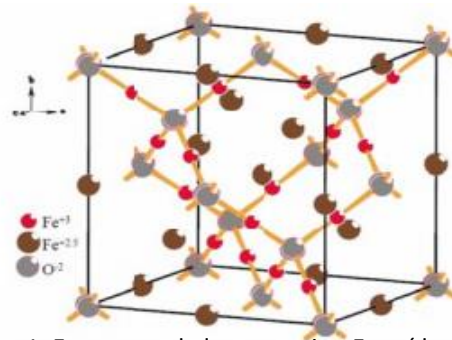


Figura 1: Estructura de la magnetita. Extraída de [2]

decir, las dos subredes A y B se acoplan antiferromagnéticamente, pero hay un momento neto resultante ya que la configuración de spin del Fe^{3+} es $S=5/2$ mientras que la del Fe^{2+} es $S=2$. En su forma nanométrica, y notablemente para tamaños $< 10\text{-}15$ nm, es frecuente encontrar propiedades magnéticas diferenciadas respecto al sistema de dimensiones macroscópicas, incluyendo la disminución de la magnetización respecto al material 'bulk', desaparición de la transición de Verwey, cambios en la conductividad eléctrica, etc. [2]

1.3. Uso de campos magnéticos para calentamiento

Actualmente, en biomedicina se están llevando a cabo un creciente número de proyectos y experimentos con coloides magnéticos para administrar fármacos de una manera controlada y específica en órganos y tejidos diana. En los casos en los que se emplean MNPs, el mecanismo físico que permite esta selección y liberación controlada es la interacción del momento magnético de las partículas con campos magnéticos externos, continuos o alternos.[3] Concretamente, las estrategias más empleadas están relacionadas con el uso de campos magnéticos continuos (campos DC) sobre las MNPs para vectorización mediante la interacción del momento magnético con un gradiente de campo externo, y con la aplicación de campos magnéticos de radiofrecuencia para la generación de calor (mediante el acoplamiento del momento magnético con la componente magnética de las ondas).

Hipertermia es un término originado en la medicina oncológica y se refiere a un tipo de tratamiento en el que algún tejido del cuerpo (o el cuerpo completo) se expone a temperaturas altas para inducir la muerte celular. La base de este protocolo terapéutico es el hecho conocido de que las células cancerígenas se vuelven más sensibles a los efectos de la radiación o de los fármacos anticáncer cuando son previamente sometidas a temperaturas superiores a los $41\text{-}42^\circ\text{C}$.[4] Las técnicas de hipertermia para uso oncológico surgen en los años 70 cuando H. Suit y M. Shwayder reportan las primeras evidencias clínicas sobre regresión tumoral inducida por niveles tolerables de hipertermia.[5, 6] Actualmente la hipertermia es utilizada en oncología como terapia complementaria de la radioterapia en procesos de regresión tumoral y es una terapia mínimamente invasiva y de alta selectividad [7].

En la hipertermia magnética (HTM), la fuente de calor son las MNPs que se inyectan previamente en el tejido u órgano diana gracias a una formulación coloidal biocompatible. A esta dispersión coloidal se le aplica un campo magnético AC en el rango de las radiofrecuencias (100-500 kHz, ondas del espectro AM de frecuencias) y de intensidades entre 10 – 30 kA/m para producir el calentamiento de las partículas por medio de mecanismos de relajación magnética. Debido a la extremadamente baja absorción de esta radiación por los tejidos biológicos, su utilización en los protocolos de HTM hace que esta técnica sea inocua para todas aquellas regiones del cuerpo que no contengan MNPs, otorgando así una alta selectividad. De hecho, únicamente aquellas células cargadas previamente con MNPs sufrirán los efectos del calentamiento [3]. Como se mencionó más arriba, la absorción de potencia en MNPs está relacionada con las pérdidas en materiales magnéticos por los procesos de magnetización irreversible en campos AC [4], pero por tratarse de NPs monodominio los mecanismos de dicha absorción son diferentes. Pero ello se describirá con más detalle en el siguiente apartado.

1.4. Teoría de la absorción de potencia

En la figura 2 se muestra esquemáticamente el proceso por el cual la energía liberada por la aplicación de un campo magnético de radiofrecuencia variable en el tiempo puede utilizarse para calentamiento del medio circundante (un ferrofluido por ejemplo) o bien para liberar moléculas de interés biológico previamente acopladas a la partícula. A diferencia de los materiales magnéticos macroscópicos, la estructura magnética de las MNPs consiste en un único dominio magnético. Debido a esta estructura, las NPs menores de un cierto tamaño crítico se denominan partículas monodominio. Además, debido a sus propiedades magnéticas intrínsecas (imaneación de saturación, interacción de canje, anisotropía magnética, etc.) las MNPs de Fe_3O_4 con tamaños de ≈ 50 nm o menos, son monodominios magnéticos, y corresponde al caso de las MNPs utilizadas en este trabajo (20-40 nm). Las MNPs monodominio están compuestas por un único dominio magnético que es la suma de todos los momentos magnéticos atómicos alineados. Este 'súper-momento' es objeto de fluctuaciones térmicas a temperatura ambiente, originando un fenómeno conocido como súper-paramagnetismo. Además, estas MNPs son capaces de absorber energía cuando son sometidas a campos magnéticos alternos.

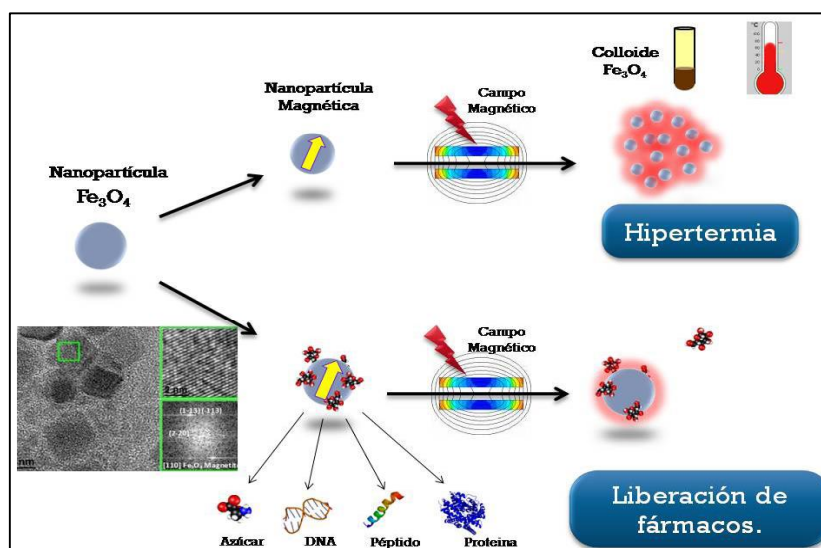


Figura 2: Esquema simplificado de la utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas en hipertermia magnética. Extraído de [7].

La anisotropía magnética en estructuras monodominio asociada a la aplicación de un campo externo H_0 resulta en una energía $E_A = KV \text{sen}^2(\theta)$, donde K es la anisotropía magnética de la partícula, V su volumen y θ es el ángulo entre el vector magnetización y H_0 . La dependencia de E_A con θ implica que en presencia de H_0 la partícula posee dos estados de mínima energía, correspondientes a la orientación paralela o antiparalela de los momentos magnéticos. [8] Así, para temperaturas finitas (y especialmente a temperatura ambiente a la que se realizan las aplicaciones biomédicas) hablamos de relajación magnética de la partícula cuando su momento magnético pasa de un mínimo a otro superando la barrera de energía E_A debido al efecto de la energía térmica, $k_B T$.

Hay en la literatura diversos modelos de los mecanismos físicos de absorción de energía en campos AC y de la disipación al medio en forma de calor. Algunos de estos modelos incluyen la aproximación lineal de la magnetización, es decir, asumen que los campos aplicados son pequeños comparados con el campo de anisotropía de las MNPs. En la aproximación lineal, la imanación depende linealmente del campo aplicado a través de la susceptibilidad magnética χ mediante

$$M = \chi H_0 \quad \text{Ec. (1)}$$

En este caso los modelos propuestos se basan en los mecanismos de relajación magnética en MNPs monodominio, denominados relajación de Brown y de Néel. La relajación Browniana implica que la generación de calor se produce por el efecto de la viscosidad del líquido que rodea a las MNPs cuando la partícula rota por efecto del campo oscilante aplicado. En el caso de la relajación de Néel, la generación de calor se produce por la rotación del momento magnético de la partícula por efecto del campo aplicado. En muchas situaciones experimentales, la partícula está impedida de rotación mecánica (por ej. en el interior celular, o bien cuando forma parte de un ferrogel) por lo que el único mecanismo de relajación corresponde a la relajación de Néel. Al aplicar un campo magnético alterno

$$H(t) = H_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ec. (2)}$$

de frecuencia $\omega = 2\pi f$, éste interactúa con las MNPs de tal forma que la imanación se define por $M(t) = \chi H(t)$. La primera Ley de la Termodinámica establece que la variación de energía interna en este sistema será la suma del calor realizado más el trabajo generado $dU = \delta Q + \delta W$, donde $\delta W = HdB$. Considerando un sistema adiabático ($\delta Q = 0$), tenemos que:

$$\Delta U = -\mu_0 \oint M dH = 2 \mu_0 H_0^2 \chi'' \int_0^{2\pi/\omega} \text{sen}^2(\omega t) dt \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío, χ'' es la componente imaginaria de la susceptibilidad magnética, ω la frecuencia angular y H_0 es la amplitud del campo magnético aplicado. La integración se realiza sobre un ciclo completo. De este modo, la potencia absorbida por un sistema de MNPs está dada por $P = f \Delta U$, lo que nos proporciona la relación:

$$P = \mu_0 \pi \chi'' f H_0^2 \quad \text{Ec. (4)}$$

Sustituyendo $M(t)$ en la expresión de la energía, se llega a la expresión de potencia en función del campo y frecuencia aplicada:

$$P = \frac{\chi_0}{2} \left[\frac{\omega^2 \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right] \mu_0 H_0^2 \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde χ_0 es la susceptibilidad magnética inicial. En esta expresión se observa que la absorción será máxima cuando $\omega \tau = 1$. Para un material superparamagnético χ_0 puede obtenerse de la ecuación de Langevin, derivando $\mathbf{M} = M_0 L(x)$ respecto de H . El tiempo de relajación τ está relacionado con el fenómeno físico que lleva al desfase de \mathbf{M} con respecto a H . Usualmente se considera que este tiempo de relajación es un tiempo efectivo originado en dos procesos independientes, las relajaciones de Néel (τ_N) y Browniano (τ_B). Asumiendo la independencia de ambos mecanismos (que es una aproximación cuya validez depende de las condiciones experimentales de campo y frecuencia) el tiempo de relajación efectivo es la suma recíproca de los tiempos de relajación [11]:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad \text{Ec. (6)}$$

con

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{\text{eff}} V}{k_B T}\right) \quad \text{Ec. (7)}$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad \text{Ec. (8)}$$

donde τ_0 es el tiempo de relajación característico del sistema ($10^{-9} - 10^{-12}$ s), η la viscosidad del líquido ($\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$), K_{eff} la anisotropía magnética de las MNPs y V_H el volumen hidrodinámico de las MNPs. En términos generales, se denomina teoría de respuesta lineal (LRT por sus siglas en inglés) a la aproximación de amplitudes de campos pequeñas frente a la coercitividad de las MNPs, en la cual se cumple que la susceptibilidad χ en la Ec. (1) es independiente del campo H . En este trabajo examinaremos la validez de esta aproximación para nuestras muestras, en particular, la validez de la aproximación hecha en la Ec. (6).

1.5. Teoría de separación magnética

Una partícula magnética aislada con un momento magnético total \mathbf{m} en un campo inhomogéneo \mathbf{H}_0 siente una fuerza magnética dada por:

$$\mathbf{F}_m = (\mathbf{m} \cdot \nabla) \mathbf{H}_0 \quad \text{Ec. (9)}$$

Donde ∇ es el operador gradiente evaluado en la posición de la partícula [8]. Para el caso de partículas suspendidas en medios no magnéticos como el agua, el momento total de la partícula se puede escribir como

$$\mathbf{m} = V_m \mathbf{M} \quad \text{Ec. (10)}$$

Donde V_m es el volumen magnético de la partícula y \mathbf{M} es la magnetización volumétrica. Además, si no hay campos eléctricos variables con el tiempo en el medio, la ley de Ampère se reduce a la expresión $\nabla \times \mathbf{H}_0 = 0$. Si hacemos uso de la identidad matemática

$$(\mathbf{m} \cdot \nabla) \mathbf{H}_0 = \nabla(\mathbf{m} \cdot \mathbf{H}_0) - \mathbf{H}_0 \cdot \nabla \mathbf{m} - \mathbf{m} \times (\nabla \times \mathbf{H}_0) - \mathbf{H}_0 \times (\nabla \times \mathbf{m}) \quad \text{Ec. (11)}$$

Y suponemos que \mathbf{m} es independiente de H_0 , obtenemos

$$(\mathbf{m} \cdot \nabla) \mathbf{H}_0 = \nabla(\mathbf{m} \cdot \mathbf{H}_0) - \mathbf{m} \times (\nabla \times \mathbf{H}_0) \quad \text{Ec. (12)}$$

Si no hay flujos de corriente eléctrica, $\nabla \times H_0$ es igual a cero, y así para un dipolo con momento constante \mathbf{m} la fuerza se puede escribir como

$$\mathbf{F}_m = \nabla(\mathbf{m} \cdot \mathbf{H}_0) \quad \text{Ec. (13)}$$

Esta relación resume la fuerza ejercida sobre una partícula con momento fijo en función de su orientación y posición en un campo aplicado H_0 . Además, muestra que para crear una fuerza \mathbf{F}_m es necesario un gradiente de campo magnético. El gradiente del campo magnético ∇H_0 es el parámetro externo a las MNPs que se define mediante el diseño de la distribución de fuentes de campo (es decir, distribución espacial de imanes o electroimanes), mientras que el otro parámetro relevante en la Ec.(13), el momento magnético \mathbf{m} , depende de las propiedades de las MNPs sintetizadas. [8] Para maximizar los valores de \mathbf{m} , y por tanto de \mathbf{F}_m utilizamos materiales ferromagnéticos con elevada magnetización de saturación, cuyo ordenamiento magnético se describió brevemente en el apartado 1.2.

Cabe destacar que en la naturaleza un material ferro- o ferri-magnético no tiene todos los momentos magnéticos orientados en la misma dirección ya que la energía magnética almacenada en el sistema no sería la mínima posible. El sistema tiende a organizarse en configuraciones energéticamente más favorables, de modo que se separa el material en dominios donde los momentos magnéticos se orientan en la misma dirección. Y el momento magnético total es la suma de las contribuciones de los distintos dominios que conforman el material. [8] No obstante, como se mencionaba en el apartado anterior por debajo de un volumen crítico todos los momentos se orientan en la misma dirección y el sistema adquiere una estructura de monodominio magnético. La relajación magnética puede ocurrir mediante dos mecanismos principales, la relajación de Brown, correspondiente a la rotación del sistema y la relajación de Néel, que viene dada por la rotación del momento magnético respecto a los ejes cristalinos del sistema. [8]

1.6. Mecanismo de la liberación remota por campos magnéticos

Un sistema de liberación de fármacos tiene como objetivo optimizar la administración de fármacos *in vivo*, de modo que los materiales a ser utilizados deben ser biocompatibles, biodegradables y mostrar baja toxicidad en tejidos y órganos. [9] En cuanto a los mecanismos de liberación, se pretende que muestren una farmacocinética compatible con el uso clínico, es decir que los tiempos de liberación sean de horas o días. Por último, idealmente se pretende que la liberación pueda ser controlada remotamente mediante estímulos como luz o campos EM, para tener un control no sólo temporal de la liberación a lo largo de horas o días, sino de la dosis liberada en función del estímulo aplicado. Esto conlleva la ventaja adicional de constituir un método no invasivo para los potenciales pacientes.

Los polímeros son materiales ideales para esta meta, ya que son de bajo coste y son relativamente fáciles de modificar químicamente para la incorporación de MNPs. Los polímeros utilizados en biomedicina responden a estímulos biológicos y químicos como cambios en la temperatura, en el pH, fuerza iónica o la presencia de campos magnéticos externos [10]. El método propuesto en este trabajo se basa en que la liberación del fármaco de forma remota, mediante la aplicación de campos magnéticos en polímeros termosensibles cargados con MNPs, que actúan como nanocalentadores y llevan la temperatura por encima del valor denominado LCST (*Low Critical Solution Temperature*, o temperatura inferior de transición crítica), a la cual

el polímero se contrae permitiendo la liberación del fármaco. De este modo se tiene el control espacial y temporal de la liberación del fármaco. Otros mecanismos de accionamiento remoto que se han reportado hasta la fecha incluyen el uso de luz, pH y cambios de potenciales redox. [18,20] Sin embargo, los mecanismos físicos que se llevan a cabo en la liberación de un fármaco, previamente ligado a una nanopartícula magnética, cuando se aplica un campo magnético de radiofrecuencia no están comprendidos completamente, aunque existen aproximaciones a modelos teóricos que involucran aumentos en la temperatura local en la superficie de las NPs o procesos mecánicos debidos a la rotación de las partículas en presencia de campos alternos. [11] No obstante, todavía quedan muchos interrogantes, de modo que factores como la energía de ligadura, las colisiones aleatorias que se puedan producir entre las MNPs, las variaciones de pH en el medio, etc., han de ser considerados a la hora de diseñar un sistema de liberación controlada de fármacos. [11]

Durante este trabajo se utilizaron **dos tipos de sistemas diferentes** (Figura 3) como prueba de concepto:

- a) MNPs, en las que la liberación no se debe al calentamiento macroscópico de la muestra, sino a procesos físicos producidos de forma local en la partícula (estos procesos no son actualmente conocidos completamente). Un posible mecanismo propuesto consiste en que, cuando aplica un campo magnético AC, el momento magnético m de la partícula se acopla con el vector H_0 , y la MNP adquiere un movimiento rotacional-vibracional, que es el responsable de la liberación del fármaco. [11].
- b) Ferrogeles, en los que el polímero constituyente es termosensible, y presenta una transición de tipo LCST (mencionada más arriba), por lo que el calor generado por las MNPs eleva la temperatura hasta la transición, el polímero se contrae y se libera el fármaco previamente adsorbido en el sistema. [11]

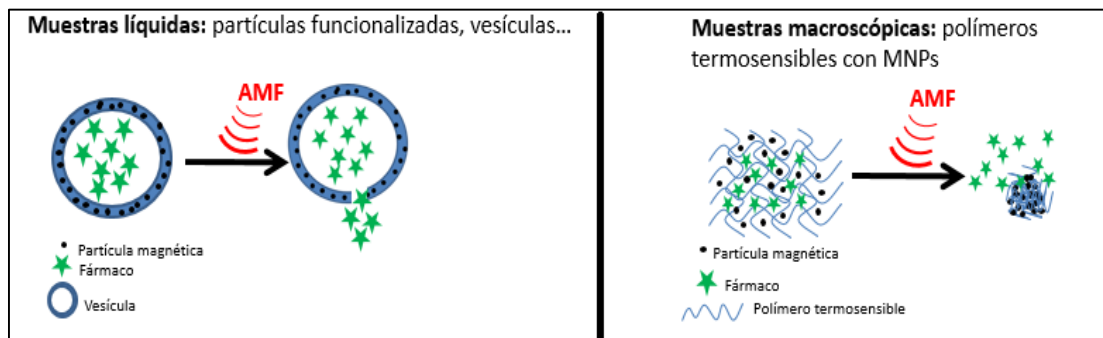


Figura 3: Ejemplo de los distintos tipos de sistemas que podemos tener para la liberación de fármacos.

2. Objetivos.

El objetivo de este trabajo es utilizar los conceptos y herramientas de la física de materiales y el magnetismo para diseñar de manera óptima un sistema de liberación de fármacos mediante la utilización de ferrogeles. El trabajo se enmarca en el ámbito de la nano-biomedicina ya que como se ha mencionado en la introducción existe una búsqueda de estrategias más eficientes de vectorización y liberación de fármacos que minimicen los efectos secundarios de las terapias actuales. Para el diseño y test de dicho sistema de liberación se programaron los siguientes objetivos intermedios (véase la Figura 4):

- La caracterización de los materiales a utilizar (distintos tipos de muestras magnéticas) con el fin de cuantificar la respuesta en sus aspectos químicos, físicos, magnéticos, etc.
- Como la liberación de fármacos se realiza no sólo mediante ferrogel sino también con partículas magnéticas funcionalizadas, es necesario diseñar una serie de barreras mecánicas (filtros) y magnéticas (imanes) para evitar la llegada de las MNPs al organismo.
- La optimización de la detección espectrofotométrica UV-VIS de los fármacos elegidos para la prueba de concepto, sensibilidad del sistema, límites de detección, etc.
- Por último se llevaron a cabo los experimentos de liberación estática y dinámica (iniciada mediante la aplicación de campos magnéticos). También la liberación espontánea del ferrogel para evaluación de los tiempos de descarga y su potencial aplicación clínica.

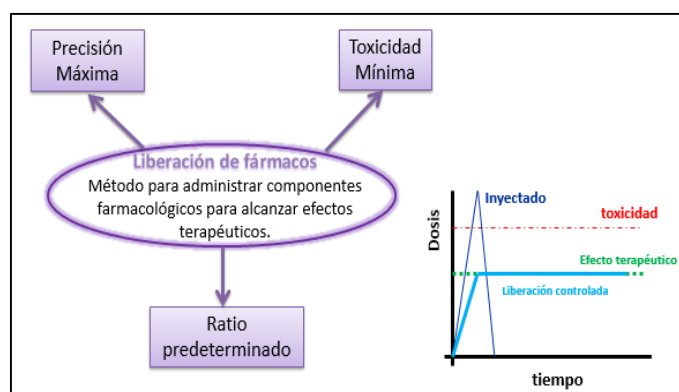


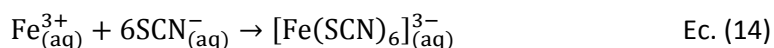
Figura 4: Liberación de fármacos con un esquema en el que se pueden ver los distintos factores y motivaciones a tener en cuenta a la hora del diseño de este sistema.

3. Caracterización fisicoquímica.

Se caracterizan físico-químicamente las MNPs y ferrogel para estudiar su morfología externa, microestructura, distribución de tamaño y propiedades magnéticas.

3.1. Determinación de la concentración de las MNPs

Para la determinación de la concentración de masa magnética en los coloides se utiliza la espectrofotometría VIS-UV UV-VIS (Mini USB 2000+, Ocean Optics®). El protocolo se basa en la reacción de complejación del ion hierro (Fe^{3+}) con el ion tiocianato (SCN^-) [12]



En primer lugar, se digieren las MNPs en 500µL de ácido clorhídrico (HCl 6M) y 500µL de ácido nítrico (HNO_3 (65%)). Estos ácidos producen la disolución de los iones Fe (color amarillento) y su oxidación a Fe^{3+} . Una vez se ha realizado la digestión química se enrasa a 5 mL o 10 mL con HCL 6M en función de si está muy concentrada o no. Una vez enrasadas a dicho volumen final, se añade en una cubeta nuestra disolución en un volumen conocido y se compleja añadiendo 500 µL de la disolución de KSCN (1.5M), dando un color rojizo. A continuación, la medida de la absorbancia de este complejo se determina a una longitud de onda de 478 nm.

Preparación del blanco: Se mezclan 500µL de HCl 6M con 500 µL de HNO_3 al 65%, de dicha disolución se cogerán 500µL y se pondrán en la cubeta con 500 µL de SCN^- 1.5M. De modo que esta última disolución es la que se medirá con el espectrofotómetro y será el control de nuestro

experimento, ya que permite garantizar que la señal que observamos en el espectrofotómetro se debe únicamente a nuestro complejo, y no a otro compuesto presente en la disolución.

Recta de calibración: La recta de calibración del Fe se obtiene realizando distintas disoluciones de concentraciones conocidas de un patrón de Fe comercial (1mg/mL en HNO₃). El volumen de patrón añadido para cada disolución se digiere con 500 µL de HCl 6M y 500 µL de HNO₃ al 65%, posteriormente se lleva a un volumen final de 10 mL. Una vez digerida, se ponen en la cubeta 500µL de la disolución y se añaden 500 µL de la disolución de tiocianato de potasio (KSCN) 1.5M, anotando las absorbancias que nos van saliendo. Dichas absorbancias las representamos en una recta en función de su concentración inicial y las ajustamos a una recta. (Anexo 2)

Determinación de la concentración: Con la recta de calibración y las disoluciones de las distintas muestras de MNPs ya se puede calcular la concentración de Fe₃O₄, Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄, CoFe₂O₄, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la cantidad de Fe presentes por molécula de Fe₃O₄, Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄, CoFe₂O₄, respectivamente. El valor de la concentración de Micromod® se indica en el envase y es de 25mg/mL.

Muestra	Concentración (mg/mL)
Fe ₃ O ₄	3.29
Micromod® (Fe ₃ O ₄)	25.00
CoFe ₂ O ₄	3.07
Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄	1.45

Tabla 1: Concentraciones de las muestras a analizar.

De la tabla puede verse que las concentraciones usuales giran en torno a los pocos mg/mL, excepto en el caso de la muestra comercial de Micromod®. Nuestra determinación de las concentraciones precisas en cada caso (incluso en muestras comerciales que ofrecen un valor nominal) es relevante ya que de ellos depende la precisión en la determinación de otros parámetros como el SPA o la magnetización de las muestras.

3.2. Separación magnética y mecánica.

La necesidad de diseñar una serie de barreras de separación de las MNPs, tanto magnéticas como mecánicas, se debe al hecho de que en los experimentos de liberación las MNPs pueden desprenderse del material y acceder al espectrofotómetro, originando variaciones de intensidad e interferencias con la señal a medir. Además, algunas formulaciones de MNPs pueden contaminar de forma parcialmente irreversible las ventanas del espectrofotómetro. Para obtener medidas precisas y repetitivas es necesario por tanto reducir al mínimo la concentración de MNPs en solución, dejando solo el fármaco a ser detectado. Hemos implementado dos tipos de barreras basadas en a) separación magnética y b) separación mecánica con membranas micro-porosas. Ambas se describen a continuación.

a. Diseño y eficiencia del separador magnético

Para escoger el diseño más eficiente se prueban tres configuraciones distintas con imanes comerciales de Neodimio. Para comprobar la eficiencia de cada uno de los modelos se pasan distintos tipos de MNPs (Fe₃O₄, CoFe₂O₄ y Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄) por el circuito. En todos los casos estudiados, la definición de eficiencia es la siguiente

$$\varepsilon = \frac{C_I - C_F}{C_I} \times 100 \quad \text{Ec. (15)}$$

Donde C_I y C_F son la concentración inicial y final de la muestra respectivamente. Con esta definición, un separador con $\varepsilon=100\%$ corresponde a una eficiencia ideal.

La *primera configuración* utilizada es un imán circular de NdFeB con un espesor de 1 cm y un diámetro de 2.5 cm, por el cual pasamos el tubo con MNPs de forma radial. Esta configuración presenta una eficiencia baja, pudiéndose observar a simple vista que muchas de las partículas siguen en la disolución tras pasar por el imán. El volumen inicial de la disolución es de 500 μL y midiendo la concentración final de partículas calculamos el valor de la eficiencia $\varepsilon=44.8\%$. Una *segunda configuración* se realiza con 4 imanes en disposición paralela de modo que el tubo por el que pasaban las MNPs cruzan por el medio de los cuatro imanes. La eficiencia de esta configuración es en todos los experimentos $\varepsilon < 75\%$ para una muestra de 500 μL de magnetita. La *última configuración* y definitiva se realiza con el mismo imán de la primera configuración pero ‘enroscando’ el tubo dos veces en torno al espesor de dicho imán, cerca de sus bordes, donde se espera que el gradiente de campo sea máximo. Con esta configuración se obtiene un valor $\varepsilon = 99\%$ de eficiencia para una muestra de magnetita (un volumen de 500 μL). En el Anexo 1 se pueden ver las simulaciones numéricas mediante elementos finitos de las tres configuraciones, utilizando el programa FEMM.

b. Filtro para la separación física.

Como se comentó en la discusión teórica de la separación magnética, la capacidad de retención depende no sólo de la configuración del campo, sino también del momento magnético de las MNPs utilizadas, así como de los parámetros fisicoquímicos; principalmente el radio hidrodinámico de las partículas y la viscosidad del medio. La elevada eficiencia del sistema para la muestra de magnetita se corresponde con la elevada magnetización de las MNPs y el relativamente pequeño radio hidrodinámico. Otras muestras utilizadas presentan eficiencias menores para la misma configuración de separador magnético. Por tanto, con el objeto de dotar al sistema de mayor flexibilidad para analizar muestras que puedan pasar por el separador, se utilizan membranas en forma de filtro colocadas tras el imán que proporcionan una segunda barrera física y resulta en una mayor retención de partículas. Los volúmenes de las muestras utilizadas son 500 μL para la magnetita, 250 μL para las ferritas $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ y CoFe_2O_4 y 40 μL para la muestra comercial de Micromod®. Se prueban tres membranas distintas, dos de distinto material pero con el mismo tamaño de poro y una tercera con un tamaño de poro más pequeño. Las tres no obstante, son hidrofílicas. La *primera membrana* es de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm . La *segunda membrana* es de celulosa con un tamaño de poro igual al de nylon, 0.45 μm y por último, la *tercera membrana* es de una marca registrada (Durapore®) con un tamaño de poro de 0.10 μm . A nivel mecánico, la tercera membrana es la que da más problemas en cuanto a la cuestión de tiempo ya que al tener un poro más pequeño el líquido tarda más en pasar para un mismo voltaje de la bomba peristáltica utilizada (6V).

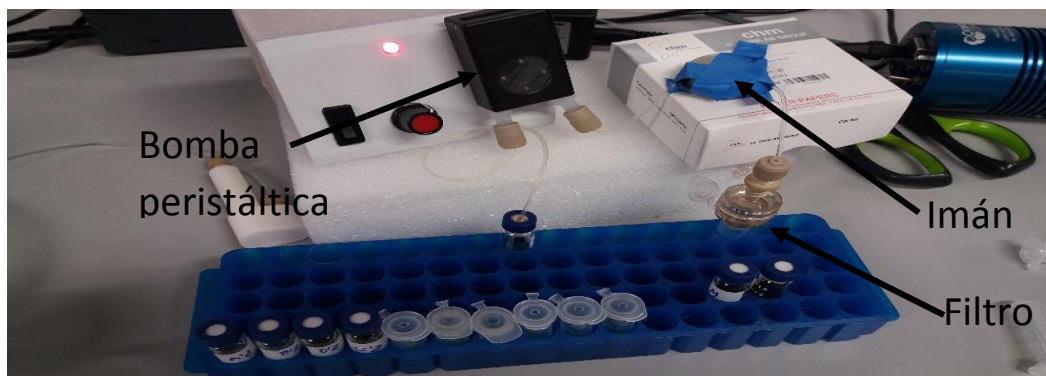


Figura 5: Disposición del material del experimento en el que se puede ver la bomba peristáltica, el separador magnético utilizado y por último el filtro.

En primer lugar medimos la eficiencia ε del imán para las cuatro muestras, y a continuación añadimos al circuito una membrana filtro para las muestras de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$, $CoFe_2O_4$ y Micromod®.

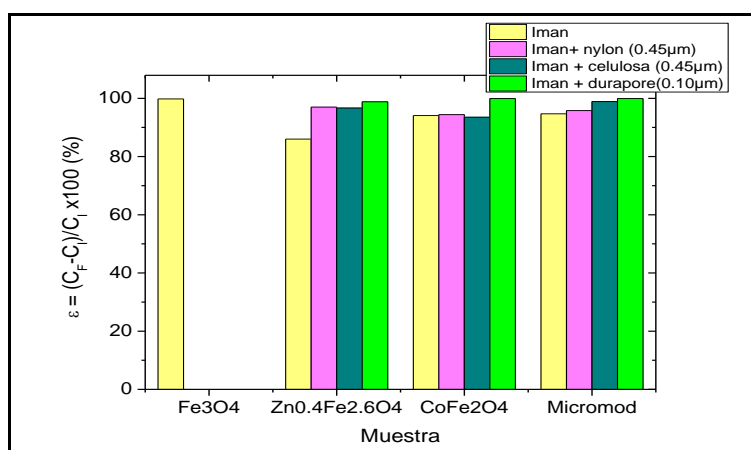


Figura 6: Eficiencias ε para los distintas muestras y montajes de separación. Para las MNPs de Fe_3O_4 se alcanzó un valor de eficiencia $\varepsilon > 99\%$ con sólo separación magnética. El resto de muestras mostró valores similares cuando se usó en combinación con filtros retentores.

Como podemos ver en la figura, la configuración sólo con imán es suficientemente eficaz para las NPs de magnetita, con una eficiencia $\varepsilon = 99.8\%$. Atribuimos el elevado valor de ε observado para estas NPs a la alta imanación de saturación de la magnetita, y también a la baja aglomeración que posibilita una mayor movilidad hacia el imán. De las tres membranas posibles, la que nos da mejores resultados teniendo en cuenta las otras muestras es la de Durapore®, logrando una eficiencia de más del 95% en todos los casos. (Datos en el Anexo 3). Además, de la figura podemos deducir que la muestra de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ presenta una respuesta magnética ‘degradada’, en concordancia con los datos de magnetización extraídos del VSM.

3.3. Distribución de tamaños de las partículas empleadas.

Gracias al microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) pudimos obtener imágenes del tamaño medio de las MNPs, su distribución y morfología. Esto es importante ya que el tamaño guarda relación con la capacidad de absorber potencia bajo un campo magnético alterno. El TEM utilizado pertenece a FEI Tecnai T20 y opera a 200keV. Las

muestras se han preparado poniendo una gota de la suspensión diluida de MNPs en agua en una rejilla de Cobre recubierta de Carbono y permitiendo que el solvente se evapore a temperatura ambiente. El tamaño medio y su distribución se evalúan con la medida de la dimensión interna más larga de 100 partículas, podemos ver que éstas tienen una forma paralelepípeda. Con el software ImageJ, obtenemos el tamaño, d , que es dicha dimensión interna de las partículas. Una vez tenemos los datos, los representamos en un histograma que nos muestre la distribución de tamaños y a continuación lo ajustaremos a una distribución gaussiana. Este mismo análisis lo realizaremos para las cuatro MNPs de las que disponemos.

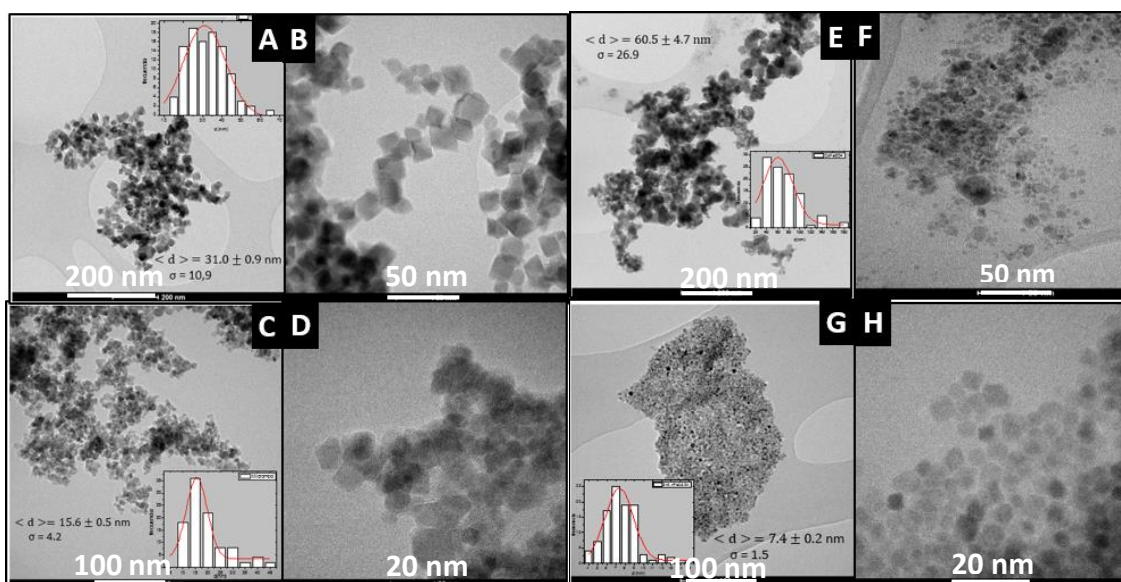


Figura 7: Imágenes TEM de las NPs sintetizadas: A) y B) Fe_3O_4 ; C) y D) Micromod®; E) y F) CoFe_2O_4 ; G) y H) $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$. Además, podemos ver las distintas distribuciones de tamaño y cómo se ajustan a una distribución gaussiana. Las de Zinc son las más pequeñas, mientras que las de Cobalto son las más grandes.

Muestra	$\langle d \rangle$ (nm)	Error estadístico	σ
Fe_3O_4	31.0	0.9	10.9
Micromod®	15.6	0.5	4.2
CoFe_2O_4	60.5	4.7	26.9
$\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$	7.4	0.2	1.5

Tabla 2: resumen de la distribución de tamaño con su error para cada muestra

3.4. Determinación del radio hidrodinámico.

Otro dato importante sobre nuestras MNPs es el radio hidrodinámico. Aunque existan otros métodos para medirlo, caracterizamos dicho radio mediante dispersión de luz dinámica (DLS) [13]. Esta técnica permite medir las fluctuaciones en la intensidad de dispersión en función del tiempo, de modo que la velocidad de las fluctuaciones depende del tamaño de las partículas y del coeficiente de difusión. El radio hidrodinámico es indicativo del tamaño aparente teniendo en cuenta los procesos de atracción y asociación con moléculas del solvente. [13]

Para nuestras muestras obtenemos los siguientes resultados:

Muestra	Diámetro hidrodinámico (nm)	σ
Fe ₃ O ₄	469.80	31.7
Micromod®	312.20	1.50
CoFe ₂ O ₄	1048.7	57.8
Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄	328.20	3.40

Tabla 3: Resumen medidas obtenidas con el DLS

3.5. Medidas de la absorción de potencia específica

La absorción de potencia específica (SPA, por sus siglas en inglés) es un parámetro físico que mide la eficiencia de calentamiento. Este parámetro, también conocido como potencia de pérdida específica (SLP), se define como la potencia absorbida/liberada por unidad de masa de un material magnético. [15] Si queremos medir el SPA de un sistema de MNPs utilizando la Ec.(3), necesitaríamos conocer la relación $M(H)$ a las frecuencia f utilizada en el experimento (100-500 kHz), puesto que la potencia disipada en un material magnético viene dada, independientemente del mecanismo de disipación, por $P = fA$ donde A es el área del ciclo de histéresis $M(H)$. Esto puede lograrse por un dispositivo llamado Histeresisgrafo. Sin embargo, nuestras mediciones de SPA se han realizado por otro método, mucho más extendido en la literatura: el método calorimétrico. Utiliza la relación termodinámica básica

$$Q = mc\Delta T \quad \text{Ec. (16)}$$

que relaciona la elevación de la temperatura ΔT de un sistema de masa m y calor específico c (aislado térmicamente del entorno) con el calor generado en/transferido a dicho sistema. La potencia específica (es decir, por unidad de masa) se calcula entonces según

$$\text{SPA} = \frac{P}{m} = \frac{Q}{\Delta t} = c \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Ec. (17)}$$

Como aproximación consideramos que las medidas se realizan en un sistema adiabático de modo que despreciamos las pérdidas de calor a través de las paredes de los viales en los que se encuentra la muestra. Esta aproximación se justifica para experimentos cuyo tiempo característico es mucho menor que el tiempo para alcanzar el equilibrio térmico (p.ej., la expansión adiabática de un gas en un motor). Para ello utilizamos la variación de temperatura medida en los primeros segundos del experimento. Con esta aproximación, podemos escribir la ecuación del SPA como [15]

$$\text{SPA} = \frac{m_{np}c_{np} + m_l c_l}{m_{np}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{\text{máx}} \quad \text{Ec. (18)}$$

Donde los parámetros m y c son la masa y el calor específico y np y l indican nanopartículas y líquido respectivamente. Para las concentraciones utilizadas en este trabajo se cumple que $m_{np}c_{np} \ll m_l c_l$, y considerando que las MNPs están diluidas en agua, la Ec.(16) puede reescribirse como

$$\text{SPA} = \frac{\rho_l c_l}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{\text{máx}} \quad \text{Ec. (19)}$$

Donde ρ_l, c_l son la densidad y calor específico del agua y ϕ es la concentración de la muestra. La determinación del parámetro $\left(\frac{\Delta T}{\Delta t}\right)_{m\acute{a}x}$ en la Ec. (19) se realiza a partir del ajuste lineal de la curva de temperatura vs. tiempo en los primeros segundos de la medida. [15]

Los experimentos para las medidas SPA se llevan a cabo en un aplicador comercial de campo magnético (DM1, nB Nanoscale Biomagnetics, Spain). En nuestro experimento, medimos la variación de temperatura en función del tiempo para distintas amplitudes del campo magnético aplicado ($8 \leq H_0 \leq 24$ kA/m, dependiendo de la respuesta de cada MNPs) y con una frecuencia constante de 570kHz. Para el experimento disponemos de 1 mL del coloide magnético en un vial que se coloca en un Dewar conectado a una bomba de vacío (10^{-7} mbar) para aislamiento térmico. Una fibra óptica en el centro del coloide se utiliza para medir la temperatura de la muestra dentro del campo de radiofrecuencia. Antes de iniciar cada medida dejamos la muestra unos 2-3 minutos para que alcance el equilibrio térmico. Como puede verse en la Figura 8, para las muestras de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ y $CoFe_2O_4$ no se aprecia un cambio de temperatura significativo aún en los campos más altos. En consecuencia no se calculan los valores correspondientes de SPA (que serían de unos pocos W/g). Por otro lado, los valores de SPA para las muestras de magnetita y de Micromod® son significativos, y por ello se analizan en función del campo aplicado como se muestra en la Figura 9.

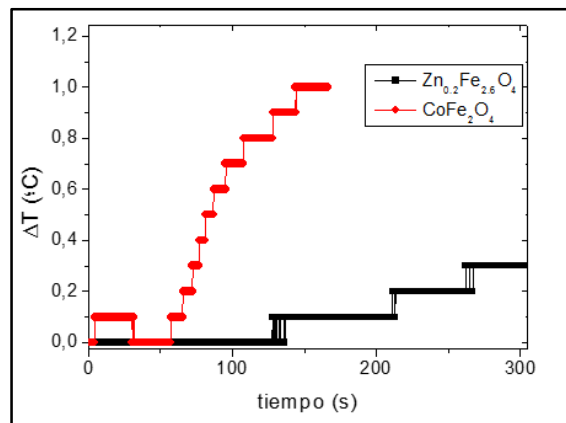


Figura 8: Curvas de $\Delta T/\Delta t$ para las muestras de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (en rojo) y $CoFe_2O_4$ (en negro), mostrando baja eficiencia de calentamiento ($\Delta T < 1.2$ °C). El aspecto escalonado proviene de la resolución del termómetro (0.1 °C)

Para Magnetita y Micromod® con ajuste $SPA = cH^\lambda$

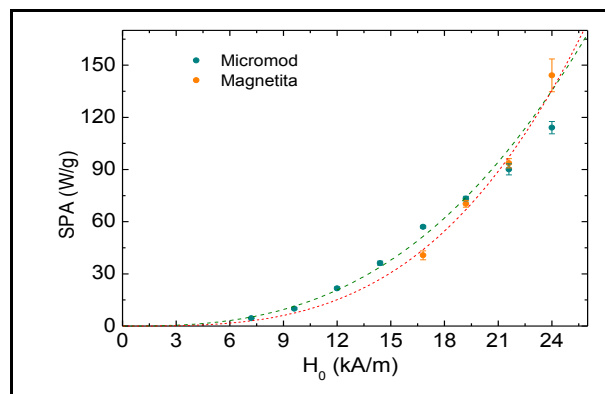


Figura 9: SPA en función del campo aplicado H_0 para las muestras Magnetita (naranja) y Micromod® (verde) dispersas en agua. Las líneas de trazos indican el ajuste con la expresión $SPA = cte \cdot H^\lambda$.

De las figuras puede verse que la dependencia del SPA con el campo puede ajustarse en ambos casos con una dependencia potencial $SPA \propto H^\lambda$. Para la muestra de magnetita el valor obtenido del ajuste es de $\lambda = 3.2 \pm 0.4$ y para Micromod® de $\lambda = 2.7 \pm 0.1$. Estos valores se apartan levemente del esperado en base a la teoría de respuesta lineal (LRT) $\lambda \sim 2$ [15], mostrando que la anisotropía de nuestros materiales es suficientemente baja para mostrar comportamientos no lineales a los campos aplicados en nuestros experimentos.

3.6. Ciclo de histéresis, campo coercitivo y magnetización.

Asimismo llevamos a cabo una caracterización magnética de la muestra, midiendo la magnetización, el campo coercitivo y cómo es el ciclo de histéresis, para esto utilizamos el magnetómetro de muestra vibrante o VSM (por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica de inducción se obtiene la curva de magnetización por masa en función del campo magnético (M vs. H) con alta sensibilidad. Su funcionamiento se basa en la ley de Lenz y es suficientemente sensible para determinar una variación mínima en el momento magnético de $5 \cdot 10^{-4}$ emu. El momento magnético de una muestra se mide haciendo vibrar la muestra en presencia de un campo magnético estático, a partir del cual se calcula la magnetización. [16] Las curvas M vs. H obtenidas a temperatura ambiente nos indican el tipo de orden magnético de las partículas. El campo coercitivo H_c es una medida de la resistencia del material a la desmagnetización y viene dado por la magnitud del campo externo aplicado en dirección opuesta necesaria para llevar la magnetización desde saturación hasta cero. [17] Otra característica importante es la histéresis, cuando el material sigue distintas curvas durante la magnetización y desmagnetización. Este comportamiento es causado por la rotación en la magnetización de momentos cuando se aplica el campo magnético creciente y que no es exactamente el opuesto cuando el campo decrece. [8]

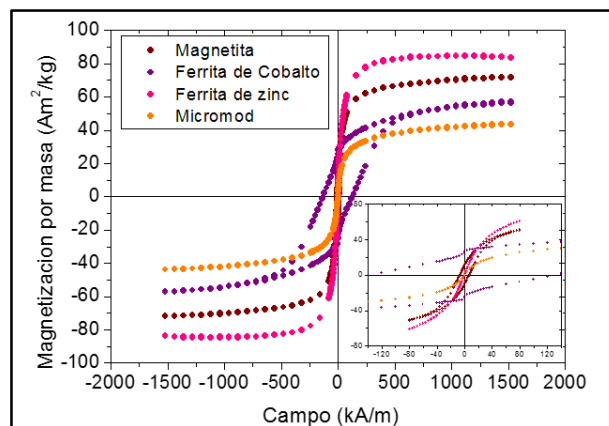


Figura 10: Ciclos de histéresis para las 4 muestras de las que disponemos. Además, en la parte inferior izquierda se puede ver el ciclo ampliado, donde vemos el comportamiento magnético de cada una de las muestras de modo más óptimo.

Gracias a los ciclos de histéresis podemos ver qué tipo de ordenamiento magnético presentan nuestras muestras. En la figura puede verse que todas las muestras a excepción del $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ tienen un campo coercitivo medible, de acuerdo con la estructura ferromagnética de las espinelas (magnetita y Micromod®). Posiblemente la muestra de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ se encuentra en el estado superparamagnético y eso se refleja en la ausencia de campo coercitivo. En la Tabla 4 recogemos los datos de campo coercitivo y magnetización de saturación. M_R/M_S revela la capacidad de desmagnetización del material: [18]

Muestra	H _c (kA/m)	M _s (Am ² /kg)	M _R (Am ² /kg)	M _R /M _s
Fe ₃ O ₄	6.71±2	68.04±0.5	11.5±0.5	0.17
Micromod®	0.41±2	43.28±0.5	0.74±0.5	0.02
CoFe ₂ O ₄	129±5	56.38±0.5	26.58±0.5	0.47
Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄	0.0±2	84.75±0.5	0.92±0.5	0.01

Tabla 4: Parámetros magnéticos de las muestras estudiadas. H_c: campo coercitivo; M_s: magnetización de saturación; M_R: magnetización remanente.

3.7. Componentes químicos de las muestras.

Para analizar los componentes químicos de las muestras con las que estamos trabajando, realizamos un análisis con Dual Beam (Nova 2000 Nanolab de FEI Company). Las imágenes son tomadas a 15 kV y 2.2 nA en todos los casos. Además, los espectros se toman de agregados significativos y de cada muestra tomamos tres espectros distintos y se hace la media de los datos obtenidos.

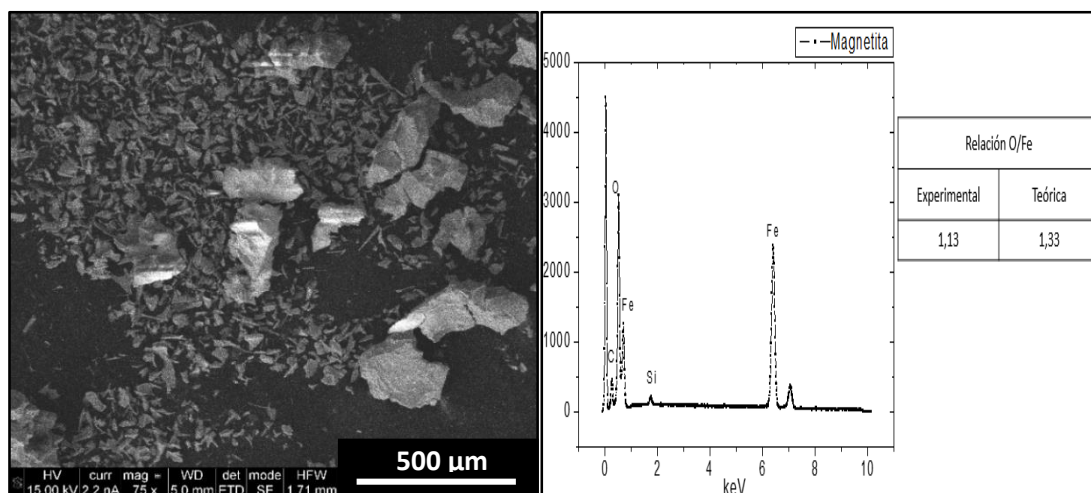


Figura 11: Panel izquierdo: imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las MNPs de magnetita. Panel derecho: espectro EDX mostrando la presencia de Fe y O. El pico del Si corresponde a la composición del sustrato. Los datos correspondientes a las demás muestras se encuentran en el Anexo 5

3.8. Caracterización del ferrogel.

Los hidrogeles son homopolímeros hidrofílicos que pueden variar bajo diversas condiciones y que dependen de sus enlaces químicos y estructura. Los sistemas con N-isopropilacrilamida (PNiPAAm) son los más investigados de los sistemas termorreversibles cuyos principales estímulos son las variaciones de temperatura y pH. Además, se utilizan en liberación de fármacos o encapsulación de células entre otras técnicas. [19,23] En nuestro experimento, el ferrogel se utiliza para liberar nuestro fármaco y lo sintetizamos a partir de los polímeros Alginato (Alg) y PNiPAAm, que al entrelazarse entre ellos proporcionan a la muestra una estructura mecánica ya que el PNiPAAm al incorporarlo en una red permite la interacción entre fármacos hidrofóbicos. [20,22] El protocolo utilizado en la síntesis se adjunta en el Anexo 6. Además, existe una temperatura crítica (LCST) en 32°C que cuando es superada, el polímero se contrae liberando el agua acumulada en el interior. Esta temperatura es al mismo tiempo, muy útil para aplicaciones

biomédicas, ya que es cercana a la del cuerpo humano. Al unir el PNiPAAm con Alg lo que conseguimos es una mayor porosidad. [20,23]

Para observar la red interna del gel y las MNPs en su interior utilizamos la técnica de Dual Beam, que se utilizó para la caracterización de las MNPs.

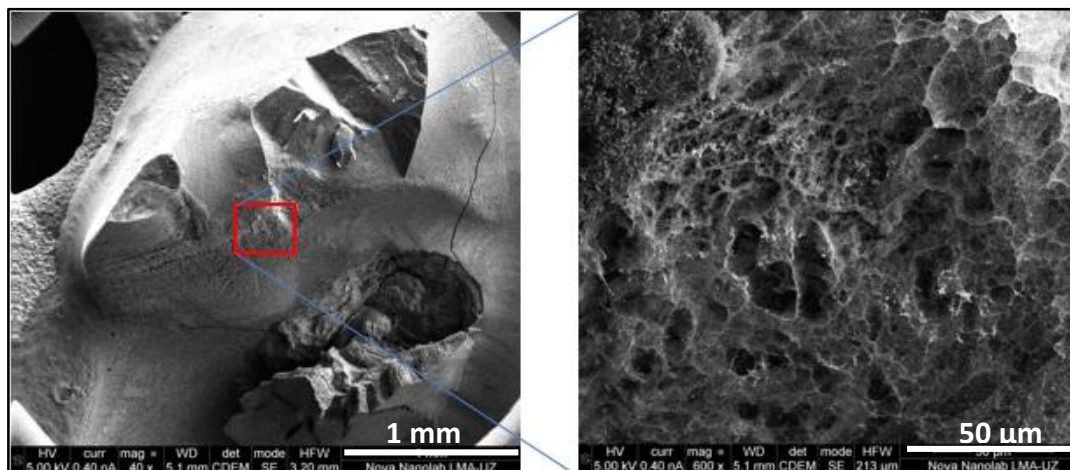


Figura 12: Imagen Dual Beam del Ferrogel. 1: Zona de corte de donde obtenemos las imágenes de la estructura interna del gel. Escala 1mm. 2: Zoom en la zona de corte donde se puede ver las formas de la estructura del gel. Escala 50μm.

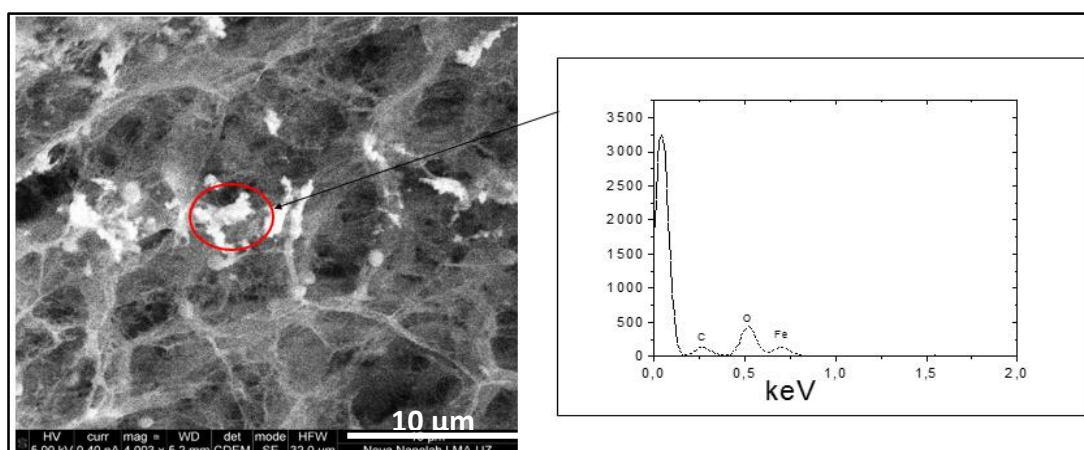


Figura 13: Imagen Dual Beam MNPs inmersas en el gel y espectro en el que podemos observar los componentes químicos de la zona analizada. Escala 10μm

En las imágenes anteriores podemos ver las estructuras de los polímeros entrecruzados, el Alg y el PNiPAAm, y como las MNPs de magnetita están inmersas en la matriz de dicha estructura. (En el Anexo 6 se adjuntan otras imágenes y espectros).

3.9. Medida del SPA del ferrogel.

La absorción de potencia específica (SPA) es el parámetro físico necesario para prever si el material sintetizado posee capacidad para elevar su temperatura hasta la transición LCST y así utilizarlo en liberación remota de fármacos. Para estas medidas sintetizamos el ferrogel de acuerdo al protocolo descrito en la sección anterior, en el mismo vial usado para las medidas, de 1 mL de capacidad. Las medidas de SPA se planearon para estudiar su dependencia con el campo aplicado, a frecuencia fija. Introducimos el gel en el DM2 a una frecuencia $f = 570kHz$ y una variación de campo de 8 a 25 kA/m.

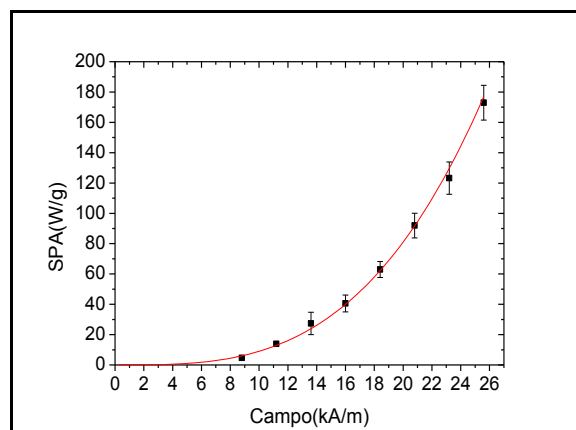


Figura 14: Valores del SPA del ferrogel en función del campo aplicado. El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante la función $SPA = cte \cdot H^\lambda$ con $\lambda = 3.2 \pm 0.1$, para evaluar desvíos de la aproximación LRT.

Es importante mencionar que, en el ferrogel, las MNPs están adheridas a las cadenas del polímero que lo compone, lo que anula el mecanismo de relajación de Brown como contribución al SPA. Sin embargo, puede verse en la Figura 14 que los valores a campos altos son apreciables, mostrando que la contribución de la relajación magnética (de Néel) al SPA es significativa. Ajustando la curva a la ecuación potencial planteada anteriormente $SPA \propto H^\lambda$, obtenemos un valor de $\lambda = 3.2 \pm 0.1$, que proporciona un valor que se aparta de $\lambda=2$ esperado en el rango de validez de la teoría de respuesta lineal (LRT). Este desvío se debe a que para los máximos campos aplicados ($H_0 \approx 25$ kA/m) la condición $H_0 \ll H_K$ no se satisface. Independientemente de las consideraciones anteriores, el valor absoluto de $SPA=173 \pm 11$ W/g medido en esta muestra de Alg+PNiPAAm+MNPs la torna un material viable para la liberación remota puesto que es posible alcanzar la temperatura de transición del polímero.

4. Experimento de liberación.

Para los experimentos de liberación se seleccionaron dos materiales diferentes: un ferrogel de Alg+PNiPAAm+MNPs sintetizado para este trabajo, y una muestra de formulación similar de Chi+PNiPAAm+MNPs (Chi= quitosano) cedido gentilmente por el Grupo de Nanomateriales Poliméricos del ICTP-CSIC, Madrid. Además, utilizamos dos fármacos de diferentes solubilidades en agua: Ibuprofeno y Rodamina-B. El experimento con Ibuprofeno se llevó a cabo con el gel sintetizado por nosotros en el laboratorio y el de Rodamina-B lo hacemos tanto con nuestro gel como con el gel producido por el grupo del ICTP-CSIC. En la Tabla 5 se resume la información para cada uno de los experimentos realizados.

Fármaco	Gel utilizado	Tipo de liberación
Ibuprofeno	INA	Espontánea/Dinámica (Anexo 7)
Rodamina-B	INA	Espontánea/Dinámica (Anexo 8)
	ICTP-CSIC, Madrid	Espontánea/ Dinámica

Tabla 5: Resumen de los experimentos llevados a cabo, en la que se especifica el tipo de gel utilizado así como el tipo de liberación.

4.1.1. Liberación del fármaco

En el diseño del experimento se pensó en hacerlo con Ibuprofeno, pero surgieron varios inconvenientes ya que no es soluble en agua, con lo que se utiliza un buffer de agua y EtOH, que presenta inconvenientes en aplicaciones *in vivo* y además nos daba una señal muy ruidosa debido a que su pico característico ($\lambda=264$ nm) se encuentra en la parte extrema de la lámpara de deuterio induciendo a errores por efecto de la radiación dispersada, no obstante, el experimento realizado se puede ver en el Anexo 7. Para seguir probando y ampliando nuestro sistema, pensamos en la Rodamina-B, que nos permitía utilizar la misma metodología, pero además de una manera más eficaz. La Rodamina-B es un fármaco soluble en agua y tiene un pico de absorción lumínica en el Visible ($\lambda=555$ nm, Figura 15).

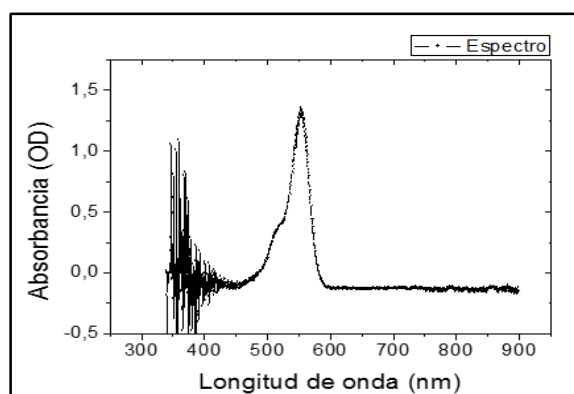


Figura 15: Pico de absorción lumínica de la Rodamina-B, en la imagen vemos representada la absorbancia en función de la longitud de onda. Vemos claramente que el piso está entorno a los 555nm. Imagen tomada durante la calibración dinámica.

La idea para liberar el fármaco es que se adsorba en el gel gracias a su estructura y que al utilizar la hipertermia magnética se aumente la temperatura contrayendo el gel y liberando nuestro fármaco. Realizamos dos pruebas distintas: la liberación espontánea y la liberación dinámica.

4.1.2. Liberación espontánea.

Para la liberación espontánea en primer lugar realizamos una curva de calibración, para esto se realizan distintas disoluciones de concentración conocida de Rodamina-B con agua Milli-Q y con el espectrofotómetro UV-VIS obtenemos distintas absorbancias en función de las concentraciones. En el Anexo 8 se pueden ver las concentraciones utilizadas y la recta de calibrado obtenida con la que podremos determinar la cantidad de fármaco que se libera espontáneamente por el gel.

Sumergimos el gel durante un día en el fármaco. Al día siguiente esa disolución en la que ha estado inmerso el gel se desecha y se añade 1 mL de agua Milli-Q al gel. Se espera durante 5 minutos y se mide la absorbancia con el espectrofotómetro y con la recta de calibración obtenemos la concentración de fármaco liberado. Repetimos cada 5 minutos durante 120 minutos y obtenemos la siguiente curva de liberación espontánea y de acumulado (adición de lo obtenido en cada medida):

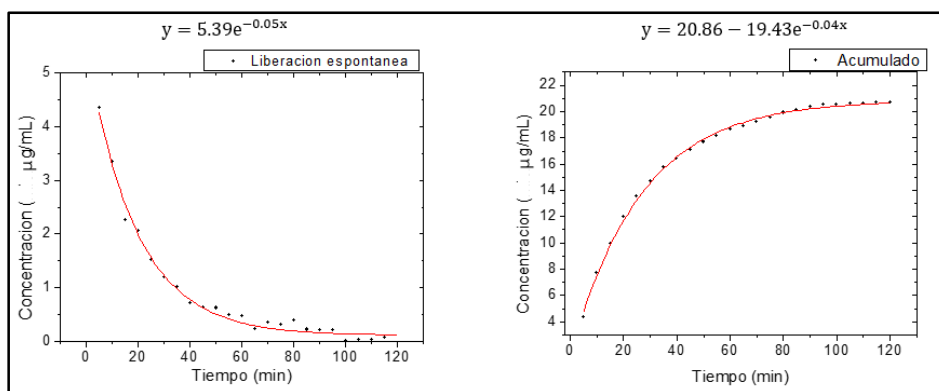


Figura 16: Panel izquierdo: evolución de la concentración de Rodamina-B liberada por el gel de manera espontánea. Podemos ver que después de aprox. 60 min la liberación es mínima. Panel derecho: concentración acumulada, con saturación en valores de 20 µg/mL.

4.1.3. Liberación dinámica.

La liberación dinámica se lleva a cabo en el montaje experimental de la Figura 17. En primer lugar, realizamos la calibración del mismo modo que hemos hecho en la liberación espontánea, pero teniendo en cuenta, que en este caso al estar el fluido en continuo movimiento, podemos estar introduciendo errores debidos a fluctuaciones que se derivan de la cinética del fluido, o pérdidas que puedan ocurrir en el bombeo del fluido.

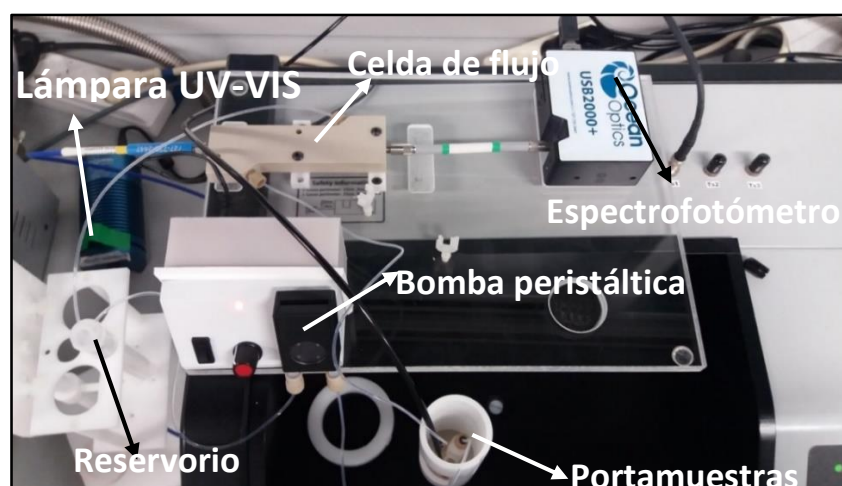


Figura 17: Montaje experimental para la liberación dinámica. La bomba mueve el líquido por el circuito, el gel se introduce en el espacio del campo magnético para liberar remotamente el fármaco.

Análogamente al caso espontáneo, tenemos concentraciones conocidas de disoluciones de Rodamina-B en agua Milli-Q y con el espectrofotómetro (UV-VIS) obtenemos distintas absorbancias en función de las concentraciones y del mismo modo que en el caso de la liberación espontánea, la recta nos permite determinar la cantidad de fármaco que se libera dinámicamente en el gel. (En el Anexo 8 se pueden ver las concentraciones utilizadas y la recta de calibrado, y experimentos).

Siguiendo el mismo protocolo al utilizado en la caracterización de la liberación espontánea, introducimos dos geles de diferente composición química en una disolución de 1 mL de Rodamina-B y lo dejamos un tiempo lo suficientemente grande para que se adsorba (~ 1-3 días). El primero de ellos corresponde con el sintetizado durante este trabajo y sus resultados en

función del campo se muestran en el Anexo 8, el segundo gel fue producido por el grupo de Nanomateriales Poliméricos del ICTP-CSIC, Madrid. Pasado este tiempo, introducimos el gel en el portamuestras de modo que hacemos circular agua Milli-Q por el circuito liberando parte del fármaco que contiene el gel y midiendo la concentración en tiempo real. Para $t < 22$ min la liberación espontánea del fármaco genera la curva exponencialmente decreciente que puede verse en la Figura 18, comenzando en valores de $\approx 0.5 \mu\text{g/mL}$ hasta valores de $\approx 0.1 \mu\text{g/mL}$. A esta parte de la curva la llamamos liberación espontánea, ya que no hay ningún estímulo externo sobre la muestra y la concentración liberada corresponde a la cinética 'natural' del ferrogel sumergido en agua pura. Cuando alcanzamos una región aproximadamente constante en el perfil de concentración versus tiempo ($t \approx 22$ min en la Figura 18) aplicamos un pulso de campo ($H_0 = 24 \text{ kA/m}$; $f = 550 \text{ kHz}$, $\Delta t \approx 4$ s) observando que durante la aplicación la temperatura del ferrogel aumenta hasta $T \approx 50 \text{ }^\circ\text{C}$, momento en el cual apagamos el campo. La respuesta del ferrogel es un pulso de concentración de Rod-B hasta valores de $0.7 \mu\text{g/mL}$, decreciendo luego hasta valores basales de $0.2 \mu\text{g/mL}$ para $t = 40$ min, como puede verse en la figura. Se aplicaron posteriormente cuatro pulsos consecutivos (min. 42, min. 62, min. 69, min. 73) con el mismo criterio de alcanzar la temperatura de 50°C (suficiente para garantizar la transición LCST del polímero) y apagar el campo. El proceso de liberación en cada pulso alcanzó picos de concentración máximos cuyos valores decrecen sucesivamente hasta $0.3 \mu\text{g/mL}$. Si bien la velocidad de respuesta del ferrogel al pulso de campo se mantiene esencialmente en los mismos valores, estimamos que es necesario modificar la estructura del polímero para ralentizar la cinética de liberación si se busca una aplicación farmacológica.

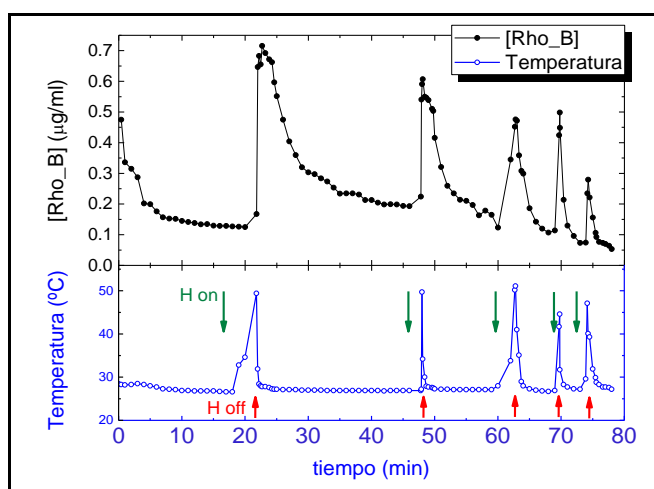


Figura 18: Liberación remota de Rod-B por aplicación de campos magnéticos. En función del tiempo, cada pulso de radiofrecuencia ($H_0 = 24 \text{ kA/m}$; $f = 550 \text{ kHz}$) de 10-30 s de duración es suficiente para elevar la temperatura del ferrogel hasta $T \approx 50^\circ\text{C}$, sobre la transición LCST. Las flechas verdes indican el instante de encendido del campo, y las rojas el de apagado.

5. Conclusiones.

El trabajo en el campo de la biomedicina es, fundamentalmente, un trabajo multidisciplinario. En este sentido, uno de los objetivos relevantes ha sido la aplicación de conceptos de la física de la materia condensada y el nanomagnetismo adquiridos durante mi carrera al problema multidisciplinario de la liberación de fármacos, participando en un equipo de trabajo que involucra a físicos, químicos, ingenieros y biólogos. Considero por tanto que un resultado central de mi trabajo ha sido la adquisición de un conjunto de conceptos básicos de dichos campos, así como las herramientas de comunicación e interacción con colegas de otras áreas.

En relación a los objetivos específicos, este trabajo requirió varias etapas sucesivas: a) la síntesis del material, incluyendo la optimización magnética de las MNPs y el gel termosensible; b) la química de conjugación del fármaco utilizado con las MNPs y el gel; c) el montaje y puesta a punto del dispositivo de liberación dinámica y medición espectrofotométrica; d) el análisis de los resultados y e) la aplicación de dichos resultados iniciales en posteriores secuencias de optimización del dispositivo de liberación.

Tras la realización de este trabajo podemos decir que los objetivos principales de éste han sido alcanzados. Hemos diseñado un sistema de liberación de fármacos con ferrogel que es aplicable también a la liberación con MNPs gracias a su diseño con barreras mecánicas y magnéticas para impedir el paso de MNPs a los organismos donde se quiera liberar el fármaco. En la etapa final hemos realizado con éxito pruebas de liberación dinámica de fármacos medida en tiempo real, y contrastada por medio de dos ferrogel y dos fármacos diferentes. Asimismo, hemos cuantificado la liberación y estimado los límites de detección en las condiciones actuales, realizando algunas proyecciones y mejoras como propuestas futuras.

La síntesis de MNPs resultó en una serie de coloides magnéticos con distribución de tamaños estrecha. Se sintetizó una serie de muestras con diferentes anisotropías magnéticas buscando la respuesta óptima para el calentamiento inductivo. La caracterización físico-química de las MNPs mostró claramente que la magnetita Fe_3O_4 es el material con anisotropía magnética y tamaño medio más próximo a los valores óptimos para fines de calentamiento inductivo, obteniendo valores de SPA suficientemente altos para generar elevaciones de temperatura y disparar los procesos térmicos en los ferrogel termosensibles. Si bien hemos producido MNPs cargadas con Ibuprofeno y caracterizado con éxito la liberación del fármaco en experimentos estáticos, para los experimentos de liberación dinámica nos hemos concentrado exclusivamente en el uso de ferrogel, es decir, homopolímeros hidrofílicos cuya síntesis se realizó con Alginato, PNiPAAm y MNPs de Fe_3O_4 .

Distintas pruebas con dos fármacos diferentes sugieren distintos problemas. En pruebas de liberación con Ibuprofeno, la baja solubilidad en agua es un problema (común a muchos fármacos) que se solventó parcialmente mediante un buffer de agua y EtOH, si bien esta solución plantea evidentes obstáculos para aplicaciones *in vivo*. También la respuesta UV-VIS del Ibuprofeno plantea una dificultad técnica, ya que el pico de absorbancia en $\lambda=264$ nm corresponde a una región del espectro en la que las fuentes de luz presentan un considerable ruido en la línea base. Evidentemente si se dispusiera de una lámpara centrada en el ultravioleta, la reproducibilidad de los experimentos mejoraría notablemente, aunque el salto cualitativo que esto implica en los costes del dispositivo podría representar un problema para aplicaciones rutinarias o de campo.

Las pruebas de concepto con Rodamina-B (Rod-B, $\lambda=555$ nm) resultaron en medidas mucho más fiables y menos ruidosas. En este caso, el ferrogel sintetizado en el laboratorio mostró una capacidad medible de absorción y liberación de Rod-B, si bien la cinética de liberación es demasiado rápida (minutos) para una aplicación clínica y debe por tanto ser aún mejorada. La utilización de ferrogels optimizados de PNIPAAm y MNPs de Fe_3O_4 (producidos por el grupo de Nanomateriales Poliméricos del ICTP-CSIC, Madrid) resultó en una mejor absorción del fármaco y una liberación más controlada debido a una transición LCST más definida. Los experimentos realizados demuestran que el proceso de liberación es reproducible, y extrapolable a otros fármacos, cuyos requerimientos de solubilidad y absorbancia específica determinaran el tipo de materiales termosensibles a ser usados como soporte.

6. Bibliografía.

1. Akbarzadeh A., Samiei M., Davaran S., 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*, 7:144.
2. García Jimeno, S. (2012). Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas pp3-11. [Tesis doctoral] Universidad de Barcelona, Barcelona
3. Goya, G.F., Grazú, V., Ibarra, M.R., Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Current nanoscience*, 4(2008) pp1-16.
4. Salunkhe, A., Khot, V. and Pawar, S. (2014). Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review pp1-3. 2014 Bentham Science Publishers.
5. Suit, H. and Shwayder, M. Hyperthermia: potential as an Anti-Tumor Agent Cancer. 122-129, 1974, Vol. 34.
6. Gordon, R. T., Hines, J. R, and Gordon, D. *Med. Hypothesis*, 1979, 5, 83.
7. Torres Molina, T. (2008). Nanopartículas magnéticas para Hipertermia Y MRI pp16-20. [Trabajo Fin de Máster] Zaragoza.
8. Poudel, C. (2014). Inverted Linear Halbach Array for Separation of Magnetic Nanoparticles pp9-16. [Thesis] Oberlin College.
9. Zamora-Mora, V., Fernández-Gutiérrez, M., González-Gómez, Á., Sanz, B., San Román, J., Goya, G., Hernández, R. and Mijangos, C. (2016). Chitosan nanoparticles for combined drug delivery and magnetic hyperthermia: From preparation to in vitro studies pp361-365. *Carbohydrate Polymers*. ScienceDirect.
10. Hoare, T., Timko, B., Santamaria, J., Goya, G., Irusta, S., Lau, S., Stefanescu, C., Lin, D., Langer, R. and Kohane, D. (2017). Magnetically Triggered Nanocomposite Membranes: A Versatile Platform for Triggered Drug Release. *NANO Letters*.
11. Golovin, Y., Klyachko, N., Gribovskii, S., Golovin, D. and Majouga, A. (2016). Model of controlled drug release from functionalized magnetic nanoparticles by a nonheating alternating-current magnetic field pp89-95. *Письма в Журнал Технической Физики*.
12. Adams, P. (1995). Determining Iron Content in Foods by Spectrophotometry pp649-651. Volume 72. Frostburg.
13. Quintili, M. (2012). *Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño*. Buenos Aires.
14. Nobbmann, U. (n.d.). Protein sizing by light scattering, molecular weight and polydispersity pp17-25. Malvern Instruments.

15. Sanz, B., Calatayud, M., De Basi, E., Lima Jr., E., Vasquez Mansilla, M., Zysler, R., Ibarra, M. and Goya, G. (2016). In Silico before In Vivo: how to predict the heating efficiency of magnetic nanoparticles within intracellular space pp1-8. Scientific Reports.
16. Avilés Félix, L. (n.d.). Implementación de un Magnetómetro de Muestra Vibrante para la caracterización de Materiales Magnéticos pp1-8. Researchgate.
17. Smith, G. (2009). The Development of a Low-Cost Microfluidic Magnetic Separation System pp13-20. [Thesis] Victoria University of Wellington, Wellington.
18. Blanco Gutiérrez, V. (2011). Propiedades magnéticas de nanopartículas de ferritas de MFe_2O_4 (M: elemento de transición) pp11-20. [Tesis doctoral] Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
19. Klouda, L. and Mikos, A. (2008). Thermo-responsive hydrogels in biomedical applications -a review pp1-9. Eur J Pharm Biopharm, Houston, USA.
20. Bruvera, I., Hernández, R., Mijangos, C. and Goya, G. (2014). An integrated device for magnetically-driven drug release and in situ quantitative measurements: Design, fabrication and testing pp446-451. Journal of Magnetism and Magnetic Materials.
21. Wang, X., Wu, Z., Li, J., Pan, G., Shi, D. and Ren, J. (2016). Preparation, characterization, biotoxicity, and biodistribution of thermo-responsive magnetic complex micelles formed by $Mn_{0.6}Zn_{0.4}Fe_2O_4$ and a PCL/PEG analogue copolymer for controlled drug delivery. The Royal Society of Chemistry.
22. Rahimi, M., Shojaei, S., Safa, K., Gihaseemi, Z., Salehi, R., Yousefi, B. and Shafiei-Irannejad, V. (2013). Biocompatible magnetic tris (2-aminoethyl) amine functionalized nanocrystalline cellulose as a novel nanocarrier for anticancer drug delivery of methotrexate pp1-5. The Royal Society of Chemistry.
23. Ward, M. and Georgiou, T. (2011). Thermo-responsive Polymers for Biomedical Applications pp1215, 1223, 1230-1231. University of Hull.