

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EN HIDROGELES
PARA POSIBLES TRATAMIENTOS DE HIPERTERMIA**

**NATALIA MARIN MATHIEU
LILIBETH ORTEGA PINEDA**

**Trabajo de grado para optar al título de
Ingeniera Biomédica**

Ph.D Martha Elena Londoño López



**UNIVERSIDAD EIA—UNIVERSIDAD CES
INGENIERÍA BIOMÉDICA
ENVIGADO
2017**

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la directora Martha Elena Londoño López por su entrega, dedicación, y cada aporte durante el desarrollo de la presente investigación que permitió un agradable, positivo y beneficioso trabajo en equipo.

Gracias a nuestros padres por darnos la oportunidad y el apoyo incondicional durante el proceso para alcanzar nuestras metas.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

CONTENIDO

	pág.
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EN HIDROGELES PARA POSIBLES TRATAMIENTOS DE HIPERTERMIA	1
INTRODUCCIÓN	13
1. PRELIMINARES	14
1.1 Planteamiento del problema	14
1.1.1 Contexto y caracterización del problema	14
1.1.2 Formulación del problema	15
1.2 Objetivos del proyecto.....	15
1.2.1 Objetivo General.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
1.3 Marco de referencia	15
1.3.1 Nanopartículas Magnéticas	15
1.3.1.1 Nanopartículas supermagnéticas (SPIONs).....	16
1.3.2 Hidrogeles termosensibles	18
1.3.2.1 Alginato y quitosano.....	19
1.3.3 Síntesis de Nanopartículas Magnéticas.....	20
1.3.3.1 Métodos Físicos.....	20
1.3.3.2 Métodos Químicos.....	20
1.3.3.2.1 Síntesis por precipitación y reducción	20
1.3.3.2.2 Microemulsión	21
1.3.3.2.3 Reacciones hidrotermales de alta temperatura.....	21
1.3.3.2.4 Reacciones sol-gel.....	21

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.3.3 Variables de la síntesis.....	22
1.3.3.3.1 Temperatura.....	22
1.3.3.3.2 Estabilizadores.....	22
1.3.4 Métodos de Obtención de Hidrogeles.....	24
1.3.4.1 Emulsiones.....	24
1.3.4.2 Congelamiento/Descongelamiento	24
1.3.5 Técnicas de Caracterización	24
1.3.5.1 Estructurales.....	24
1.3.5.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	24
1.3.5.1.3 Microscopía de Transmisión (TEM)	25
1.3.5.1.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)	25
1.3.5.1.5 Potencial Z	26
1.3.5.2 Composicionales	28
1.3.5.2.1 UV-Visible	28
1.3.5.2.2 Espectroscopía de Infrarrojo	28
1.3.5.2.3 Difracción de rayos X (DRX)	29
1.3.5.3 Citotoxicidad	29
1.3.5.3.1 Ensayo MTT.....	29
1.3.6 Aplicaciones.....	30
1.3.6.1 Administración controlada de fármacos.....	30
1.3.6.2 Tratamientos de hipertermia.....	31
1.3.6.3 Imágenes de Resonancia Magnética.....	31
2 METODOLOGÍA.....	32

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2.1	Síntesis y encapsulación de las nanopartículas magnéticas en el hidrogel.	32
2.1.1	Síntesis de MNPs por método de co-precipitación	32
2.1.2	Síntesis de micro-nano hidrogeles de alginato-quitosano y encapsulación de MNPs	35
3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS	37
3.1	Propiedades Magnéticas.....	37
3.1.1	Prueba de magnetismo.....	37
3.2	Propiedades Estructurales	37
3.2.1	Microscopía óptica.....	37
3.2.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
3.2.3	Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).....	37
3.2.4	Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	38
3.3	Propiedades Composicionales.....	38
3.3.1	Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)	38
3.3.2	Energía de Dispersión de Rayos X (EDX)	39
3.3.3	Difracción de Rayos X (DRX)	39
3.4	Citotoxicidad	39
3.4.1	Ensayo MTT	39
4.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
4.1	Síntesis de MNPs por método de co-precipitación.....	41
4.2	Obtención de micro-nano hidrogeles de alginato/quitosano	42
4.3	Propiedades Magnéticas.....	44
4.4	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	45
4.5	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	46

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.6	Dispersión de luz dinámica (DLS).....	50
4.7	Espectroscopía Infrarrojo (FTIR).....	52
4.8	Difracción de rayos X (DRX)	54
4.9	Ensayo MTT.....	56
5.	CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....	59
	REFERENCIAS.....	61
6.	ANEXOS.....	66

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquemático Interacción entre M-H(Kayode & Abdul, 2016).	17
Figura 2. Estructura química del alginato.	20
Figura 3. Estructura química del quitosano.	20
Figura 4. Esquemático funcionamiento DLS	26
Figura 5. Esquemático Pontencial Z.....	27
Figura 6. Estructura MTT y formazan coloreado (Riss et al., 2016)	30
Figura 7. Montaje síntesis MNPs. 1. Soporte universal; 2. Bureta; 3. Plancha térmica; 4.Termocupla; 5. pH-metro.....	33
Figura 8. Proceso de la síntesis de MNPs.....	34
Figura 9. Proceso de estabilización de las MNPs.	35
Figura 10. Proceso de síntesis de micro-nano hidrogeles y encapsulación de MNPs.	36
Figura 11. Metodología para la prueba de MTT.	40
Figura 12. a) Soluciones de Cloruro de Hierro. b) Cambio de color durante la síntesis de MNPs.....	41
Figura 13. Comportamiento del pH durante el tiempo de síntesis.....	42
Figura 14. Micro-nano hidrogeles a) forma líquida y b) forma seca.	43
Figura 15.Propiedades de atracción magnética de las MNPs.	44
Figura 16. Imágenes de SEM de microhidrogeles.....	45
Figura 17. Imágenes de TEM de MNPs: a) con agua, b) AO y c) AO + carbonato de sodio d-e-f) encapsuladas dentro de los micro-nano-hidrogeles.....	46
Figura 18. Imágenes de TEM de MNPs.	47

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Figura 19. Resultados EDX: a) MNPs, b) MNPs+AO y c) MNPs+AO+ carbonato.	49
Figura 20. Distribución de intensidad normalizada: a) MNPs en agua, b) MNPs+AO, c) MNPs+AO+carbonato.	50
Figura 21. Espectroscopia de infrarrojo: a) MNPs, b) AO, c) MNPs+AO.....	52
Figura 22. Difractogramas de: a) MNPs en agua, b) MNPs+AO y c) MNPs+AO+carbonato.	54
Figura 23. Curva de calibración.....	56
Figura 24. Niveles de viabilidad celular.	56

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

LISTA DE ECUACIONES

pág.

Ecuación 1. Ecuación Stokes-Einstein.....	25
Ecuación 2. Reacción final proceso de síntesis de MNPs.....	32

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Protocolo síntesis de nanopartículas magnéticas.	66
Anexo 2. Protocolo síntesis de microhidrogeles de alginato-quitosano.....	70
Anexo 3. Protocolo encapsulación de nanopartículas magnéticas en microhidrogeles de alginato-quitosano.....	74
Anexo 4. Protocolo para la preparación de las muestras y rejillas para TEM.....	76
Anexo 5. Protocolo preparación de muestras para Espectroscopía de Infrarrojo..	78
Anexo 6. Protocolo preparación de muestras para Dispersión de Luz Dinámica. .	80
Anexo 7. Protocolo preparación de muestras para Difracción de Rayos X.	81
Anexo 8. Protocolo evaluación de citotoxicidad: Ensayo MTT	82

RESUMEN

Los tratamientos para el cáncer implementados actualmente son invasivos y tóxicos para el cuerpo, produciendo efectos secundarios irreversibles en el paciente. Por esa razón, se requieren de nuevos sistemas alternativos para el tratamiento del cáncer, uno de estos es la hipertermia nano-magnética, esta nueva técnica tiene el fin de reducir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

Este trabajo se basó en el desarrollo de un sistema de hidrogeles magnéticos termosensibles a partir de la síntesis de nanopartículas magnéticas (MNPs) por el método de co-precipitación usando cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) como sales precursoras e hidróxido de amonio (NH_4OH) como reductor de la reacción, además se usó ácido oleico (AO) y carbonato de sodio (Na_2CO_3) para proporcionar buena dispersión de las MNPs. Los hidrogeles fueron sintetizados a base de alginato/quitosano con el uso de tripolifosfato como entrecruzante de la reacción. Finalmente, se usó la técnica de ultrasonido para realizar la encapsulación de las MNPs dentro de los hidrogeles.

Para comprobar las diferentes características del sistema, este fue caracterizado a nivel morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) y dispersión de luz dinámica (DLS); a nivel composicional fue caracterizado mediante difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia de infrarrojo (FTIR); y a nivel de toxicidad mediante el ensayo MTT. Las MNPs obtenidas muestran forma esférica, con tamaño de partícula entre $6,5 \pm 1,5 - 16,1 \pm 4,5$ nm. Las fases cristalinas presentes en el sistema fueron magnetita y maghemita correspondiente a las fases de hierro. Los hidrogeles obtenidos tienen forma esférica y muestran buena dispersión, además, se lograron sintetizar en tamaño micro y nano métrico. El sistema nanopartícula-hidrogel mostró aumentar la viabilidad celular hasta un 15% con respecto a las partículas sin encapsular. Además, las MNPs sin encapsular afectan la viabilidad celular aproximadamente en un 50% a altas concentraciones, el cual es un resultado interesante con respecto a estudios reportados actualmente.

Palabras claves: nanopartículas magnéticas, hipertermia, hidrogeles, alginato/quitosano, cáncer, TEM, SEM, DLS, DRX, FTIR, MTT.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

ABSTRACT

Current cancer treatments are invasive and toxic for the body, producing irreversible side effects on patients. For this reason, an alternative system is required for cancer therapies such as nano-magnetic hyperthermia, this novel technique is aimed at reducing side effects of conventional treatments.

This research was based on the development of a thermosensitive magnetic hydrogels system, from the synthesis of magnetic nanoparticles (MNP) by co-precipitation method using ferric chloride (FeCl_3) and ferrous chloride (FeCl_2) as precursors, and ammonium hydroxide as the reaction reducer; moreover, oleic acid (AO) and sodium carbonate (Na_2CO_3) were used to reduce the particles aggregation. The hydrogels were synthesized on alginate/chitosan using tripolyphosphate as the crosslinker for this reaction. Furthermore, an ultrasonic technique was implemented to get the MNPs encapsulation within the hydrogels.

To test the system, a wide variety of characterization techniques took place in order to analyze the system from different outlooks; morphologically, electron transmission microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS); structurally, X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR) were used; besides, the MTT test were implemented to determine toxicity. The MNPs show a spherical shape, with a particle size between $6,5 \pm 1,5 - 16,1 \pm 4,5$ nm. The crystalline phases presented in the samples are magnetite and maghemite corresponding to the iron phases. The hydrogels present a spherical shape and well dispersion in the solution; also, micro and nanometric hydrogels were obtained. The nanoparticle-hydrogel system tends to improve cellular viability up to 15% compared to the non-encapsulated particles. The outcome is thrilling related to reported studies due to higher MNPs concentrations turned out to be medium cell viable.

Keywords: magnetic nanoparticles, hyperthermia, hydrogels, alginate/chitosan, cancer.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los avances que se han desarrollado como tratamientos para el cáncer están basados en radiación ionizante como los rayos X, que son la fuente que suministra la energía necesaria para erradicar tumores. Las tecnologías de punta como acelerados lineales y radio terapia robotizada son los últimos avances en tratamientos del cáncer, sin embargo, presentan retos interesantes en cuanto a la reducción de área sana expuesta a los rayos X emitidos. Una alternativa novedosa es el uso de nanopartículas magnéticas como una herramienta potencial que disminuye los efectos adversos presentes en las terapias convencionales para el tratamiento de cáncer; estas nanopartículas son usadas como vehículos de transporte de moléculas que generan terapia destructiva en el tumor, agentes de contraste y tratamientos térmicos. Mediante un campo magnético externo se puede controlar el ingreso de estas partículas y ser guiado hasta el sitio de terapia.

Las nanopartículas magnéticas son tóxicas a ciertas concentraciones y su ingreso en el cuerpo está limitado porque provoca lesiones a nivel celular. Por tal razón, es necesario realizarles un recubrimiento que les confiera biocompatibilidad y asegurar que su efecto adverso sea en las células tumorales.

Con esta investigación se desarrollaron protocolos para la síntesis de nanopartículas magnéticas y la encapsulación dentro de hidrogeles termosensibles de alginato/quitosano como un sistema de potencial aplicación para tratamientos de hipertermia. En este informe se describe la metodología empleada para el desarrollo del sistema nanopartícula-hidrogel, la síntesis de las nanopartículas, el desarrollo de hidrogeles termosensibles y la implementación de la encapsulación de las nanopartículas dentro de los hidrogeles. Además, se presentan la caracterización de la morfología, composición, estructura, y toxicidad a partir de viabilidad celular del sistema.

La contribución de esta investigación fue en la fabricación del sistema nanopartícula-hidrogel donde se consiguió obtener hidrogeles de tamaño en la escala micrométrica-nanométrica que eventualmente facilitará la manipulación del sistema dentro del cuerpo humano. Este sistema se considera viable para ser usado como método de hipertermia permitiendo la destrucción de células tumorales debido a sus propiedades termosensibles y magnéticas. Finalmente, los resultados obtenidos indican una iniciativa en investigación de pruebas clínicas.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1. PRELIMINARES

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 Contexto y caracterización del problema

El cáncer constituye todo un grupo de enfermedades que trae consecuencias a nivel financiero, emocional y social tanto para el paciente como para el ambiente en el cual se desenvuelve. Especialmente, en países subdesarrollados como Colombia estas repercusiones son de índole mayor, pues los avances tecnológicos, el conocimiento en el campo y el sistema de salud actual no permiten un buen desarrollo para la prevención o tratamiento de estas enfermedades. Según datos estadísticos proporcionados por el proyecto Globocán, para Colombia en el año 2012 se estimó que cada día 196 personas se enfermaban de cáncer y 104 morían por esta enfermedad (M, Huertas, C, & G, 2015). Estas cifras han llevado tanto al país como al Instituto Nacional de Cancerología a la búsqueda de nuevas alternativas para orientar y organizar las actividades y tratamientos en torno al control del cáncer, pero aún no se registra algún progreso (“Plan nacional para el control del cáncer en Colombia 2012-2020”, 2012).

Actualmente, el tratamiento de este tipo de enfermedades se suma a las consecuencias ya definidas previamente, ya que en su mayoría son procedimientos invasivos y tóxicos para el cuerpo. Como ejemplo de estos tratamientos se encuentra la cirugía, procedimiento por el cual el paciente es sometido a una eliminación del tejido canceroso, que no siempre resulta como la solución definitiva, por lo que se requiere de otros tipos de tratamientos como lo es la quimioterapia y la radioterapia, procedimientos que son igualmente de invasivos que la cirugía. En el caso de la radioterapia, el paciente es expuesto a radiaciones ya sean externas o internas mediante un dispositivo implantado que destruye las células cancerosas; y en cuanto a la quimioterapia se trata de una medicación de acción fuerte que es inyectada a través de las venas o también puede ser administrada oralmente con el fin de atacar por medio de fármacos las células cancerosas. Posteriormente, la exposición del paciente a estos procedimientos altamente invasivos y tóxicos conlleva a la eliminación no solo de las células malignas sino de las células buenas que rodean las zonas afectadas por el cáncer, o que al viajar por el torrente sanguíneo afecta a los tejidos cercanos, lo que provoca en el paciente efectos secundarios como lo es la pérdida de cabello, la pérdida de apetito, vómito, cansancio, cambios en la piel, entre otras más (American Cancer Society, 2015).

A pesar de que existen tratamientos con el fin de disminuir tales efectos secundarios, como lo es la liberación controlada de fármacos, estos métodos y sistemas implementados para el tratamiento de enfermedades resultan ser terapias estáticas, los resultados son un poco lentos y en su mayoría podrían ser nulos, dado

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

a la incapacidad de mantener el fármaco en la ventana terapéutica requerida, puesto que si el nivel de droga excede esta ventana será tóxico el medicamento y si está por debajo de este no es efectivo (Armijo, J.A, Florez, J., & Mediavilla, A., 2008).

1.1.2 Formulación del problema

Se requiere de un sistema alternativo para tratamientos de cáncer como la hipertermia, con el fin de reducir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

1.2 Objetivos del proyecto

1.2.1 Objetivo General

Proponer un protocolo para la encapsulación de nanopartículas magnéticas en un hidrogel, para su posterior aplicación en tratamientos de hipertermia.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener nanopartículas magnéticas a partir de óxidos de hierro mediante procesos de síntesis húmedas.
- Desarrollar hidrogeles a base de polímeros termosensibles como alginato, gelatina y/o quitosano.
- Implementar el procedimiento para la encapsulación de nanopartículas magnéticas en el hidrogel.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas (composicionales y estructurales) y de citotoxicidad de los hidrogeles magnéticos.

1.3 Marco de referencia

1.3.1 Nanopartículas Magnéticas

Los nanomateriales han adquirido gran interés debido a las características que su tamaño les confiere y, además a las posibles aplicaciones que ofrecen. Ejemplo de esto se encuentran las nanopartículas magnéticas (MNPs), que han obtenido igual interés gracias a las propiedades físicas que posee, también, su tamaño y su comportamiento magnético le permite interactuar a nivel celular. Las nanopartículas magnéticas en su forma más sencilla son constituidas por un núcleo magnético lo que les permite ser guiadas y focalizadas en las zonas de interés específicas, esta característica proporciona una aplicación en la biomedicina como la liberación controlada de fármacos. Otra de las aplicaciones potenciales de estas

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

nanopartículas se encuentra en el tratamiento de enfermedades con métodos de hipertermia, por ejemplo, en enfermedades como el cáncer las MNPs son excitadas a tal punto que el calor emitido por estas es capaz de matar a las células cancerígenas. Finalmente, para que estas nanopartículas mejoren su especificidad y biocompatibilidad, se requiere de una biofuncionalización o de un recubrimiento de polímeros (Ramos, 2011).

1.3.1.1 Nanopartículas supermagnéticas (SPIONs)

La propiedad magnética de algunos materiales es entendida por poseer comportamiento magnético. Existen 5 tipos básicos de formas magnéticas exhibidas por los materiales, estas son: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo y ferromagnetismo; estas clasificaciones se deben a la susceptibilidad magnética (λ) que presentan cada uno de estos tipos de comportamientos en presencias a energías externas o campos magnéticos externos, la mayoría de estos tipos de comportamiento se le atribuye a los materiales que en los subniveles 3d y 4f de energía los electrones son parcialmente desapareados (Faraji, Yamini, & Rezaee, 2010).

Adicionando, existe un fenómeno llamado superparamagnetismo el cual ocurre cuando fluctuaciones termales o campos magnéticos aplicados pueden mover fácilmente los momentos magnéticos de las partículas estando lejos del eje fácil, conocido como la dirección energéticamente favorable de magnetización espontánea (Faraji et al., 2010), (Kayode & Abdul, 2016) el superparamagnetismo ocurre cuando las partículas poseen *Single Domain*, es decir, que los campos magnéticos de sus átomos se encuentran alineados y agrupados en una misma dirección.

Otros autores (Kayode & Abdul, 2016) explican el comportamiento magnético a partir de la respuesta magnética de los materiales en efecto de la aplicación de un campo magnético externo, clasificando los materiales en tres grupos principales: diamagnetismo, paramagnetismo y ferromagnetismo. Sin embargo las partículas ferromagnéticas y materiales ferrimagnéticos (subgrupo del ferromagnetismo) pueden presentar superparamagnetismo. En la Figura 1 se puede apreciar la interacción del Momento magnético (M) con un campo magnético externo (H) de los diferentes grupos mencionados por los autores.

En aplicaciones biomédicas es necesario que los sistemas magnéticos presenten valores de magnetización altos, dicho comportamiento es presentado por partículas superparamagnéticas, las cuales como se puede apreciar en la Figura 1 en ausencia de un campo magnético externo dichos materiales no presentan magnetización o también llamado *hysteresis loop* con respecto a los otros tipos que aun así no exista una estimulación externa el material concibe un remanente campo

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

magnético, y es este el punto que hace de estas partículas interesantes como un foco de estudio.

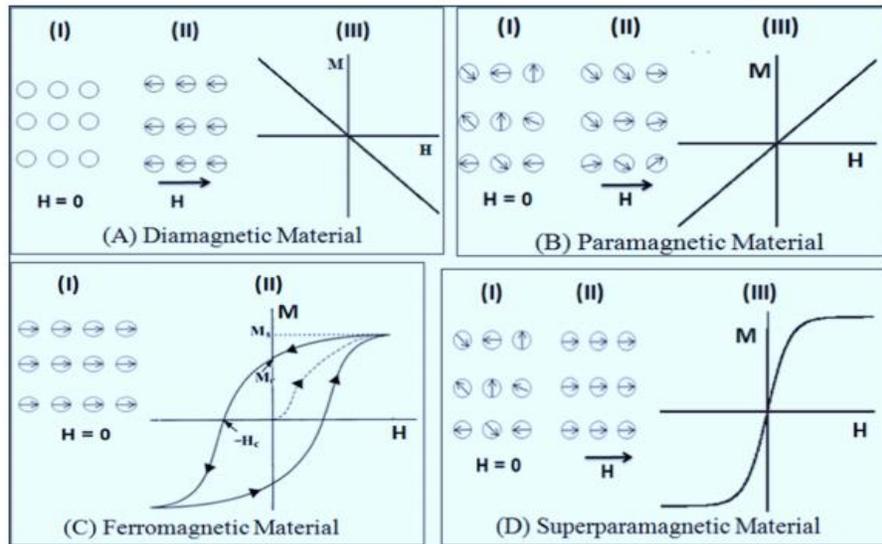


Figura 1. Esquemático Interacción entre M-H(Kayode & Abdul, 2016).

En investigaciones previas han reportado diferentes configuraciones para sistemas de SPIONs en innumerables aplicaciones en el campo biomédico, como herramienta que facilite el diagnóstico y terapias de diferentes enfermedades, como lo son tratamientos mediante hipertermia, imágenes de resonancia magnética, terapia con radionúclidos asistidos por campo magnético, sistemas de transporte de medicamentos, sensores biológicos, agentes de diagnóstico/terapia, ingeniería regenerativa, etc. Sin embargo para que pueda ser útil en las anteriores aplicaciones es necesario determinar diferentes factores que influyen en su aplicación final como son la forma, el tamaño y recubrimientos superficiales. En tratamientos de cáncer mediante la hipertermia (Kandasamy & Maity, 2015) reportan el potencial resultado de SPIONs en tratamientos de cáncer *in vivo* e *in vitro*, donde *nanoclusters* magnéticos con un tamaño de 14 nm logró matar el 74% de células cancerígenas tipo MCF-7 en condiciones *in vitro* con un tiempo de terapia de 1 hora manteniendo la temperatura a 45 °C la cual está en el rango(42-45 °C) donde es efectiva la hipertermia.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.2 Hidrogeles termosensibles

Los hidrogeles son un tipo de material que son caracterizados por su buena capacidad de absorber agua, este comportamiento conocido como hidrofilia es debido a los grupos funcionales como: -OH, -COOH, -CONH₂ y -SO₃H. Estos materiales son obtenidos por medio de polimerización y el entrecruzamiento de uno o varios monómeros, las características de estos monómeros y el grado de entrecruzamiento son los que determinan la propiedad de hinchamiento (absorber agua), y por ende sus posibles aplicaciones, que entre las más comunes se encuentran: liberación controlada de principios activos, membranas de hemodiálisis, dispositivos para diagnóstico y sustrato para el cultivo de células (Pol, 2002).

Los hidrogeles son usados en varias aplicaciones biomédicas como membranas, biosensores, órganos artificiales, sistemas de liberación controlada de medicamentos, ingeniería de tejidos y cobertura de heridas. Su naturaleza en cuanto a suavidad y elasticidad los hace atractivos en cuanto a sus propiedades mecánicas. Además, son materiales reconocidos por su alta biocompatibilidad y por su propiedad de biodegradación, poca toxicidad y actividad antimicrobiana. (Yar, Shahzad, Shahzadi, et al 2016).

En los últimos años se han mostrado desarrollos en cuanto a los diferentes tipos de hidrogeles, como por ejemplos aquellos que son sensibles a cambios de temperatura, y se ha visto que cambios en este parámetro provoca cambios estructurales en el hidrogel y potencia sus aplicaciones. En estos casos, el hidrogel es calentado debido a la temperatura corporal interna produciendo su deshinchamiento, lo que libera el fármaco en el área donde se encuentre el hidrogel (Nuevos, Universidad, Ehu, & Facultad, n.d.).

Un ejemplo de los hidrogeles termosensibles es el quitosano, polisacárido mayormente disponible en la naturaleza, este material es obtenido a través de recursos marinos, tiene una gran propiedad de establecer proliferación y además diferenciación celular. Según Yar, Shahzad, Shahzadi, et al existen varios métodos de modificación del quitosano con los cuales se pueden lograr mejores propiedades fisicoquímicas como mejora de la solubilidad, viscosidad, eficiencia en el transporte y liberación de fármacos y actividades antioxidativas. Este tipo de modificaciones químicas requieren de otros tipos de compuestos como por ejemplo el PVA, este polímero sintético tiene la capacidad de proveer porosidad y hacer la superficie hidrofílica, lo cual interactúa muy bien en el tejido humano. Este compuesto ha sido altamente usado en aplicaciones biomédicas debido a su compatibilidad con la sangre. También es un polímero no carcinogénico y con gran habilidad de hincharse en soluciones acuosas (Yar, Shahzad, Shahzadi, et al 2016).

Adicionalmente, los hidrogeles hechos a base de quitosano han mostrado un comportamiento sensible al pH lo cual los hace solubles en altos niveles de acidez

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

e insolubles en medios alcalinos. Según estudios presentados por Treenate & Monvisate, demuestran que la modificación de quitosano con hidroxietilacrilato ha reportado buen comportamiento, pues tiene facilidad de disolverse en temperaturas mayores a la corporal permitiendo así mezclarse con otros componentes sin necesidad de soluciones acidas. Además, esta propiedad le permite controlar la liberación de fármacos de una manera más eficiente, ya que el hidrogel no se disolverá inmediatamente entra en contacto con el cuerpo; sin embargo, las aplicaciones que se derivan de este sistema están restringidas en la liberación controlada de fármacos, ya que suelen disolverse a niveles de pH bajos llevando así a una rápida liberación en ambientes gástricos (Treenate & Monvisate, 2017).

Otro tipo de hidrogel termosensible es el alginato de sodio, este polímero natural es extraído de algas marinas. Los hidrogeles hechos a base de alginato de sodio suelen ser usados en tratamientos para liberación controlada de fármacos debido a la facilidad de formar redes tridimensionales cuando están en contacto con cationes de metales multivalentes como Ca, Zn, Cu, etc. Además, este compuesto tiene la propiedad de ser sensible al pH, es decir que a niveles de acidez muy bajos el hidrogel se reduce y a niveles alcalinos o neutros el hidrogel se hincha. Con esto se ha demostrado que los sistemas de liberación con este tipo de hidrogel son relativamente lentos en pH ácidos (Treenate & Monsalve, 2017). El reto entonces, en la síntesis del hidrogel es unir ambas propiedades de sensibilidad al pH en hidrogeles a base de alginato y quitosano, para que independientemente del nivel de acidez que haya en el medio el hidrogel no vaya a liberar el medicamento sin haber llegado al lugar deseado.

1.3.2.1 Alginato y quitosano

El quitosano es un copolímero β -[1-4]-unido a - 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxy-D glucopiranososa (Berger, Reist, Mayer, Felt, & Gurny, 2004), ver Figura 3. Estructura química del quitosano. Figura 3. Este material es biodegradable, biocompatible y no tóxico. El alginato es un heteropolisacarido sin ramificar de [1-4] –unido a β -D-ácido manurico (M) y α -L-ácido gulurónico (G) de composición altamente variable y estructura secuencial (Simó, Fernández-Fernández, Vila-Crespo, Ruipérez, & Rodríguez-Nogales, 2017), ver Figura 2.

La interacción entre el alginato y quitosano ocurre por una unión electrolítica (PEC), es decir, a partir de interacciones iónicas en la que reaccionan cargas opuestas de polielectrolitos en un medio acuoso. La atracción electrostática entre los grupos amino catiónicos del quitosano y los grupos aniónicos del alginato es la interacción principal que conduce a la formación de la PEC. La ventaja de esta técnica en comparación con las interacciones de redes covalentes es que solo es necesario quitosano y un polímero aniónico sin necesidad de utilizar moléculas catalíticas o iniciadoras (Berger et al., 2004).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

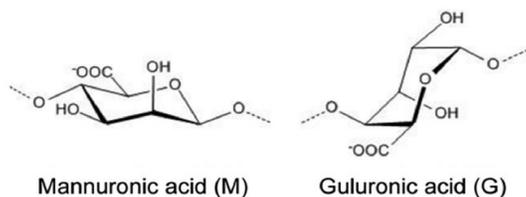


Figura 2. Estructura química del alginato.

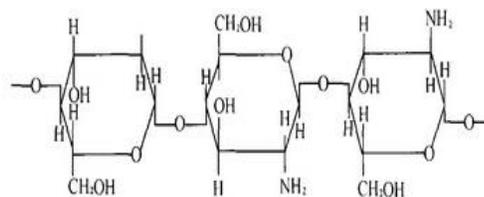


Figura 3. Estructura química del quitosano.

1.3.3 Síntesis de Nanopartículas Magnéticas

1.3.3.1 Métodos Físicos

El método de condensación de gas inerte, consiste en la evaporación de un metal a temperatura aproximadamente de 1500 °C hacia un gas con elevada pureza como el Helio (Buendía Aceves, 2009), cuando estos gases chocan los átomos del gas metálico resultan en forma de un polvo ultra fino dado a la energía cinética que pierden estas partículas, a través de este método sintetizan nanopartículas magnéticas de Fe, Ni y Co. Mediante alteraciones en el método de condensación de gas inerte como descarga de arco en corriente de mezclas de gases de hidrogeno y argón sintetizan nanopartículas magnéticas de Fe, Ni y aleaciones entre ellos con tamaños entre 20nm y 30nm, estas partículas suelen ser amorfas y con altos contenido de hierro en la superficie (Buendía Aceves, 2009).

1.3.3.2 Métodos Químicos

1.3.3.2.1 Síntesis por precipitación y reducción

Las reacciones de precipitación, los precursores metálicos se disuelven en un solvente común esto es combinado con un agente precipitante para formar un sólido insoluble y luego se lleva a cabo un proceso de reducción consiste en una reducción híbrida de sales metálicas usando boro hidruro de sodio (Maturana Duarte, 2009). Este tipo de reacciones son usualmente llevadas a cabo en medios no acuosos para obtener una fase de metal pura en condiciones normales de presión y temperatura

1.3.3.2.2 Microemulsión

Este método consiste en una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, el dominio de uno de los líquidos se estabiliza por de medio de un surfactante (Maturana Duarte, 2009). Este proceso se fundamenta en dos fases, la fase acuosa y la fase oleosa. Micelas de bomidro de cetiltrimetilamonio se han sintetizado nanopartículas de cobalto y aleaciones de cobalto-platino utilizando como surfactante butanol y en fase oleosa octano (Maturana Duarte, 2009).

1.3.3.2.3 Reacciones hidrotermales de alta temperatura

Son reacciones llevadas a cabo en medios acuosos en reactores y autoclaves en condiciones de presión superiores a 2000 psi y temperaturas mayores a 200 ° C. La formación de ferritas pueden ser por dos rutas diferentes: hidrolisis y oxidación o neutralización de hidróxidos de metal mixtos(Laurent et al., 2016).

Las partículas que presentan alto nivel de monodispersidad y control de tamaño se pueden obtener por descomposición a altas temperaturas de precursores orgánicos de hierro como Fe (Cup)₃, Fe (CO)₅ y Fe (acac)₃, usando solventes orgánicos y surfactantes. En este método, factores como la temperatura, tiempo, la concentración y las relaciones de los reactivos, la naturaleza del disolvente y precursores influyen en la morfología y tamaño del producto final, por ejemplo, el tiempo de reacción limita el tamaño de partícula, esto se debe a la tasa de nucleación (Laurent et al., 2016).

1.3.3.2.4 Reacciones sol-gel

Es una ruta de síntesis húmeda para óxidos metálicos nanoestructurados. Consta de procesos de hidroxilación y condensación de precursores moleculares en disolución lo cual tiene como producto un “sol” de partículas nanométricas. Además, la condensación y polimerización inorgánica resulta una red tridimensional de óxido metálico llamado “gel” húmedo. El método se realiza a temperatura ambiente, es por esta la razón que en necesario de realizar tratamientos térmicos para lograr el estado cristalino final de las partículas. Las propiedades de un gel dependen de la estructura elaborada en la etapa sol del proceso sol-gel. Los parámetros que influyen en la técnica de obtención mediante reacciones sol-gel son la cinética, propiedades del gel y solvente, concentración de precursores, reacciones de condensación, hidrolisis, temperatura, pH y procesos de agitación (Laurent et al., 2016).

1.3.3.3 Variables de la síntesis

1.3.3.3.1 Temperatura

La temperatura es un factor importante en las reacciones químicas, funciona como un catalizador, aumentando o disminuyendo el tiempo de la reacción, dado que para la síntesis de MNPs se llevará a cabo por medio del método de co-precipitación química se seleccionará este factor como una variable con el objetivo de evaluar las características finales de las partículas sintetizadas a diferentes temperaturas de reacción. Algunos estudios han reportado la relación entre la temperatura y el tamaño de partícula. Los estudios realizados por (Mahdavi et al., 2013) demuestran que el efecto de la temperatura en el tamaño de partícula se comportan inversamente proporcional, es decir, al aumentar el tiempo de reacción reduce el tamaño de partícula, dicho suceso ocurre cuando varían la temperatura desde 25 a 45 °C, sin embargo al cambiar las condiciones de 45 a 85 °C el tamaño de partícula también presenta un aumento aproximadamente de 5nm. Dichos datos sugieren que al someter la reacción a elevadas temperaturas se logra una heterogeneidad en los tamaños de las partículas y la temperatura de 45 °C puede ser un valor interesante a evaluar.

Según (Faraji et al., 2010) la presencia de color café se debe a presencia de Fe_2O_3 lo atribuyen a temperaturas de reacción por debajo de 60 °C, es decir, no se logró completar la formación de las partículas sintetizadas por medio del método de co-precipitación, por este tipo de diferencias es necesario evaluar efecto de diferentes variables, como el pH, concentración y diferentes reactivos.

Otro estudio (Kandasamy & Maity, 2015) sintetizan SPIONs como un sistema prometedor en *nanotheranostics*, reciente aplicación de la nanotecnología como herramienta de diagnóstico y terapia simultáneamente, reportan mediante el método de co-precipitación la temperatura ideal de reacción se encuentra en un rango 70-90 °C en ausencia de oxígeno.

1.3.3.3.2 Estabilizadores

En aplicaciones biomédicas es necesario controlar la estabilidad de las partículas en ambientes biológicos para evitar perder la eficiencia de estas y la toxicidad que pueden presentar en caso de no ser estables. Adicional las interacciones que ocurren entre partículas como por ejemplo las fuerzas de atracción Van der Waals, fuerzas dipolo-dipolo y alta energía de superficie pueden causar aglomeración entre las partículas lo cual es necesario evitar (Kandasamy & Maity, 2015). Por esta razón es necesario modificar la superficie de estos sistemas nanométricos con materiales bicompatibles que permitan ser usados en ambientes biológicos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Existe una gran cantidad de estrategias de modificación superficial así como materiales a usar, diferentes autores (Kandasamy & Maity, 2015), (Kayode & Abdul, 2016), (Ling, Lee, & Hyeon, 2015), (Li et al., 2013), (Kumar & Gupta, 2005) mencionan los polímeros con gran potencial uso en recubrimientos de sistemas magnéticos a escala manométrica aplicados en terapias para el cáncer mediante la hipertermia, un ejemplo son los polímeros naturales tales como Dextran contribuye a la biocompatibilidad y biodegradabilidad de las MNPs debido a los enlaces fuertes de hidrogeno entre las cadenas poliméricas y la superficie de las partículas, el ácido poliláctico favorece la estabilidad suelen tener un radio hidrodinámico entre 10 – 18 nm (Laurent, Saei, Behzadi, & Panahifar, 2014), el quitosano demuestra ser estable en diferentes niveles de pH cross-linked con MNPs, la gelatina tipo A y B favorecen la biodegradabilidad de las SPIONs han sido usadas en terapias para el cáncer, el alginato otro polímero natural ha sido como en terapias de fotón activado recubriendo nanopartículas magnéticas con un tamaño entre los 13-15 nm y nanopartículas de oro para captación de rayos x como herramienta de diagnóstico, así mismo el N -isopropylacrylamide (NIPAAm) es un polímero por excelencia utilizado en termoterapia gracias a la termosensibilidad que posee como propiedad pueden ser usados como controladores, es decir, en forma de *Switch* de encendido y apagado mediante el control de la temperatura y a partir de esto liberar drogas en lugares específicos gracias a las MNPs, el PVA es otro polímero utilizado en terapias de cáncer a través de la hipertermia dado que es capaz de alcanzar temperaturas que oscilan 43-47 °C en tiempos cortos (4-5 min) bajo estímulo de un campo magnético externo, el ácido oleico es otro surfactante recientemente usado dado que logra controlar el tamaño de partícula, previene la aglomeración, incrementa la estabilidad, logra biocompatibilidad; (Mahdavi et al., 2013) lograron obtener MNPs de Fe₃O₄ monodispersos recubiertas con ácido oleico con un tamaño de 7.8 ± 1.9 nm a un pH de 11, condiciones iniciales de temperatura a 45°C y agitación de la reacción a 800 rpm.

Los beneficios de realizar recubrimientos superficiales dependerán de la aplicación final para la que se desee usar las nanopartículas, los siguientes son algunas de las características finales que se tiene con la funcionalización o *coating* de la superficie: protección a las NPs contra la captación y eliminación por parte del sistema retículo endotelial por lo tanto aumenta el tiempo de circulación en la sangre, protege el núcleo magnético de la oxidación, confiere una superficie reactiva para liberación de drogas, confiere biocompatibilidad, entre otras (Laurent et al., 2014).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.4 Métodos de Obtención de Hidrogeles

1.3.4.1 Emulsiones

La emulsión es una mezcla de una fase líquida dentro de una fase parcialmente o totalmente inmiscible a través de surfactantes que son moléculas anfipáticas que reducen la tensión interfacial entre dos líquidos con el fin de lograr estabilidad coloidal. Las emulsiones son clasificadas según la composición de la mezcla como aceite, agua y surfactante. Las más comunes son agua en aceite (w/o) y aceite en agua (o/w) por sus siglas en inglés dependiendo cual cumple el papel de solvente. Existen sistemas más complejos como agua en aceite en agua (w/o/w) y pueden ser llamados macroemulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones según el tamaño del producto final (Crucho & Teresa, 2017).

1.3.4.2 Congelamiento/Descongelamiento

La obtención de hidrogeles físicos preparados por el método de congelación-Descongelación ha llamado la atención en recientes investigaciones. Este tratamiento consta de unos ciclos únicos o repetitivos de congelación-descongelación, donde la solución acuosa del polímero induce una cristalización y posteriormente la formación de una red cristalina donde el polímero actúa como puntos de unión. Por otro lado, este método cuenta con ventajas desde el punto de vista tóxico, pues no da lugar a la generación de residuos de reactivos y/o de toxicidad química, por lo tanto, no se liberan agentes tóxicos en el proceso. Además, los hidrogeles obtenidos por este método presentan propiedades elásticas con mayor porosidad, más esponjosas y con mejor elasticidad que los hidrogeles preparados por otros métodos (Qi et al., 2015).

1.3.5 Técnicas de Caracterización

1.3.5.1 Estructurales

1.3.5.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Este tipo de microscopía a diferencia de la convencional utiliza electrones en vez de luz para la formación de la imagen magnificada. Su funcionamiento consta de un haz de luz que es producido en el microscopio por un cañón de electrones, este haz viaja en un medio de vacío y de forma vertical, pasando por un campo magnético y una serie de lentes que dirigen el haz hacia la muestra. Una vez el haz haga contacto con la muestra, rayos X y electrones son expulsados de la muestra, los cuales son detectados mediante sensores que lo convierten en una señal y así se forma la imagen (Schweitzer, n.d.).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Dado que el SEM utiliza vacío y electrones para la formación de la imagen, la muestra debe tener una preparación previa para poder ser usada en esta caracterización. Toda el agua debe ser removida de la muestra pues el vacío la evaporaría, y además aquellas muestras que no sean metálicas y por ende no sean conductoras se le debe realizar un recubrimiento metálico (Schweitzer, n.d.).

1.3.5.1.3 Microscopía de Transmisión (TEM)

Este tipo de microscopía al igual que el SEM involucra un haz de electrones emitidos por un cañón de electrones y formado por lentes magnéticos, pero a diferencia de este, en el TEM, el haz de electrones traspasa la muestra. En ese proceso de pasar por la muestra algunas partes del material absorberán o reflejarán más electrones que otras partes. Los electrones que logren pasar la muestra con detectados debajo de esta, para la formación de la imagen en las regiones donde los electrones no lograron pasar la muestra la imagen es negra y en el caso contrario donde si hubo electrones que pasaron la muestra la imagen es más blanca, y existe un rango de grises dependiendo del tipo de interacciones que ocurran con la muestra y que el detector lea. (Central Microscopy, n.d.)

1.3.5.1.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica no invasiva empleada en ciencias químicas, físicas, química coloidal, ciencia de los materiales, entre otras, como medida de tamaño de partículas en la región sub-micrométrica, también es conocida como Espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica (Spectroscopy, Scattering, Motion, & Motion, n.d.).

El DLS consiste en exponer las partículas en suspensión a un haz de luz (onda electromagnética) el cual se dispersa al entrar en contacto con las partículas ocasionando una alteración en la dirección y la intensidad del haz de luz, dicha intensidad varia con el tiempo debido al movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión el cual permite medir el coeficiente de difusión de las partículas de forma esférica mediante Ecuación 1. Ecuación Stokes-Einstein. Ecuación 1 y así mismo determinar el radio hidrodinámico de un promedio del conjunto de partículas (Lim, Yeap, Che, & Low, 2013).

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

Ecuación 1. Ecuación Stokes-Einstein.

Donde:

k_B = Constante de Boltzman.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

$T =$ temperatura de la suspensión.

$\eta =$ Viscosidad del medio.

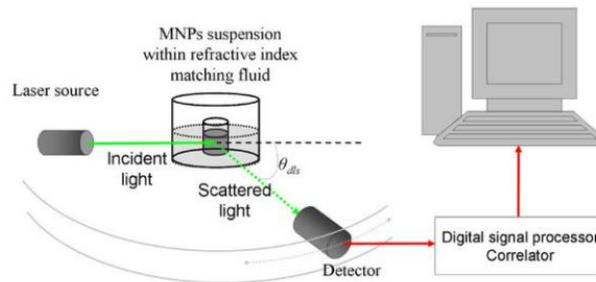


Figura 4. Esquemático funcionamiento DLS

1.3.5.1.5 Potencial Z

Potencial Z (ZP) también conocido como potencial electrocinético hace referencia al potencial en el plano de deslizamiento/corte de una partícula coloidal que se mueve bajo campo eléctrico. El potencial eléctrico de una superficie es la cantidad de trabajo que se necesita hacer para traer una unidad de carga positiva desde el infinito a la superficie sin ninguna aceleración. Dicho potencial refleja la diferencia de potencial entre la EDL (doble capa eléctrica) de partículas electroforéticamente móviles y la capa de dispersante alrededor de ellas en el plano deslizante (Bhattacharjee, 2016).

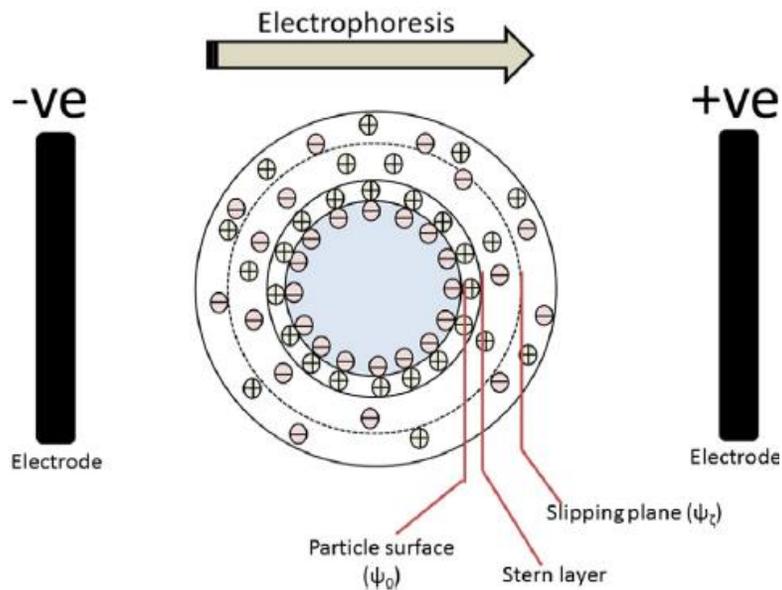


Figura 5. Esquemático Potencial Z

En la Figura 5 se observa la EDL en una partícula cargada negativamente (capa interior), encima de la superficie de la partícula está una capa fuertemente adherida conocida como la capa de Stern la cual está cargada positivamente. Posterior a la capa se Stern se encuentra la capa difusa que consiste en cargas positivas y negativas. En la electroforesis la partícula con EDL absorbida se desplaza hacia el electrodo positivo (en este caso) mediante el plano deslizante convirtiéndose en la interfaz entre las partículas móviles y el dispersante, el potencial z corresponde al potencial electrocinético en dicho plano deslizante.

Así mismo, (Bhattacharjee, 2016) menciona las diferentes variables que influyen en los valores de potencial z, el pH es uno de los factores más influyentes en dicho valor, puesto que los coloides pierden estabilidad y tienden a aglomerarse o flocular cuando el pH tiende a ser igual al punto isoeléctrico. La fuerza iónica al aumentar comprime el EDL y el ZP disminuye. La valencia de los iones es otro factor que se comporta similar a la fuerza iónica solo que el ZP disminuye en magnitud. La concentración de partícula es una variable que interviene en la estabilidad, el ZP incrementa con el aumento de concentración. Es reportado la relación entre el potencial z y la estabilidad coloidal, estudios reportan que 10 mV , $\pm 10\text{-}20 \text{ mV}$ y $\pm 20\text{-}30 \text{ mV}$ y $> \pm 30 \text{ mV}$ como muy inestables, relativamente estables, moderadamente estables y altamente estables, respectivamente. Sin embargo, existen muchas discrepancias en las que no se tienen en cuenta las fuerzas atractivas van der Waals.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.5.2 Composicionales

1.3.5.2.1 UV-Visible

Espectroscopía de absorción (UV-vis) es ampliamente utilizado como medio principal de las concentraciones de ensayo y en la caracterización de la cinética de reacciones y procesos químicos; Se utiliza para la detección cromatográfica. La capacidad de los estados electrónicos de las moléculas de la sonda también asegura su amplio uso de estudios físicos detallados.

Así mismo la literatura ha reportado la espectroscopía UV-vis para estudiar la dispersión y estabilidad de nanopartículas en medio acuoso y permite una rápida valoración de las distintas soluciones. El valor de la absorbancia es proporcional a la cantidad de partículas por unidad de volumen y por lo tanto puede relacionarse con la estabilidad de la dispersión de las nanopartículas en la solución (Vanegas, Vázquez, Moscoso, & Cruzat, 2014).

1.3.5.2.2 Espectroscopía de Infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo se basa en la adsorción cuantificada de radiación electromagnética en el rango comprendido entre 10000 a 100 cm^{-1} . El espectro de vibración es obtenido como bandas y no como líneas discretas, debido a los múltiples cambios en energía rotacional que acompañan un cambio en la energía vibracional de las moléculas. Las bandas vibracionales-rotacionales que se dan entre 4000 y 400 cm^{-1} son las más empleadas en la caracterización de las mayorías de las sustancias. Las posiciones de las bandas en los espectros infrarrojos están dadas como números de onda ($\bar{\nu}$), con unidades de cm^{-1} o como longitudes de onda (λ), en unidades de micrómetros μm . La frecuencia (aunque no es el término estrictamente adecuado) dependerá de las masas relativas de los átomos que participan del enlace de interés, de la constante de fuerza de los enlaces y del arreglo espacial de los átomos (Urquijo Morales, 2007).

En general la espectroscopia de infrarrojo mide la radiación absorbida por las moléculas, lo que ocasiona una modificación en los niveles de energía vibracional. Esta técnica es usada para la identificación de muestras, puesto que permite identificar componentes conocidos presentes en muestras de las cuales no se tiene información, así mismo se puede identificar enlaces y también cuantificar componentes de interés Echeverri, C. (2015).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.5.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

Difracción de rayos X es una técnica de caracterización implementada para el análisis estructural de cristales. Es considerada una técnica no destructiva debido que el principio de funcionamiento es a partir de una única sonda electromagnética de magnitud en el orden de los Å, al colisionar la materia con los fotones (partículas libres de carga y masa nula en el reposo) provocan una interacción suave y no generan destrucción en la muestra (Mazuelas, 1992).

Los difractómetros funcionan de la siguiente manera: los rayos X provenientes de un tubo convencional con anticátodo de cobre son colimados mediante rendijas usualmente de $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \times 0.15$ grados que se encuentran antes y después de la incidencia del haz con la muestra, el barrido se realiza sincronizadamente Θ - 2Θ , es decir, la muestra avanza Θ y el detector avanza 2Θ , finalmente el haz difractado llega al detector cuando alcanza la condición de Bragg, es decir, cuando los frentes de ondas luego de la colisión se encuentran en fase (Mazuelas, 1992).

Los rayos X al incidir contra los átomos de la muestra, la corteza electrónicas de los átomos en contacto con la onda incidente la dispersan mediante procesos inelásticos o elásticos, la radiación dispersada elásticamente forman el diagrama de difracción el cual permite conocer la distribución de los átomos dispersos. Las posiciones de los máximos de difracción dependen de la posición de los átomos en la celda unidad y la intensidad de los máximos dependerá de la química de los átomos, es decir, del número de electrones en la corteza que tiene contacto con la onda incidente (Mazuelas, 1992).

1.3.5.3 Citotoxicidad

1.3.5.3.1 Ensayo MTT

El ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2, bromuro de 5-difeniltetrazolio) tetrazolio fue el primer ensayo de viabilidad celular homogéneo desarrollado. Se reduce por células metabólicamente activas, en parte por la acción de enzimas deshidrogenasa, y generan sales reductoras como NADH y NADPH. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables, se mide registrando los cambios en la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de lectura de placas. Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de formazán de color púrpura con un máximo de absorbancia cercano a 570 nm. Ver Figura 6 (Riss, Moravec, Niles, & Minor, 2016).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

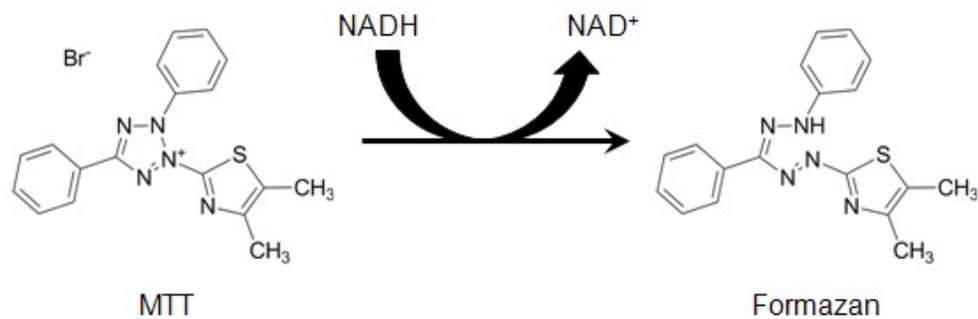


Figura 6. Estructura MTT y formazan coloreado (Riss et al., 2016)

La formación de color sirve como un indicador útil y conveniente de células viables, puesto que cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazán y por lo tanto no existe presencia del color púrpura característico.

1.3.6 Aplicaciones

1.3.6.1 Administración controlada de fármacos

Las posibilidades del uso de sistemas de hidrogeles magnéticos, dado a la presencia de nanopartículas magnéticas (MNPs) han incrementado drásticamente en la liberación controlada de fármacos como tecnología moderna. La combinación de MNPs y un campo magnético externo y/o implantes magnetizables permiten la liberación de medicamentos en el área objetivo, liberación controlada y fijación local es conocido como “magnetic drug targeting” (Akbarzadeh, Samiei, & Davaran, 2012). Este efecto que provocan estos sistemas conlleva ventajas importantes como la disminución de efectos secundarios en áreas sanas, y la reducción de dosis a suministrar, adicional a esto la encapsulación o recubrimientos con polímeros le confiere propiedades biocompatibles y funcionalización con moléculas bioactivas resultan ser más eficientes.

El proceso de localización de drogas utilizando sistemas magnéticos de entrega se basa en la competencia entre las fuerzas ejercidas sobre las partículas por el compartimento de la sangre y las fuerzas magnéticas generada por el magneto o imán (Akbarzadeh et al., 2012).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.6.2 Tratamientos de hipertermia

Los tratamientos de hipertermia consisten en someter a las células de un tejido a temperaturas entre 41°C y 46°C con el fin de generar una destrucción por apoptosis. Esta destrucción celular puede llevarse a cabo mediante el uso de NPs Magnéticas, una vez que se obtengan las NPs y estas ingresen al organismo por vía intravenosa pueden suceder dos formas de captación por parte del organismo, la primera de ellas es un marcaje externo de las células cancerosas y la otra es una incorporación directa de las NPs dentro de las células cancerosas. El proceso de calentamiento se realiza mediante un campo magnético oscilante por medio del cual las NPs absorben la energía y la transforman en calor (Luz & Piscioti, 2009).

1.3.6.3 Imágenes de Resonancia Magnética

El uso de nanopartículas magnéticas en el campo de imagenología médica, especialmente en las imágenes de resonancia magnética se ha ido desarrollando en los últimos años. Este tipo de diagnóstico no invasivo obtiene imágenes de órganos y tejidos con mayor precisión gracias a los campos magnéticos aplicados para su medición. Sin embargo, el uso de medios de contraste en este tipo de diagnósticos mejora aún más la calidad de la imagen para la obtención de datos más precisa (Vanegas et al., 2014).

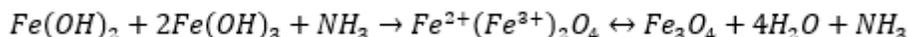
Los medios de contraste se dividen en dos tipos de acuerdo a las vías de relajación, siendo T1 la longitudinal y T2 la transversal, estas vías están relacionadas con el contraste de la imagen siendo T1 el contraste blanco que permite detectar imágenes de tejido adiposo y T2 el contraste oscuro que permite detectar imágenes de anomalías en los tejidos como hemorragias o coágulos internos. Los contrastes que se usan convencionalmente son los del blanco con un agente formado de bases de Gadolinio (Gd), este compuesto tiene grandes desventajas ya que al acumularse en el hígado disminuye su tiempo de actividad para la formación de la imagen por lo que se requiere de varias dosis y genera un riesgo tóxico al paciente. Para las imágenes T2 se utilizan NPs magnéticas las cuales presentan una imagen con mayor intensidad mientras están sometidas al campo magnético proporcionado por el equipo de resonancia (Vanegas et al., 2014), así mismo, las MNPs son químicamente estables, biocompatibles y biodegradables en condiciones in vivo debido a su capacidad de mezclarse como iones de hierro normales en la sangre en comparación con los agentes de contraste basados en metales / aleaciones metálicas (Kandasamy & Maity, 2015).

2 METODOLOGÍA

2.1 Síntesis y encapsulación de las nanopartículas magnéticas en el hidrogel.

2.1.1 Síntesis de MNPs por método de co-precipitación

En la síntesis de nanopartículas magnéticas por el método de co-precipitación ocurren reacciones químicas conocidas como óxido-reducción en donde los reactivos que interviene intercambian electrones generando variaciones en los estados de oxidación. En este caso el hierro II y hierro III quedan en estado neutro, es decir, su carga es igual a cero. La Ecuación 2 describe el producto final obtenido en la síntesis de las partículas.



Ecuación 2. Reacción final proceso de síntesis de MNPs

Cabe resaltar que todo el proceso de síntesis se realizó en un medio alcalino.

Para la síntesis de nanopartículas magnéticas por el método de co-precipitación se comenzó con la organización y el montaje de los equipos como se observa en la Figura 7, constituido por un soporte universal, una bureta de 25ml, una plancha térmica con agitación magnética, una termocupla y un pH-metro.

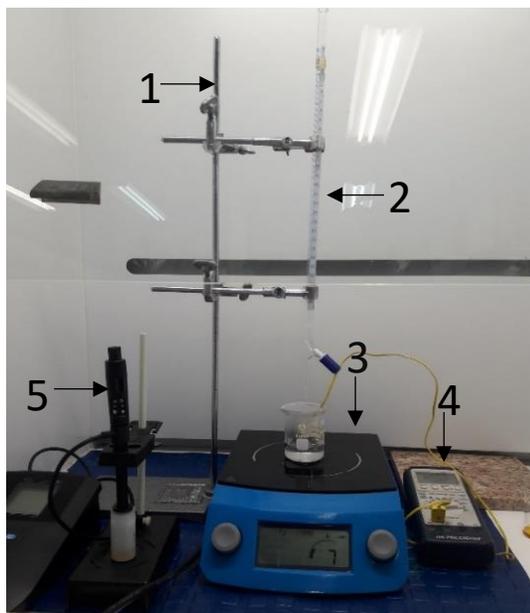


Figura 7. Montaje síntesis MNPs. 1. Soporte universal; 2. Bureta; 3. Plancha térmica; 4. Termocupla; 5. pH-metro

Luego del montaje, se continúa a disolver las sales precursoras, que para esta síntesis fueron cloruro de Hierro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de R.A Chemicals y peso molecular de 270,3; y cloruro de hierro II tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de Sigma-Aldrich 99% de pureza. Estas sales son disueltas en el ácido clorhídrico (HCl) 2M manteniendo una relación molar 2:1. Posteriormente, se mezclan ambas sales a una relación 4:1 y se ubicó tal solución en baño maría en un beaker sobre una plancha térmica a 60°C y agitación constante de 400rpm. Por otro lado, se preparó el hidróxido de amonio (NH_4OH) a una concentración de 0,7M, se vertió en la bureta y se abrió de tal forma que la solución caiga gota a gota dentro de la mezcla de sales a una razón de 1ml/min como se puede ver en la Figura 8.

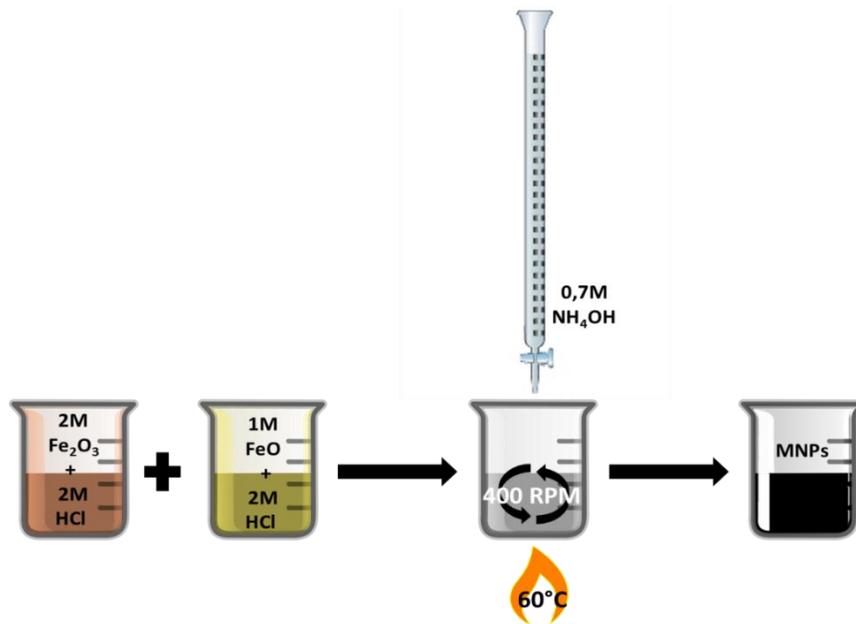


Figura 8. Proceso de la síntesis de MNPs.

Una vez se terminó de agregar el NH_4OH se retiró el calor y la agitación continuó hasta lograr el máximo valor de pH alcalino. Posteriormente, se dejó decantar la solución ubicando un imán en la parte posterior del beaker durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego de ser decantada, al precipitado se le realizaron tres lavados cada uno de 10 minutos; una parte de la solución fue lavada con agua desionizada para tomarse como control y otra parte fue lavada con metanol, finalmente, se dejaron secar ambas soluciones durante 24 horas aproximadamente a temperatura ambiente.

Para lograr la estabilización de las MNPs, una vez estas estuvieran secas luego de los lavados con metanol fueron maceradas hasta conseguir un polvo muy fino, luego fueron dispersadas en 1% v/v de ácido oleico (AO) y se sometieron a baño de ultrasonido durante 24h. Posterior al ultrasonido, se realizaron nuevamente 3 lavados cada uno por 10 minutos con metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se dispersaron en carbonato de sodio a una proporción 5:1 y se sometieron a baño ultrasónico por 30 minutos, así como se puede apreciar en la Figura 9, luego se dejaron secar y finalmente, se maceraron hasta lograr un polvo muy fino.

El protocolo detallado acerca de la síntesis de MNPs se encuentra en el Anexo 1. Protocolo síntesis de nanopartículas magnéticas. Anexo 1 .

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

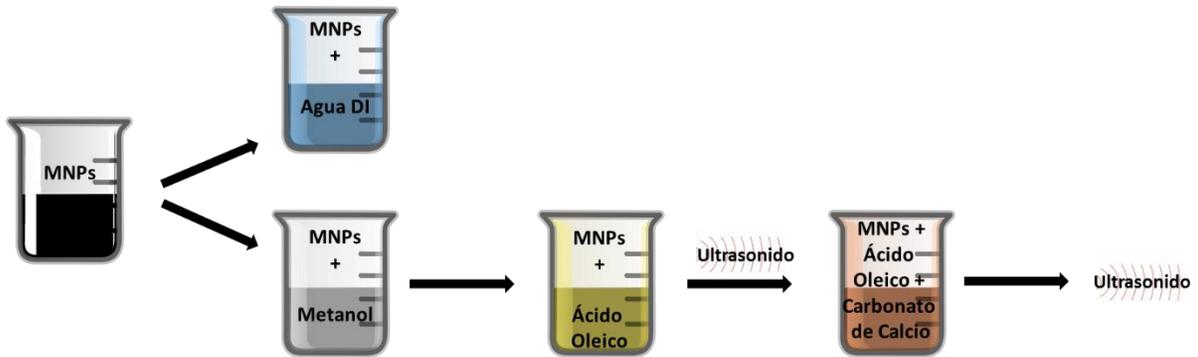


Figura 9. Proceso de estabilización de las MNPs.

2.1.2 Síntesis de micro-nano hidrogeles de alginato-quitosano y encapsulación de MNPs

Para la síntesis de los micro-hidrogeles se comenzó con la preparación de alginato y quitosano, ambos disueltos a una proporción 1:100 en agua destilada y manteniendo un pH de 6,8 y 3 respectivamente. Una vez listas ambas soluciones, se adicionó el alginato en el quitosano, conservando una relación volumétrica 50:50 y se dejó durante 24 horas en agitación constante a 100 rpm aproximadamente. Pasadas las 24 horas, la solución fue filtrada con papel de filtro a $0,22 \mu\text{m}$ y se continuó con la adición de una cuarta parte de MNPs con respecto al volumen filtrado de alginato-quitosano. Posteriormente, se adicionó gota a gota 35% del volumen total de tripolifosfato de sodio y se sometió a baño ultrasónico durante una hora. Finalizado el baño se centrifugó tres veces a 2000 rpm durante 10 minutos eliminando el sobrenadante y aforando con agua destilada hasta volver a obtener el volumen inicial. Una parte de la solución es congelada durante 24 horas para su posterior liofilización. La otra parte por el contrario se volvió a filtrar a $0,22 \mu\text{m}$ y simultáneamente es lavada aproximadamente de 7 a 10 veces con acetona, así como se puede ver en la Figura 10.

El protocolo detallado acerca de la síntesis de los hidrogeles y la encapsulación de las MNPs se encuentran en el Anexo 2 y Anexo 3.

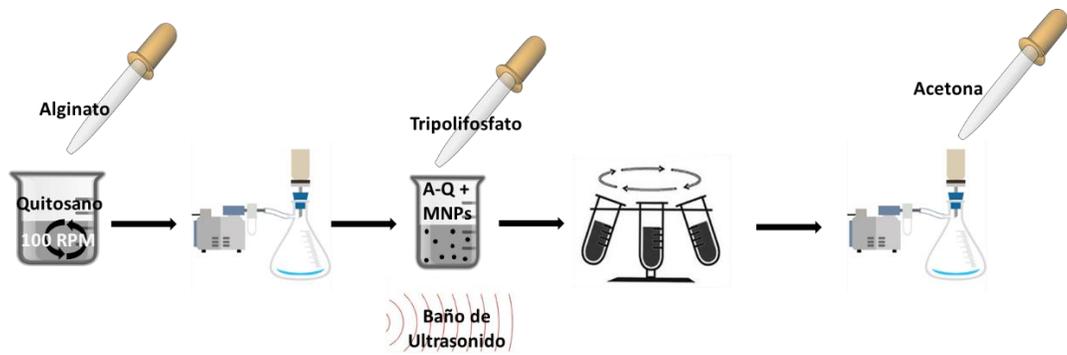


Figura 10. Proceso de síntesis de micro-nano hidrogeles y encapsulación de MNPs.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS

3.1 Propiedades Magnéticas

3.1.1 Prueba de magnetismo

Para demostrar que las partículas sintetizadas tienen la propiedad magnética, se usó un imán el cual se ubicó en la parte posterior de la solución de MNPs y se evidenció la atracción de las partículas al imán. Igualmente, se fue moviendo el imán por las paredes del beaker para comprobar que las partículas tanto en solución húmeda como secas tenían atracción al imán independiente de su ubicación.

3.2 Propiedades Estructurales

3.2.1 Microscopía óptica

Para identificar la presencia de los hidrogeles y la encapsulación de las MNPs en estos, se observó mediante un microscopio óptico Nikon LV100 con aumentos de 20X y 50X para tener una noción de lo que se podría ver en TEM y SEM posteriormente. Las muestras vistas fueron hidrogeles y el sistema de MNPs encapsulado en los hidrogeles. Ambas muestras fueron servidas con una jeringa de insulina sobre el porta objetos y se dejaron secar durante 24 horas.

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido fue implementada con el objetivo de determinar propiedades morfológicas de las muestras tales como el tamaño y forma. Las muestras fueron servidas en las celdas sobre cinta en donde posteriormente se tomaron diferentes fotografías a diferentes ampliaciones y se realizaron mediciones de los micro-nano hidrogeles por medio del microscopio Phenon ProX.

3.2.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se utilizó para determinar el tamaño y la morfología de los hidrogeles y las MNPs, se utilizó el equipo FEI Tecnai G2 F20 200 kV del Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) de la Universidad de Antioquia. Para la preparación de las muestras de MNPs se tomó aproximadamente 1 mg de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

los diferentes tratamientos de las nanopartículas secas y fueron diluidos en 4 ml de agua desionizada, se agitaron en vortex alrededor de 10 segundos y de estas soluciones se depositaron 0,01 ml sobre diferentes rejillas de cobre y se dejaron secar durante 24 horas. Para la preparación de la muestra del hidrogel se tomó 0,01 ml de la solución previamente lavada y filtrada con acetona, se dispuso igualmente sobre una rejilla de cobre y se dejó secar durante 24 horas. Finalmente, cuando todas las rejillas estuvieron secas fueron almacenadas debidamente en un porta rejillas y fueron llevadas a analizar.

Para la preparación de las rejillas se utilizaron rejillas de cobre de malla 100x100, y se utilizó 1% de Formvar para crear una película protectora sobre esta rejilla.

Los protocolos para la preparación de las muestras y de las rejillas se pueden ver detalladamente en el Anexo 4.

3.2.4 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz fue implementada como un método adicional para determinar el tamaño y distribución de partícula. Para medir el diámetro hidrodinámico de las partículas se utilizó el equipo NanoPlus, Particulate System que utiliza un sistema de dispersión de láser dinámica. Las muestras analizadas fueron las MNPs secas en los diferentes tratamientos. Se tomó 1 mg de cada muestra previamente seca, luego fueron dispersas en 4 ml de agua desionizada, se almacenaron en tubos eppendorf y luego fueron agitados mediante vortex alrededor 10 segundos. Para su análisis se sirvió 30 μ l de cada muestra dentro de una cubeta que finalmente se ubicó en el NanoPlus para realizar la lectura correspondiente. Se llevaron a cabo cinco repeticiones en las lecturas por cada muestra.

3.3 Propiedades Composicionales

3.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)

Con el fin de determinar los grupos funcionales de los diferentes sistemas se realizó la espectroscopía de infrarrojo mediante el espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 100 de la Universidad EIA. El rango de lectura considerado fue entre 4000 y 400 cm^{-1} , la fuerza aplicada de 80 N y se realizaron 25 escaneos por muestra. Las muestras que se analizaron fueron MNPs con diferentes tratamientos como ácido oleico, carbonato de sodio y metanol. Las muestras fueron previamente secas y maceradas hasta obtener un polvo fino.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3.3.2 Energía de Dispersión de Rayos X (EDX)

Para realizar un análisis químico simple de los principales elementos en cada muestra se utilizó el equipo FEI Tecnai G2 F20 200 kV de la Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) de la Universidad de Antioquia. Las muestras analizadas fueron las mismas descritas en TEM y con igual preparación.

3.3.3 Difracción de Rayos X (DRX)

Para la identificación de las fases cristalinas de las MNPs obtenidas y así conocer el tipo de partícula sintetizada se realizó DRX en un difractor de Rayos X (DRX) XPert PANalytical Empyrean Serie II- Alpha 1, modelo 2012 analizando en un rango angular de 0° a 70° utilizando radiación $\text{K}\alpha_1/\text{K}\alpha_2$ de cobre. Las muestras analizadas fueron MNPs con diferentes tratamientos diluidas en agua.

3.4 Citotoxicidad

3.4.1 Ensayo MTT

Con el fin de cuantificar la viabilidad celular de las MNPs y el sistema hidrogel- MNPs en contacto con células se realizó el ensayo de citotoxicidad MTT. La línea celular evaluada es derivada de ovario de hámster chino (CHO). El método empleado fue indirecto, es decir, los tratamientos se dejaron durante 24 horas en incubación con medio y luego se colectó el sobrenadante para tratar las células.

El procedimiento se muestra en la Figura 11, comenzó con el cultivo de las células, luego se realizó la curva de calibración, para esto se dispusieron las células a diferentes cantidades en un plato de 96 pozos, paso siguiente se agregó el MTT y se incubó durante 4 horas, pasado este tiempo se aspira el MTT y se agrega DMSO en incubación durante 5 minutos tiempo suficiente para diluir los cristales de formazan, finalmente se realiza la lectura en el espectrofotómetro BIO-RAD X Mark a una longitud de onda de 590nm.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

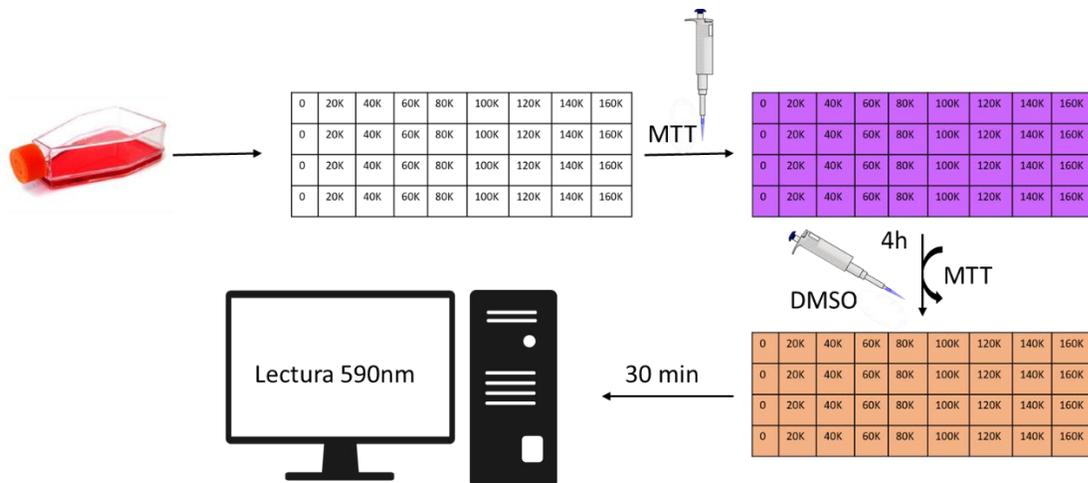


Figura 11. Metodología para la prueba de MTT.

Teniendo la curva de calibración, se prosiguió a realizar el ensayo con los tratamientos determinados, los cuales fueron:

- Tratamiento 1: MNPs puras
 - Tratamiento 2: MNPs + A.O
 - Tratamiento 3: MNPs + A.O + Carbonato de sodio encapsuladas en micro-nano-hidrogeles de alginato/quitosano.
- Nota: Las concentraciones de todos los tratamientos 1-2 fue de 100mg/mL
- Control positivo: Etanol.
 - Control negativo: Células sin tratamiento.

Para realizar la prueba con los diferentes tratamientos, se tomó un plato con 30k células en cada pozo. Previamente, se mezcló el medio con estos tratamientos y luego las células fueron incubadas con el medio + tratamiento durante 24 horas, pasado este tiempo se agregó el MTT y se incubó por 4 horas, se aspira el MTT y se agregó DMSO en incubación durante 5 minutos y finalmente la lectura en el espectrofotómetro.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Síntesis de MNPs por método de co-precipitación

Como se puede ver en la Figura 12a, los colores característicos de las sales precursoras son un amarillo fuerte para el cloruro de Hierro III y un color verde oscuro para el cloruro de Hierro II, ambos diluidos en HCl. Posteriormente, al mezclar ambas soluciones se presenta un color amarillo oscuro así como se puede apreciar en la Figura 12b en el tiempo cero. A medida que se fue goteando el hidróxido de amonio, se evidenció el cambio de color durante el proceso de síntesis como se puede ver en la Figura 12b, donde el color de la solución comienza en un amarillo oscuro hasta un color muy oscuro casi negro pasando por un naranja, marrón y café muy oscuro durante los 40 minutos de síntesis. El cambio de color en el proceso indica la presencia de MNPs y dependiendo el color resultante de la síntesis se atribuye a diferentes fases de óxido de hierro sintetizadas, ya sea magnetita o magemita.

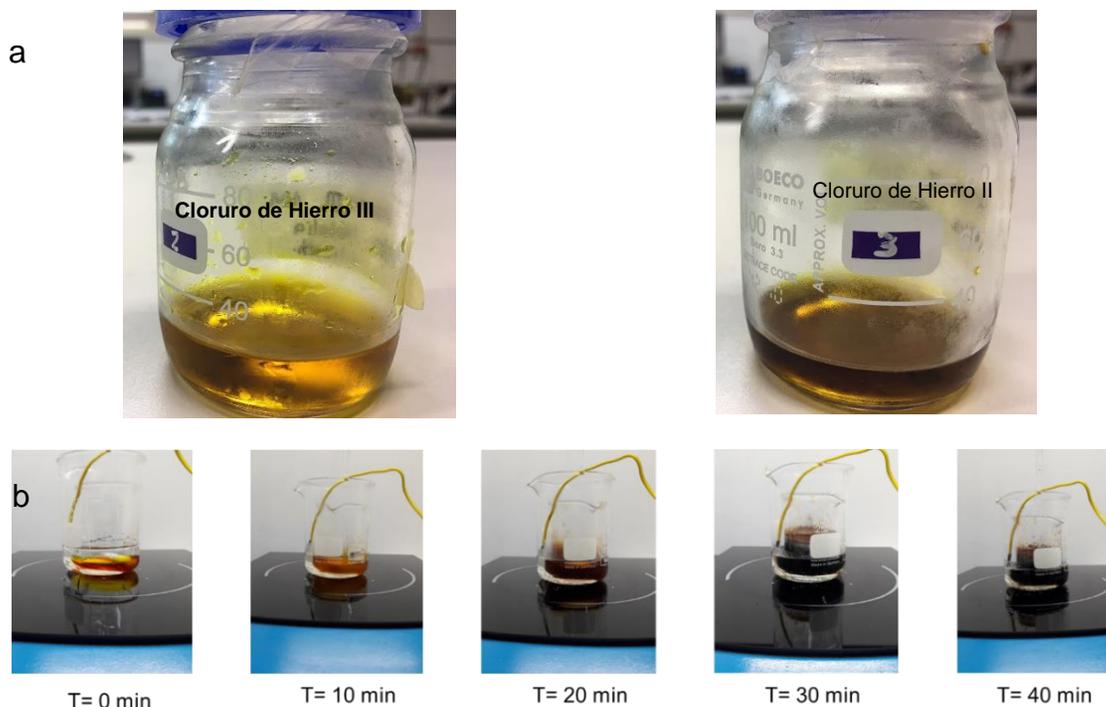


Figura 12. a) Soluciones de Cloruro de Hierro. b) Cambio de color durante la síntesis de MNPs.

De igual manera, a medida que se iba goteando el hidróxido de amonio se fue midiendo el valor de pH para obtener su cambio en el tiempo, y así parar la agitación una vez su valor alcanzara la máxima alcalinidad, pues a este valor de pH se

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

obtienen MNPs más pequeñas y con menos posibilidad de agregación entre sí. La Figura 13 muestra la curva de cambio del pH con respecto al tiempo, se puede identificar la forma de una función exponencial la cual durante los primeros 20 minutos aumenta el pH aproximadamente en un 40%, mientras que en los últimos 20 minutos este valor se mantiene entre los mismos valores alcanzando su máxima alcalinidad a los 35-40 minutos.

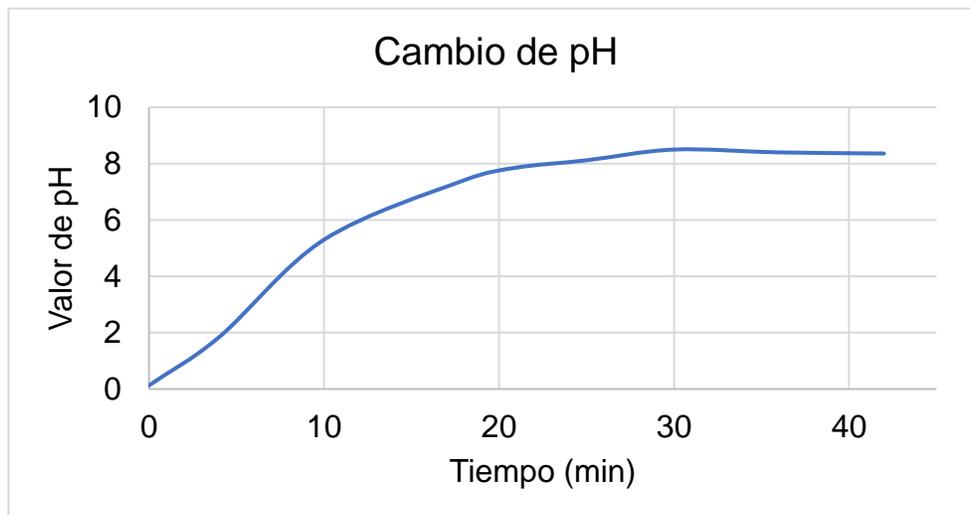


Figura 13. Comportamiento del pH durante el tiempo de síntesis

Luego de obtener el precipitado de las MNPs, fue requerido el uso de un surfactante como el Ácido Oleico (AO) con el fin de disminuir la posibilidad de que las partículas se agreguen y crean una capa protectora alrededor de las mismas, además de ser el surfactante comúnmente más usado para estabilizar las partículas magnéticas. Al usar el AO cuando las MNPs ya estaban formadas era muy posible que este recubrimiento se efectuara sobre todas las MNPs que ya estuvieran agregadas hasta el momento, así que posterior a la estabilización se utilizó carbonato de sodio para obtener una dispersión coloidal estable (Velusamy et al, 2015).

4.2 Obtención de micro-nano hidrogeles de alginato/quitosano

Para realizar la síntesis de los micro-nano-hidrogeles se comenzó con la preparación de alginato y quitosano y se pudo ver que la solución final luego de ser filtrada y ajustado su pH se aprecia un color blanco un poco turbio y una consistencia un tanto viscosa, más para el alginato que el quitosano. Luego, al realizar la mezcla de ambas soluciones se pudo notar que al adicionar gota a gota el alginato en el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

quitosano le tomaba a cada gota de 1 a 5 minutos en disolverse bien, lo que extendía el tiempo de la adición total de alginato en la solución a 1 hora aproximadamente.

Luego al dejar agitar la solución por 24 horas se podía ver la formación de un grumo en la mitad de la solución que no pudo ser disuelto bien, para esto se centrifugó y se continuó con el protocolo tanto para la parte bien disuelta como para el sedimento resultante y se pudo notar formación de micro-nano-hidrogeles con ambas muestras. Al finalizar la solución, el resultado de los hidrogeles es una solución poco viscosa y color transparente sin presentación de colores turbios o partículas suspendidas en la solución, así como se puede ver en la Figura 14 a. Los micro-nano-hidrogeles fueron liofilizados con el fin de determinar la cantidad de matriz resultante en el proceso, y como se puede ver en la Figura 14b. Los lavados de los micro-nano-hidrogeles con acetona al finalizar la síntesis muestran un cambio significativo en el producto liofilizado; Figura 14b la muestra sobre el fondo violeta se puede notar más gruesa, densa y un color blanco intenso que la muestra que se encuentra sobre el fondo verde, la primera no cuenta con lavados de acetona mientras que la segunda contó con 7 lavados. Con esto podemos decir que los lavados con acetona en definitiva si disminuye el exceso de matriz de polímero resultante luego de la síntesis.

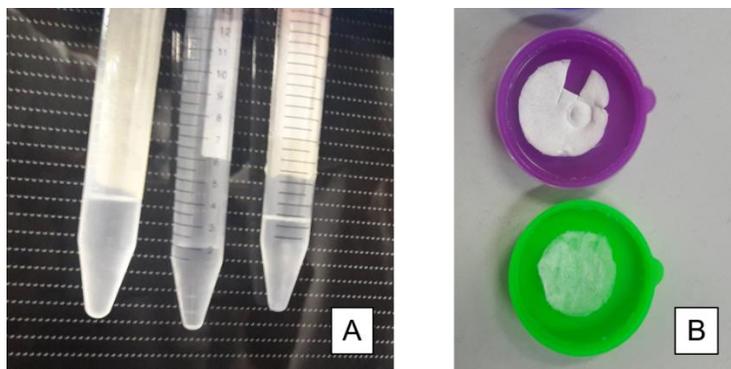


Figura 14. Micro-nano hidrogeles a) forma líquida y b) forma seca.

Según lo reportado en la literatura con respecto a hidrogeles sintetizados a partir de alginato y quitosano, se ha encontrado que cambiar las proporciones de alginato y quitosano puede disminuir la posibilidad de generar el grumo en la mezcla de ambas soluciones, además utilizando otra solución para realizar el entrecruzamiento de ambos polímeros como la sal deferroxamina (DFS). Por otro lado, los estudios reportan utilizar una proporción 1:3 alginato a quitosano, y tras realizar el mismo procedimiento de síntesis se obtienen micro hidrogeles de un tamaño alrededor de los 5 μm o menos y una forma circular en su mayoría y además se mostraba mayor aglomeración de los hidrogeles (Baysal, Aroguz, Adiguzel, & Baysal, 2013)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.3 Propiedades Magnéticas

Como primera caracterización del sistema, para comprobar que las partículas obtenidas contaran con propiedades magnéticas se utilizó un imán, así como se aprecia en la Figura 15 se puede ver que ante la presencia del imán las partículas se ven atraídas a este inmediatamente. Posteriormente, para identificar el tipo de magnetismo presente en las NPs obtenidas se requieren de otras técnicas más avanzadas o mediante la morfología de las partículas también se puede determinar, ya que las partículas con tamaño menor a los 20nm son consideradas superparamagnéticas (Faraji et al., 2010).

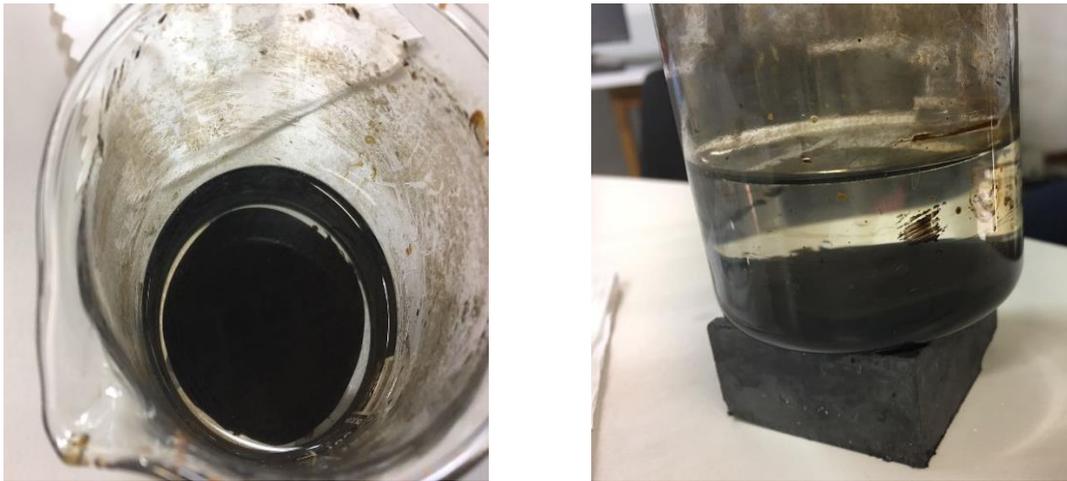


Figura 15. Propiedades de atracción magnética de las MNPs.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

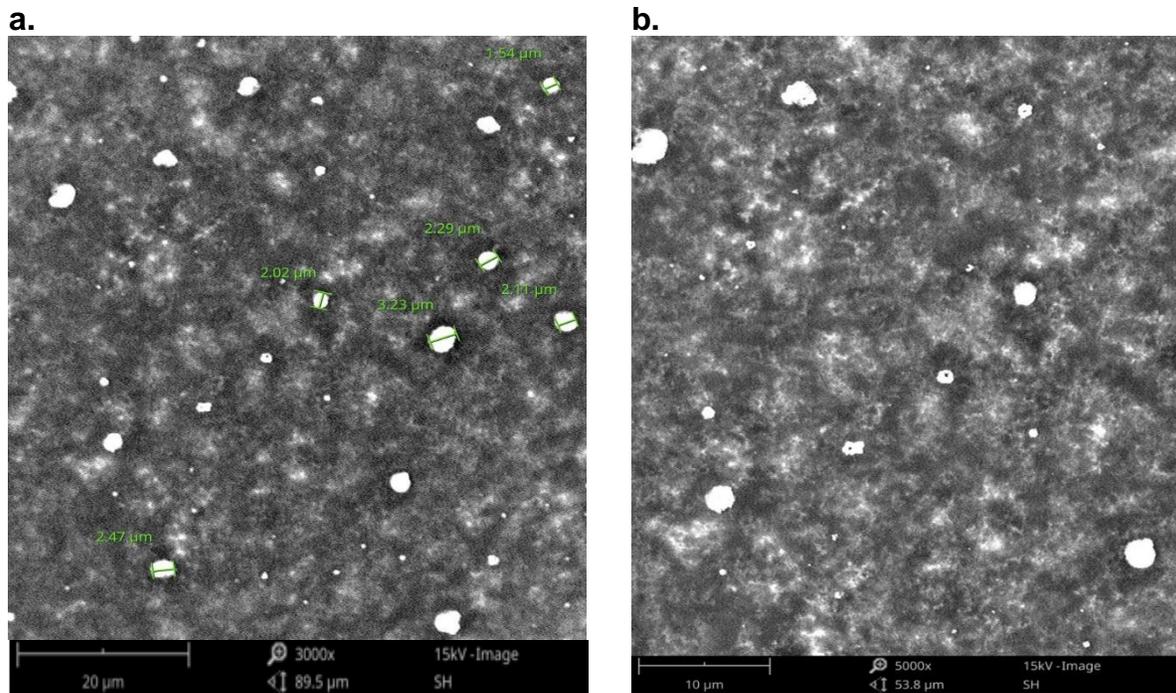


Figura 16. Imágenes de SEM de microhidrogeles.

La Figura 16 (a) y (b) representa las microscopías obtenidas por SEM de los hidrogeles de alginato/quitosano a 3000x y 5000x mediante el microscopio Phenom ProX en la Figura 16(a) se observan los hidrogeles dispersos, la mayoría presentan una morfología circular bien definida con tamaños que varían desde los 1.54 μm a 3.23 μm , esto significa que se logró sintetizar microhidrogeles. La Figura 16(b) se logra apreciar dichas partículas a una amplificación más cercana y se ven aún más dispersos y conservando la forma circular.

En un estudio reportado por (Hou, Nie, Du, Xiong, & Fu, 2015) sintetizaron nanohidrogeles magnéticos a base de NIPPAm-quitosano mediante el método coprecipitación, lograron identificar por medio de microscopías tomadas por SEM hidrogeles de forma esférica y de tamaño por debajo de 1 μm hasta 10 nm.

De ambas micrografías se concluye que los hidrogeles obtenidos en el presente trabajo y los reportados por (Hou et al., 2015) conservan similares características morfológicas como la forma y el tamaño con este último como una variante puesto que ambos están en escalas diferentes manométrica y micrométrica, sin embargo,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

no se descarta la posibilidad que a una resolución más alta del microscopio se puedan observar nanohidrogeles de alginato/quitosano.

4.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las imágenes obtenidas por TEM muestran el tamaño real de las partículas, se confirma su tamaño dentro de la escala nanométrica. Además, se muestra la imagen del sistema final de las MNPs encapsuladas dentro de los micro-nano hidrogeles. La Figura 17 muestra las imágenes obtenidas de las diferentes muestras de MNPs; con el fin de comparar entre los diferentes tratamientos y del sistema final, las magnificaciones de las imágenes van desde 9,9K hasta 43K mostrando diferentes escalas.

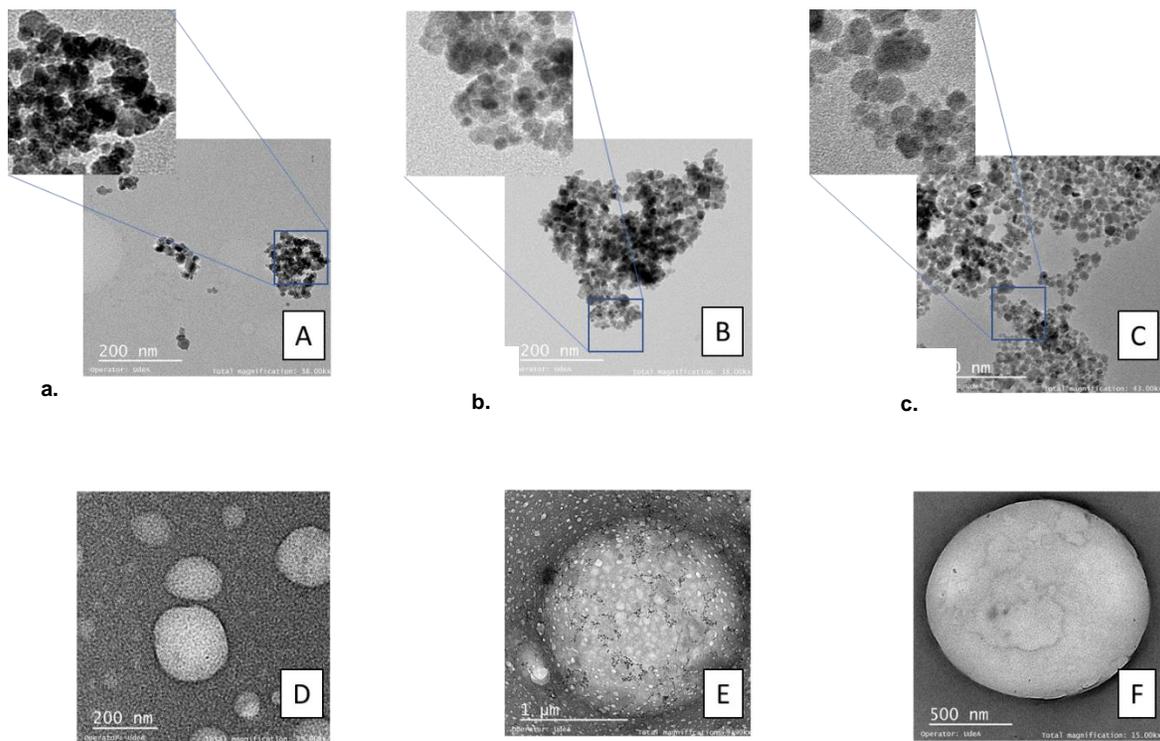


Figura 17. Imágenes de TEM de MNPs: a) con agua, b) AO y c) AO + carbonato de sodio
d-e-f) encapsuladas dentro de los micro-nano-hidrogeles.

En las imágenes correspondientes a los tratamientos de las MNPs se perciben aglomeraciones de estas, sin embargo, se observan cambios significativos entre los diferentes tratamientos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

La Figura 17 (a) las partículas fueron tratadas únicamente con agua desionizada, se perciben áreas muy agregadas, con partículas superpuestas donde no se reconoce fácilmente el área determinada de partículas individuales. La Figura 17 (b) las partículas fueron tratadas con AO, se puede distinguir un poco mejor cada partícula y se encuentran dispersas sin superposiciones. Con respecto a la Figura 17 (c) se observa el área determinada de cada partícula diferenciando su forma, además la aglomeración de partículas disminuye significativamente comparada con los tratamientos anteriores, aunque se ven aglomeraciones en ciertas zonas se puede decir que la estabilización con el AO y la posterior dispersión con carbonato de sodio mejoran las características de las MNPs.

Analizando las imágenes de la Figura 17 restantes, podemos ver la encapsulación de las MNPs previamente descritas dentro de los micro-nano-hidrogeles, como se puede determinar en las tres imágenes inferiores hay pequeños puntos negros localizados dentro de las esferas blancas más grandes que hacen referencia a los micro-nano-hidrogeles. A pesar, de que aún se distinguen partículas fuera de tales hidrogeles igual podemos contar con la gran mayoría encapsulados en estos. Además, gracias a estas imágenes de TEM también se pudo determinar que se sintetizaron hidrogeles de diferentes tamaños, desde la escala micro hasta la nanométrica.

Finalmente, como se puede distinguir en la Figura 18, los tamaños de las partículas varían entre los $6,5 \pm 1,5$ – $16,1 \pm 4,5$ nm e incluso se pueden distinguir partículas de hasta 4 nm.

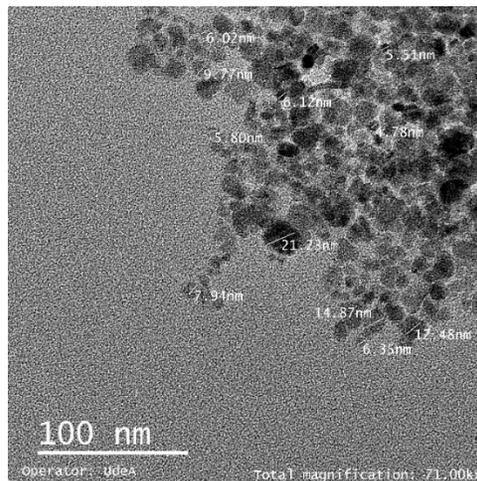


Figura 18. Imágenes de TEM de MNPs.

Comparando con estudios previamente realizados de síntesis de MNPs por métodos de co-precipitación se evidencian igualmente formas esféricas y tamaños menores a 10 nm. A pesar de que estos estudios no utilizan soluciones como el AO

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

para la estabilización de las partículas, estos consideran valores alcalinos de pH en el momento de síntesis y además, usan ambientes libres de oxígeno, por lo que no es necesario el uso de HCl para prevenir la oxidación de los hierros. Debido al control de las variables mencionadas durante el proceso de síntesis logran obtener tamaño de partícula dentro de la escala nanométrica y con buena dispersión (Sodipo & Aziz, 2015).

En otros estudios reportados usando el método de co-precipitación se obtuvieron MNPs a partir de soluciones como nitrato de potasio (KNO_3) como agente oxidativo para el sulfato de sodio hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), la síntesis fue llevada a cabo bajo un ambiente controlado de nitrógeno a 70°C y sin posterior estabilización con surfactante. Los resultados obtenidos fueron MNPs de forma esférica, con un tamaño promedio de 100 nm y con gran aglomeración entre las partículas. A pesar de que su forma pueda brindarle propiedades físicas especiales para su aplicación y la disminución de químicos fuertes como el óxido de amonio no impacta tan severamente el medio ambiente, aún falta desarrollar mejor la técnica con estas soluciones, pues el control en la aglomeración es un factor importante para tener éxito en aplicaciones clínicas para este sistema. Sin embargo, el método de co-precipitación ha evidenciado tener buenos resultados en cuanto a la forma homogénea de las partículas y su tamaño.

Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante EDX en el mismo equipo para identificar los elementos químicos principales. Se analizaron la muestra de MNPs en los tres tratamientos en Figura 19 a), b) y c) se puede ver el análisis de las MNPs puras, las MNPs con AO y las MNPs con AO y Carbonato respectivamente, y en la Figura 19 se puede ver el análisis de las MNPs encapsuladas en los micro-nano-hidrogeles. Los resultados para las cuatro condiciones fueron muy similares, así como se puede diferenciar tres elementos principales que son el carbono el cual está presente en todos los reactivos usados, el hierro debido que las partículas fueron hechas con sales de hierro y la presencia de cobre se debe a la composición de las rejillas usadas para servir las muestras. Al igual que estos tres componentes se puede ver un pico no tan prominente que hace referencia al silicio, se puede concluir que la presencia de este componente es debido a los reactivos que fueron usados para la protección de la rejilla. Y así como lo indican diferentes estudios al trabajar con síntesis MNPs se muestran los mismos tres elementos principales previamente mencionados (Velusamy et al., 2016).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

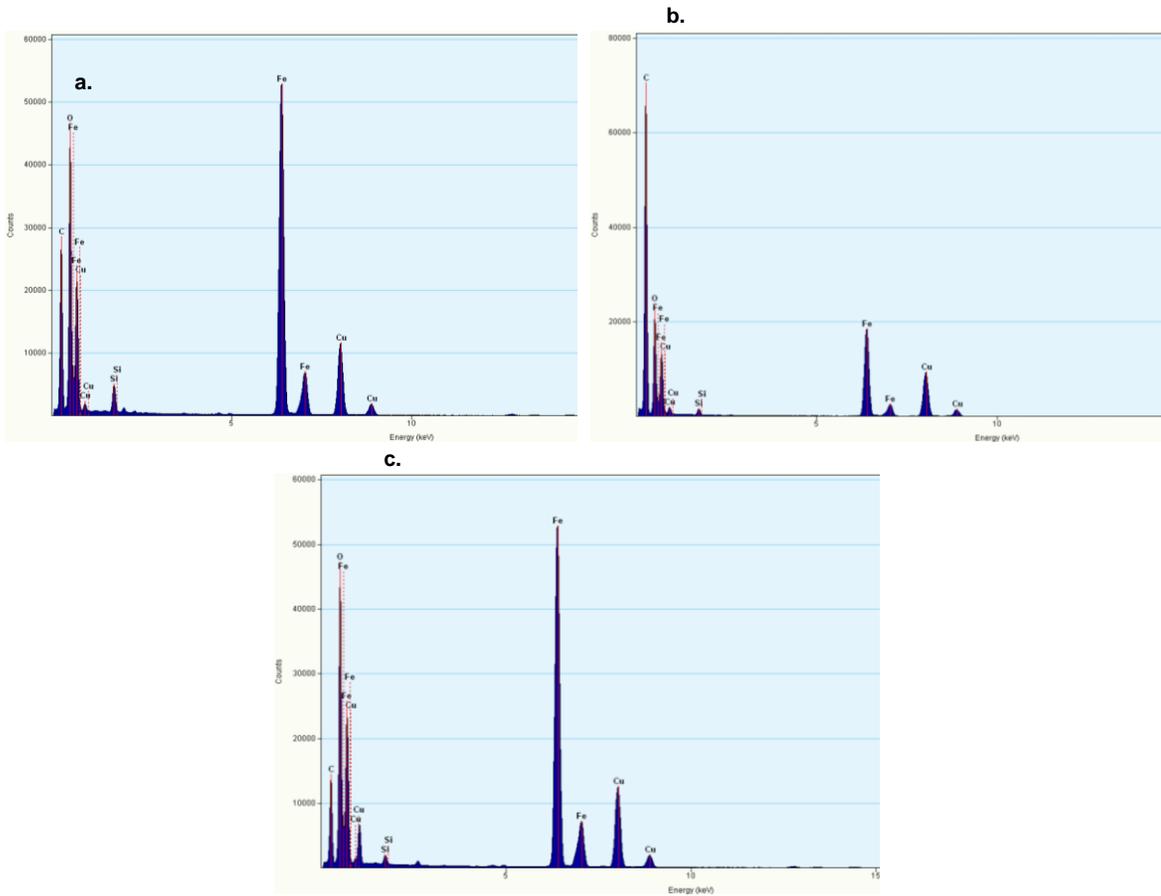


Figura 19. Resultados EDX: a) MNPs, b) MNPs+AO y c) MNPs+AO+ carbonato.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.6 Dispersión de luz dinámica (DLS)

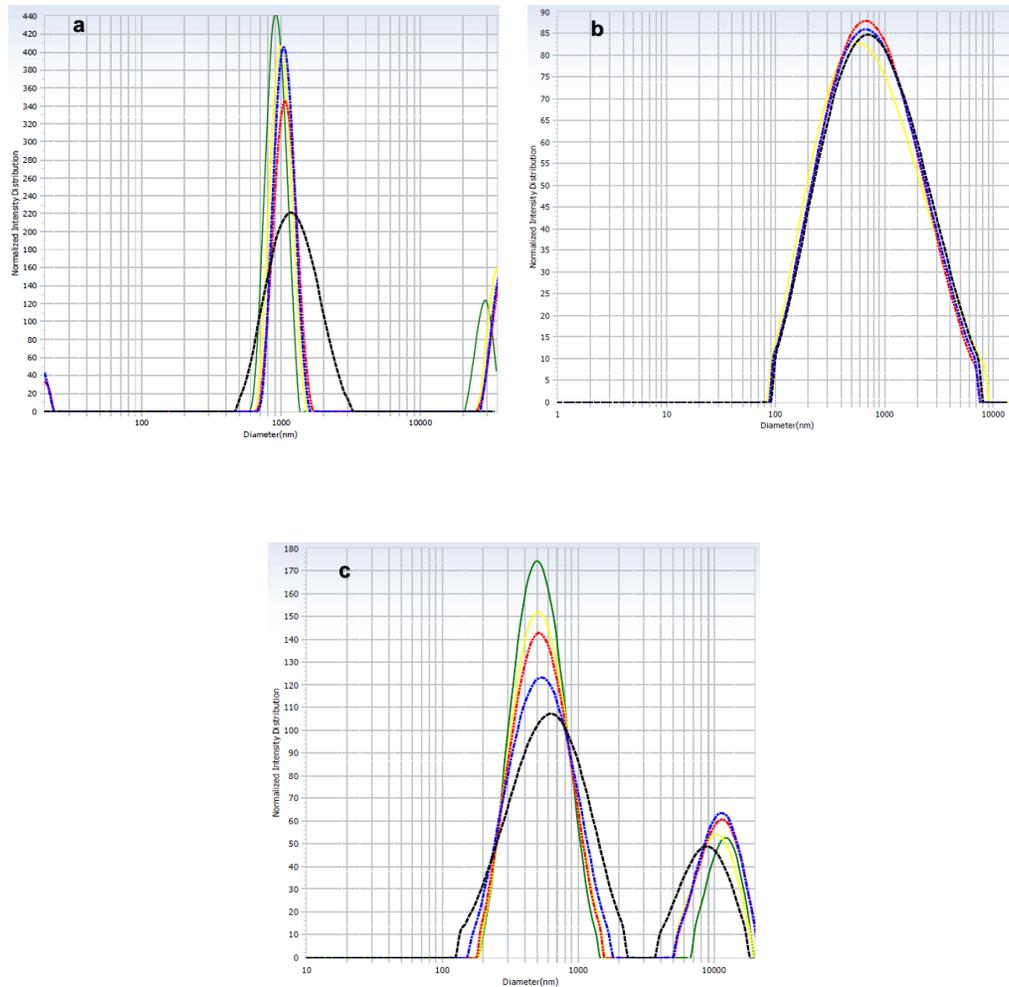


Figura 20. Distribución de intensidad normalizada: a) MNPs en agua, b) MNPs+AO, c) MNPs+AO+carbonato.

La Figura 20 (a), (b) y (c) representa la distribución de tamaño de partícula de MNPs medida por DLS. En las partículas dispersas en agua se identifican dos poblaciones predominando una de las dos, la cual presenta un diámetro hidrodinámico promedio del D (50%) de la población en la distribución de 1055,8 nm y la otra población corresponde al D (90%) con un tamaño promedio de 28068,8, el índice promedio de polidispersidad de la muestra fue 0,536. El diámetro hidrodinámico promedio del D (50%) de las partículas cubiertas con ácido oleico fue 696,3 nm con un índice de polidispersidad de 0,556 el cual se puede observar un aumento en el ancho de distribución geométrica gaussiana con respecto a la dispersión en agua. La

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

ilustración Figura 20 (c) corresponde las partículas recubiertas con AO y dispersas en carbonato de sodio, se identifican dos poblaciones, 620,0 nm diámetro hidrodinámico promedio de la población correspondiente al D (50%) y 10299,5 nm la población correspondiente al D (90%), el índice promedio de polidispersidad fue 0,436.

En un estudio realizado por (Milosevic et al., 2017) obtuvieron MNPs por el método de co-precipitación química similar al establecido en el presente informe, los resultados concernientes al diámetro hidrodinámico de partícula fue evaluado en función de diferentes valores de pH en el cual la síntesis es llevada a cabo, cuando el pH es 10 el diámetro hidrodinámico máximo era 20 nm.

Por otro lado (Yoon, Hang, & Seong, 2017) desarrollaron un sistema ultra-pequeño de nanopartículas superparamagnéticas con un polímero P de naturaleza anfipática y un modelo de droga anti cáncer mediante el método de co-precipitación, la media del diámetro hidrodinámico de la partículas con el polímero fue de 41,0 nm y de todo el sistema fue de $53,2 \pm 4,2$ nm, indicando la obtención de ultra-pequeñas nanopartículas superparamagnéticas puesto que el diámetro hidrodinámico es menos a 50 nm.

De los resultados obtenidos de la prueba DLS todos los índices de polidispersidad se encuentran por debajo de 0,7 el valor límite considerado apto para la técnica de DLS (Instruments, 2011). De las partículas Figura 20 (b) presentan menor tamaño con respecto a Figura 20 (a) esto se puede atribuir a la estabilización de cierta cantidad de la muestra debido a la formación de la capa de ácido oleico, además se observa índices de polidispersidad similares, las pequeñas diferencias puede ser que parte de la muestra probablemente no tuvo un recubrimiento óptimo e interfieren como datos “outlayer” provocados por la aglomeración/agregación de cantidades de partículas o partículas de tamaños grandes. Según el National Cancer Institute, el carbonato de sodio es una sal, la cual provocó una reducción de la alta energía superficial y atracción entre las partículas disminuyendo el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad del sistema.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el ácido oleico y el carbonato de sodio son buenos estabilizantes para la MNPs sintetizadas en este estudio, aunque estudios reportados han obtenidos MNPs estables utilizando otros surfactantes como agentes estabilizantes y condiciones ambientales estrictamente reguladas.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.7 Espectroscopía Infrarrojo (FTIR)

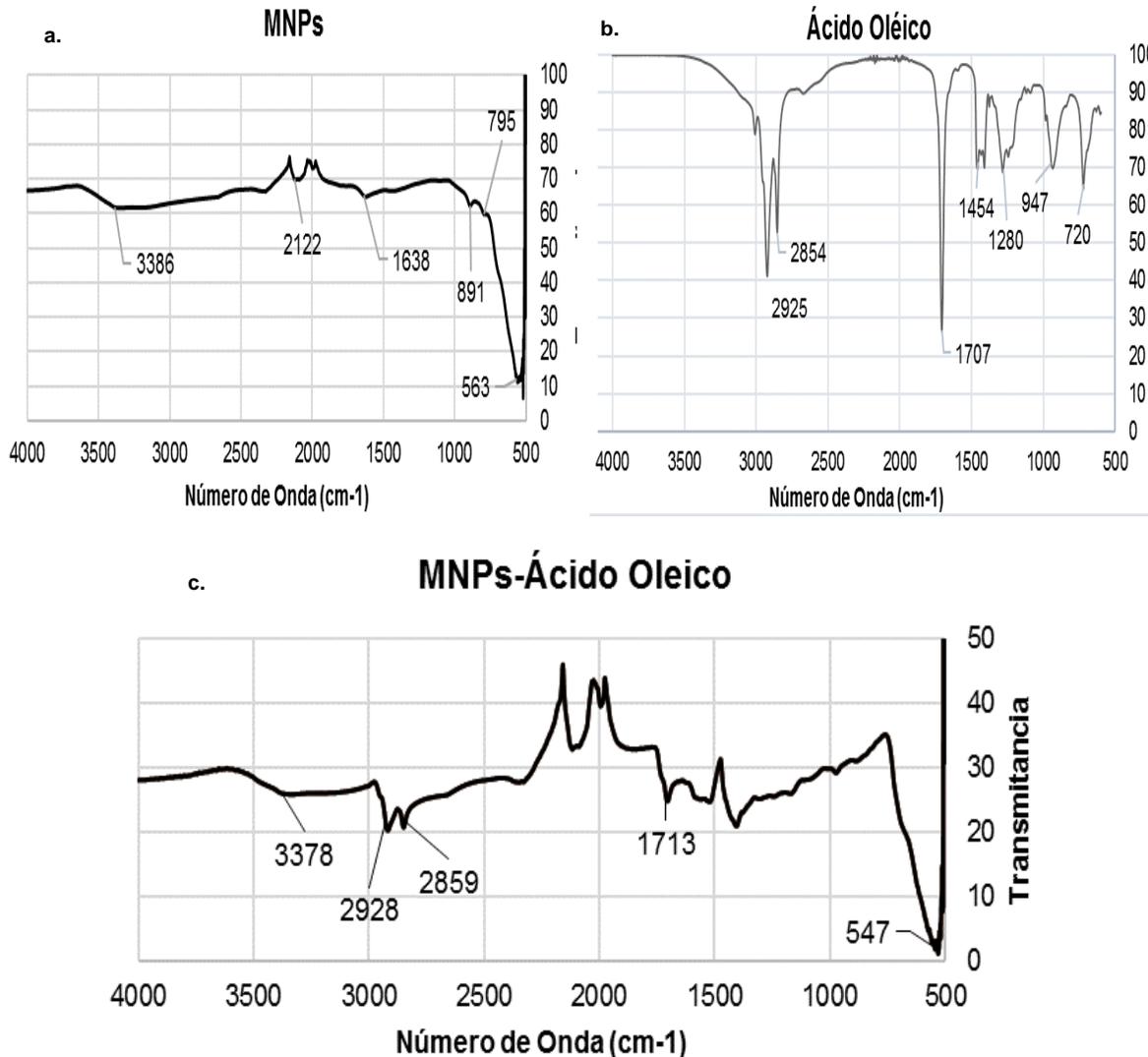


Figura 21. Espectroscopia de infrarrojo: a) MNPs, b) AO, c) MNPs+AO.

En Figura 21 (a), (c) y (b) se observa el espectro de transmitancia de las muestras de MNPs secas con y sin estabilización del surfactante ácido oleico, y el espectro del ácido oleico puro. En Figura 21 (a) corresponde el espectro característico de las MNPs secas sin ningún tratamiento de estabilización y se distinguen ciertos picos característicos que indican la presencia de nanopartículas de óxido de hierro. Uno de los picos se observa en la banda de absorción correspondiente a 563 cm⁻¹ que resulta de la vibración del enlace Fe-O, muy cercano al valor encontrado, este pico es reportado por estudios previos en 581 cm⁻¹ (Easo & Mohanan, 2013). Otros dos

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

picos característicos se encuentran en 3386 cm^{-1} y 1638 cm^{-1} los cuales hacen referencia a enlaces de OH-Agua y magnetita respectivamente y que según valores reportados previamente se han encontrado comúnmente en 3382 cm^{-1} y 1624 cm^{-1} (Velusamy et al., 2016).

La Figura 21 (b) correspondiente al ácido oleico puro, se observan varios picos característicos como los correspondientes a 2925 cm^{-1} y 2859 cm^{-1} , que son asignados al desdoblamiento de CH_3 que denota la presencia de ácido oleico, estos valores son cercanos a los reportados en los estudios de Velusamy *et al.*, quienes identifican estos picos en 2927 cm^{-1} y 2858 cm^{-1} . Otro pico importante está ubicado en 1707 cm^{-1} , el cual se muestra en el pico de 1713 cm^{-1} en la Figura 21 (c), esto debido a la interacción de $\text{C}=\text{O}$ con el átomo de hierro del óxido férrico (Fe_3O_4), según los estudios reportados previamente, la desaparición del pico 1707 cm^{-1} en el espectro de MNPs-ácido oleico Figura 21 (c) demuestra la unión del ácido carboxílico presente en el AO con la superficie de las MNPs (Mosafer, Abnous, Tafaghodi, Jafarzadeh, & Ramezani, 2017). Otro pico característico del Ácido oleico con MNPs se encuentra en 3378 cm^{-1} el cual indica el desdoblamiento del OH en los grupos COOH , y que según los estudios previamente hechos por (Mosafer et al., 2017) y (Velusamy et al., 2016) encuentran este pico entre 3000 cm^{-1} y 3324 cm^{-1} . Finalmente, el pico del ácido oleico puro en 1454 cm^{-1} representa el desdoblamiento del grupo OH del ácido carboxílico. Como prueba para corroborar que el recubrimiento de las MNPs con el ácido oleico es correcta, el pico característico debe desaparecer, lo cual se puede ver claramente en la Figura 21 (c), y según los estudios de Velusamy *et al.*, identifican este pico en 1756 cm^{-1} corroborando igualmente el correcto recubrimiento con AO.

4.8 Difracción de rayos X (DRX)

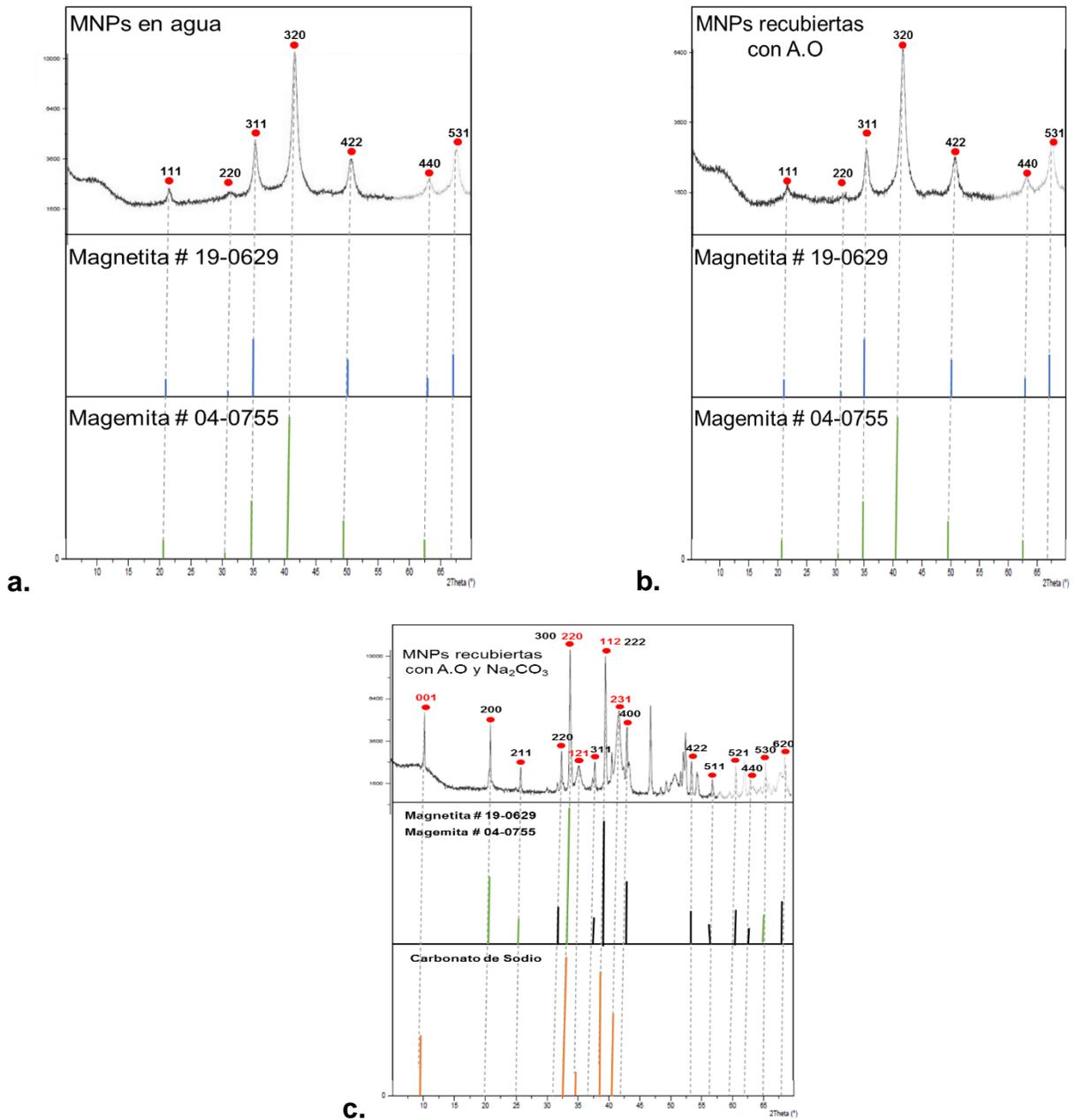


Figura 22. Difractogramas de: a) MNPs en agua, b) MNPs+AO y c) MNPs+AO+carbonato.

La Figura 22 (a),(b) y (c) muestra los difractogramas obtenidos de la prueba de DRX de MNPs disueltas en agua, MNPs recubiertas con ácido oleico y MNPs recubiertas con ácido oleico y dispersas en carbonato de sodio respectivamente. En cada una de las gráficas, el eje Y corresponde a la intensidad de los máximos de difracción,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

es decir, el número de electrones que interactuaron con el haz de luz, la parte superior corresponden al patrón de DRX de las muestras sintetizadas y la parte inferior a los patrones de DRX de la magnetita (líneas azules o negras), magemita (líneas verdes) y carbonato de sodio (líneas naranjas) de los archivos JCPDS.No.19-0629 y JCPDS.No.04-0755 respectivamente establecidos por la Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) (Byong & Seung-Yeop, 2010).

Los archivos de JCPDS establecidos para la magnetita determinan que en el patrón los picos en los 2θ (grados) 18.26, 30.09, 35.42, 53.39, 62.51 y 65.74 aproximadamente corresponden a los planos de difracción en las celdas 111, 220, 311, 422, 440 y 531 respectivamente. El patrón de la magemita muestra en los 2θ (grados) 18.26, 30.09, 35.42, 38.78, 53.88, 62.72 y 65.18 corresponden a los planos de difracción en las celdas 111, 220, 311, 320, 422, 440 y 531 respectivamente (Byong & Seung-Yeop, 2010). Ambas fases comparten algunas celdas en el plano de difracción pero con diferentes intensidades en los picos, así también es reportado por el JCPDS. Por otro lado, el patrón reportado de DRX para el carbonato de sodio contiene los siguientes ángulos 2θ (grados) 9.5, 32.2, 35.14, 33.78 y 37.2 aproximadamente, los cuales corresponden a las siguientes celdas 001, 220, 121, 112 y 231 respectivamente.

Los patrones encontrados en todos los tratamientos de las MNPs son similares y corresponden a la magnetita y magemita, dos fases del hierro, de lo cual se puede decir que las nanopartículas magnéticas sintetizadas tienen ambas fases en su estructura cristalina. Entre los diferentes tratamientos se observan variaciones en la intensidad de los picos, en las MNPs recubiertas con ácido oleico la intensidad de los picos se atenúan significativamente como evidencia de dicho recubrimiento, así mismo fue reportado por (Shete et al., 2014) con la diferencia que el agente de recubrimiento fue el quitosano y (Xu et al., 2011) obtuvieron dicho comportamiento en la intensidades de los picos a partir de un sistema de MNPs + bloque de polímero anfipático + nanopartículas hidrofóbicas. Sin embargo, las MNPs recubiertas con ácido oleico y dispersas en carbonato de sodio conservan algunos picos con intensidades similares a la muestra en agua y otros picos mucho más prominentes esto podría atribuirse a la dispersión de ciertas partículas individuales que quizás no tuvieron un recubrimiento óptimo con el ácido oleico.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4.9 Ensayo MTT

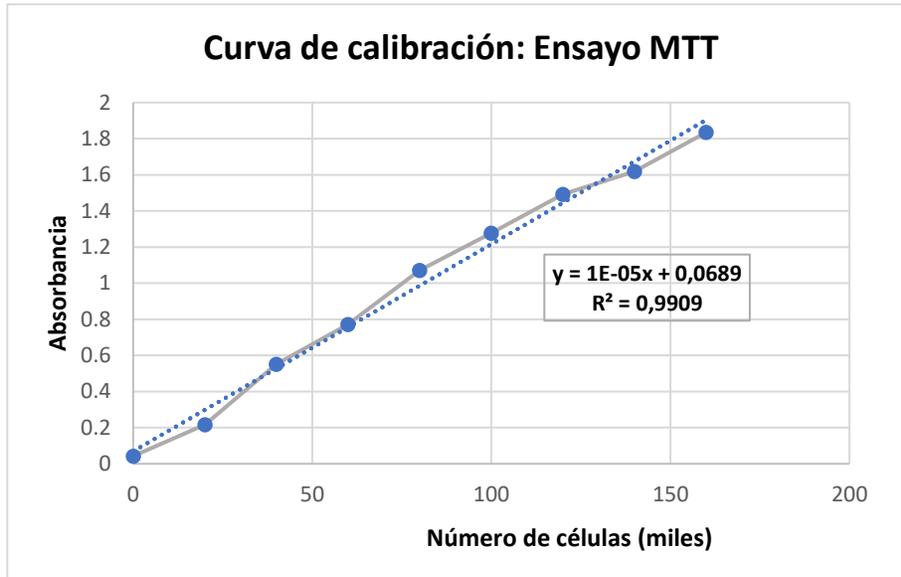


Figura 23. Curva de calibración.

La Figura 23 representa la curva de calibración del ensayo, el número de células sembradas fue desde 20.000-160.000. La ecuación que se obtuvo luego de graficar es: $y = 1E-05x + 0,0689$ con un $R^2 = 0,9909$, es decir, una alta confiabilidad de los datos lo cual sirve como referencia al momento de comparar niveles de absorbancia con los tratamientos.

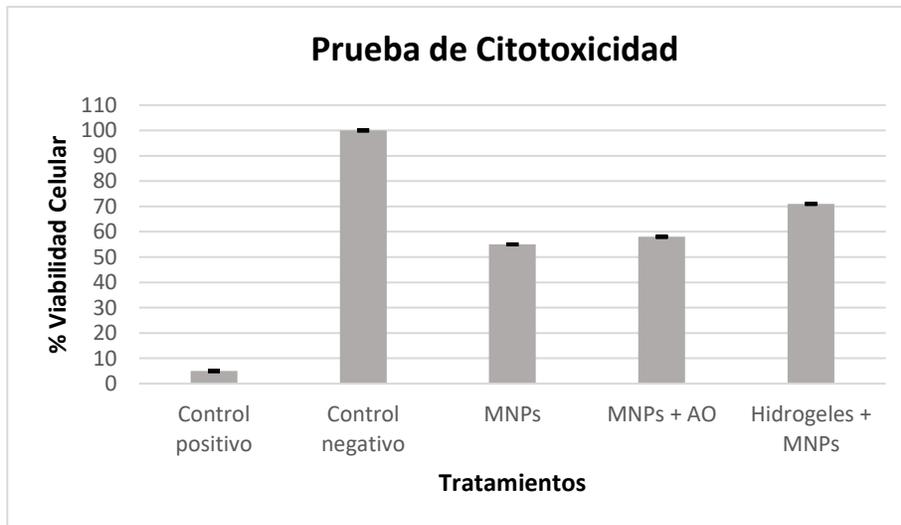


Figura 24. Niveles de viabilidad celular.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

La Figura 24 representa los niveles de viabilidad celular de los tratamientos y controles del ensayo MTT, las barras de error corresponden a la desviación estándar del número de muestras (n=4) por cada tratamiento. Los niveles de viabilidad de los controles son óptimos para ser usados como referencia en el análisis. Se puede identificar que el nivel de viabilidad fue mayor en las muestras de MNPs encapsulada en los micro-nano hidrogeles de alginato/quitosano, además la viabilidad aumenta cuando las partículas magnéticas son cubiertas con ácido oleico con respecto a las partículas sin recubrimiento. Es adecuado señalar que según la norma ISO 10993 se considera un material citotóxico cuando la viabilidad obtenida después del tratamiento con éste es menor al 75 %, este es el caso de las muestras analizadas. Sin embargo, según (Shahrousvand et al., 2017) cuando el porcentaje de viabilidad celular es < 30% esto sugiere que el material es severamente citotóxico, cuando esta entre 30 y 60 % es moderadamente citotóxico, entre 60 y 90% es ligeramente citotóxico y cuando es del 90% el material es no tóxico. Es decir, que las MNPs con y sin ácido oleico son moderadamente citotóxicas y el sistema de hidrogel-partículas ligeramente citotóxico dado que permitió mejorar la viabilidad celular.

Estudios similares en los que sintetizaron MNPs, el porcentaje de viabilidad celular reportado por (Yoon et al., 2017) varió desde 82% hasta 75% aproximadamente en concentraciones de MNPs recubiertas en polímero P de 0.05 mg/mL a 0,25 mg/mL respectivamente. En comparación con el presente informe se obtuvo 71% de viabilidad celular para las MNPs encapsuladas en hidrogeles de alginato/quitosano a una concentración de 0.8 mg/mL evidenciando que el sistema desarrollado es potencial candidato para ser biocompatible a una concentración menor de MNPs como es reportada en la literatura.

Por otro lado, (Shete et al., 2014) reportan porcentajes de viabilidad del 98% y 100% de MNPs a concentraciones de 0.1,0.5,1.0,1.5 y 2.0 mg/mL. Los resultados obtenidos en la Figura 24 representan viabilidad celular de MNPs en concentraciones de 100 mg/ mL y porcentajes de viabilidad desde 55 % y 58%, es decir, que a pesar que son altas concentraciones de partículas la toxicidad no está muy lejos del 75% establecido como biocompatibles, en relación a los resultados anteriormente mencionados por (Shete et al., 2014). De esta manera se considera que las partículas sintetizadas en concentraciones menores podrían ser biocompatibles.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

Con el método implementado para la síntesis de las nanopartículas magnéticas, las variables controladas durante el proceso como la temperatura, pH y estabilizadores resultaron claves en la obtención de partículas esféricas definidas, estables en solución coloidal debido a la presencia de ácido oleico y dispersas en presencia de carbonato de sodio, de tamaño desde los 4.78 nm y consideradas pura en cuanto a las fases cristalinas obtenidas con posibilidades de ser clasificadas superparamagnéticas confiriéndole características potenciales en aplicaciones médicas en hipertermia nano-magnética.

Un gran aporte son los hidrogeles de alginato/quitosano obtenidos en la escala micro-nano métrica de forma esférica definida, generando un gran aporte en implementaciones médicas futuras como hidrogeles biocompatibles y termosensibles en conjunto con las nanopartículas de interesantes características como las sintetizadas durante esta investigación.

El sistema planteado mostró mediante la microscopía electrónica de transmisión nanopartículas magnéticas encapsuladas en hidrogeles termosensibles con una forma esférica definida, partículas dispersas y en su mayoría libres de exceso de polímero; con un valor agregado de estar dentro de la escala micro-nano métrica.

El efecto citotóxico de las MNPs sobre la línea celular evaluada fue valorado como moderado a ligeramente citotóxico, con porcentajes de viabilidad celular del 55% y 58%, a una concentración alta (100 mg/mL) en los que estudios reportados no presentan. El sistema hidrogel-partícula se debe someter a la misma concentración de partículas e implementarse de manera indirecta al igual que las MNPs en el ensayo MTT para ser comparados. Así mismo, es necesario realizar pruebas de citotoxicidad a las partículas magnéticas a menores concentraciones, en un rango de 0.5 – a 2 mg/mL.

Consideraciones en las etapas futuras de la investigación, ajustar cantidades de alginato/quitosano en una proporción 1:0.5 con el fin de lograr un mejor entrecruzamiento entre los polímeros, es decir, que ocurra los enlaces iónicos de cada molécula entre ambos materiales para lograr redes completamente entrecruzadas, el cual favorece la encapsulación de nanopartículas debido a que se podrán encapsular dentro de las esferas y no serán atrapadas en el polímero remanente que queda sin entrecruzarse. Para las MNPs en el proceso de síntesis utilizar reactivo como NaOH en reposición del amonio con el fin de tener una propuesta ambientalmente positiva y mejorar la biocompatibilidad del sistema, realizar pruebas de potencial z para confirmar cuantitativamente la estabilidad de las partículas en soluciones coloidales. Además al momento de realizar caracterizaciones diluir un poco más las partículas para lograr obtener resultados homogéneos en cuanto a la dispersión de las partículas.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Finalmente con las conclusiones mencionadas en lo largo de este informe se considera que el sistema obtenido tiene alto potencial como método de hipertermia nano-magnética para tratamiento de cáncer, por esta razón es necesario plantear un investigación en la cual se plantee el diseño e implementación del sistema como tratamiento.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

REFERENCIAS

- Akbarzadeh, A., Samiei, M., & Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles : preparation , physical properties , and applications in biomedicine, 1–13.
- American Cancer Society. (2015). Tipos comunes de tratamiento para el cáncer.
- Armijo, J.A, Florez, J., & Mediavilla, A. (2008). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos . (Quinta, pp. 47–71). Pamplona: Masson S.A. Retrieved from [http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/3/CAP+4+\(47-72\).PDF](http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/3/CAP+4+(47-72).PDF)
- Baysal, K., Aroguz, A. Z., Adiguzel, Z., & Baysal, B. M. (2013). International Journal of Biological Macromolecules Chitosan / alginate crosslinked hydrogels : Preparation , characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 342–348. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35–52. [http://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00160-7](http://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00160-7)
- Bhattacharjee, S. (2016). Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Byong, Y. Y., & Seung-Yeop, K. (2010). Assembly of Magnetite Nanoparticles into Spherical Mesoporous Aggregates with a 3-D Wormhole-Like Porous Structure. *Materials Chemistry*, (c), 1–9. <http://doi.org/10.1039/C0JM01274B>
- Central Microscopy, T. university of I. (n.d.). Scanning Electron Microscopy. Retrieved from <https://cmrf.research.uiowa.edu/scanning-electron-microscopy>
- Crucho, C. I. C., & Teresa, M. (2017). Polymeric nanoparticles : A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science & Engineering C*, 80, 771–784. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Easo, S. L., & Mohanan, P. V. (2013). Dextran stabilized iron oxide nanoparticles : Synthesis , characterization and in vitro studies, 92, 726–732.
- Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M. (2010). Iranian Chemical Society Magnetic Nanoparticles : Synthesis , Stabilization , Functionalization , Characterization ,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

and Applications, 7(1), 1–37.

Hou, R., Nie, L., Du, G., Xiong, X., & Fu, J. (2015). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Natural polysaccharides promote chondrocyte adhesion and proliferation on magnetic nanoparticle / PVA composite hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 146–154. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.008>

Instruments, M. (2011). Inform white paper dynamic light scattering, 1–6.

Kandasamy, G., & Maity, D. (2015). Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics, 496, 191–218.

Kayode, B., & Abdul, A. (2016). Journal of Magnetism and Magnetic Materials Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 416, 275–291. <http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.05.019>

Kumar, A., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, 26, 3995–4021. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>

Laurent, S., Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., ... Muller, R. N. (2016). Laurent S , Forge D , Port M , Roch A , Robic C , Vander Elst L , Muller RNMagnetic iron oxide nanoparticles : synthesis , stabilization , vectorization , physicochemical characterizations ,... *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis , Stabilization*, (August). <http://doi.org/10.1021/cr068445e>

Laurent, S., Saei, A. A., Behzadi, S., & Panahifar, A. (2014). Expert Opinion on Drug Delivery Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents : opportunities and challenges Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents : opportunities and challenges, 5247(March 2017). <http://doi.org/10.1517/17425247.2014.924501>

Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Li, B., Chen, Y., & Lu, T. (2013). Magnetic Hydrogels and Their Potential Biomedical Applications, 660–672. <http://doi.org/10.1002/adfm.201201708>

Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering, (2), 1–14.

Ling, D., Lee, N., & Hyeon, T. (2015). Chemical Synthesis and Assembly of Uniformly Sized Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. <http://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00038>

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- Luz, M., & Piscioti, M. (2009). Roberto D. Zysler, Dr.
- M, M. L. O., Huertas, J. A., C, J. I. M., & G, J. C. R. (2015). Observatorio Nacional de Cáncer Colombia Colombian Observatory on Cáncer.
- Mahdavi, M., Ahmad, M. Bin, Haron, J., Namvar, F., Nadi, B., Zaki, M., ... Amin, J. (2013). Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, 7533–7548. <http://doi.org/10.3390/molecules18077533>
- Mazuelas, A. E. (1992). *CARACTERIZACION POR DIFRACCION DE RAYOS X DE IIETEROESTRUCTURAS DE SEMICONDUCTORES 111-Y. APLICACION AL DISEÑO DE SUPERREDES TENSADAS PARA EPITAXIAS DE GaAs/S*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/X/1/X1003401.pdf>
- Milosevic, I., Motte, L., Aoun, B., Li, T., Ren, Y., Sun, C., & Saboungi, M. (2017). Biochimica et Biophysica Acta Effects of coating spherical iron oxide nanoparticles ☆. *BBA - General Subjects*, 1861(1), 3621–3626. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.016>
- Mosafer, J., Abnous, K., Tafaghodi, M., Jafarzadeh, H., & Ramezani, M. (2017). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Preparation and characterization of uniform-sized PLGA nanospheres encapsulated with oleic acid-coated magnetic-Fe₃O₄ nanoparticles for simultaneous diagnostic and therapeutic applicatio, 514, 146–154.
- Nuevos, G. De, Universidad, M., Ehu, V., & Facultad, U. P. V. (n.d.). No Title, 1–42.
- Plan nacional para el control del cáncer en colombia 2012-2020. (2012).
- Pol, R. I. (2002). Revista Iberoamericana Polímeros Escobar et al. Volumen 3(3) Julio 2002, 3(3), 1–25.
- Qi, X., Hu, X., Wei, W., Yu, H., Li, J., Zhang, J., & Dong, W. (2015). Investigation of Salecan / poly (vinyl alcohol) hydrogels prepared by freeze / thaw method. *Carbohydrate Polymers*, 118, 60–69. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.021>
- Ramos, M. (2011). Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas, (72), 629–646.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., & Minor, L. (2016). *Cell Viability Assays*. (P. Terry L Riss & L. Minor, Eds.). Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.p

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

df

- Schweitzer, J. (Purdue U. (n.d.). Scanning Electron Microscope. Retrieved from https://www.purdue.edu/ehps/rem/laboratory/equipment_safety/Research_Equipment/sem.html
- Shahrousvand, M., Hoseinian, M. S., Ghollasi, M., Karbalaehmahdi, A., Salimi, A., & Tabar, F. A. (2017). Flexible magnetic polyurethane/Fe₂O₃ nanoparticles as organic-inorganic nanocomposites for biomedical applications: Properties and cell behavior. *Materials Science and Engineering C*, *74*, 556–567. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.117>
- Shete, P. B., Patil, R. M., Thorat, N. D., Prasad, A., Ningthoujam, R. S., Ghosh, S. J., & Pawar, S. H. (2014). Applied Surface Science Magnetic chitosan nanocomposite for hyperthermia therapy application: Preparation, characterization and in vitro experiments, *288*, 149–157.
- Simó, G., Fernández- Fernández, E., Vila- Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez- Nogales, J. M. (2017). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, *170*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.013>
- Sodipo, B. K., & Aziz, A. A. (2015). Ultrasonics Sonochemistry Non-seeded synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles incorporated into silica nanoparticles via ultrasound, *23*, 354–359.
- Spectroscopy, P. C., Scattering, Q. L., Motion, B., & Motion, B. (n.d.). Dynamic Light Scattering (DLS) DLS Measurement – Scattered Light Intensity Fluctuation.
- Urquijo Morales, J. (2007). SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y SU IMPLEMENTACIÓN COMO FERROFLUIDOS.
- Vanegas, M. E., Vázquez, V., Moscoso, D., & Cruzat, C. (2014). Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas del tipo Fe₃O₄ / TiO₂, efecto del pH en la dispersión y estabilización en soluciones acuosas, *5*(1), 43–55.
- Velusamy, P., Chia-hung, S., Shritama, A., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., & Pandian, K. (2016). Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Synthesis of oleic acid coated iron oxide nanoparticles and its role in anti-biofilm activity against clinical isolates of bacterial pathogens. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *59*, 450–456. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.07.018>
- Xu, H., Cheng, L., Wang, C., Ma, X., Li, Y., & Liu, Z. (2011). Biomaterials Polymer encapsulated upconversion nanoparticle / iron oxide nanocomposites for multimodal imaging and magnetic targeted drug delivery. *Biomaterials*, *32*(35),

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

9364–9373. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.053>

Yoon, J., Hang, S., & Seong, H. (2017). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Multifunctional ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a theranostic agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 520(February), 892–902. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.080>

6. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo síntesis de nanopartículas magnéticas.

Materiales y Equipos

Tabla 1. Materiales y Equipos.

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Agitador Magnético	3	Beaker 200ml -100ml – 25ml
2	Balón Volumétrico 100 ml	1	Ultrasonido (Elma)
1	Plancha térmica con agitación magnética (SCHOTT instruments)	-	Tubos Falcon
1	Imán	1	Bureta 25 ml
-	Pipetas Pasteur	1	Pipetas de vidrio
1	Balanza	1	pHmetro (HACH sensION3)
1	Espátulas		

Reactivos

Tabla 2. Reactivos.

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
Cloruro de Hierro III	0.074 g	2 M	R.A Chemicals
Cloruro de Hierro II	0.190 g	1 M	Sigma-Aldrich
Ácido oleico	1ml	-	Sigma-Aldrich

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Carbonato de sodio	20 g	1 M	
NH_4OH	25 ml	0.7 M	R-A Chemicals

Diseño experimental

1. Lavar los implementos de vidriería que serán usados con jabón neutro y agua destilada, dejar secar a temperatura ambiente o en autoclave y envolver en papel plástico si no serán usados inmediatamente.
2. Pesar en la balanza analítica 13,52 g de Fe (III) y 9,94 g de Fe (II) y depositar en 2 beaker por separado.
3. Preparar en un balón volumétrico 20 ml de HCl 2M.
4. Adicionar 25 y 50 ml de HCl a cada Beaker con hierro II y hierro III respectivamente.
5. Preparar en un balón volumétrico 100 ml de NH_3 0.7 M.
6. En un beaker de 100 ml adicionar 0.5 ml de hierro II y 2 ml de hierro III.
7. Ubicar el beaker en la plancha térmica a 60°C en baño maría y agitación de 400 rpm.
8. Llenar la bureta con 25 ml de la solución de NH_3 .
9. Abrir la bureta de tal forma que el NH_3 caiga en la solución de hierros gota a gota a razón de 1 ml/min.
Nota: Verificar constantemente el pH, alcanzado un valor de 10 suspender agitación.
10. Terminar de añadir todo el NH_3 y verificar un cambio de color negro.
11. Retirar el beaker de la plancha térmica y reposar la solución por 10 minutos.
12. Retirar el agitador magnético.
13. Decantar la solución de 10 – 15 minutos con el imán debajo del beaker, comprobando que la atracción magnética.
14. Recolectar y almacenar sobrenadante en tubos falcon y almacenar en la nevera.
15. El precipitado se lava 3 veces con agua desionizada, por cada lavado dejar decantando 10 minutos (almacenar el sobrenadante).
16. Separar en dos contenedores previamente pesados la muestra de MNPs obtenida.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

17. Contenedor #1: Realizar lavados con 8 ml de metanol a diferentes concentraciones (50%,80%,90% y 100%).
- Contenedor #2: Almacenar las MNPs en lavado de agua DI
18. Secar las muestras durante la noche dentro de la cabina de flujo laminar.
19. Pesar muestra del contenedor #1.
20. Adicionar 3% w/w de ácido oleico a la muestra seca.
21. Dejar reaccionar la mezcla mediante ultrasonificación a 30 °C durante la noche.
22. Retirar el exceso de ácido oleico mediante lavados con metanol.
23. Secar las muestras durante la noche dentro de la cabina de flujo laminar.
24. Dispersar 5 mg de MNPs en 1 ml de carbonato de sodio a 1M.
25. Ultrasonicar la muestra durante 1 hora.
26. Almacenar una parte de la solución en la nevera a 20°C o a temperatura ambiente.
27. Liofilizar otra parte de la solución para obtener MNPs secas.

Cálculos

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{litros de solución}}$$

$$\text{litros de solución} * \text{peso molecular} = \text{gramos de soluto}$$

- Hierro III

$$V_f = 50 \text{ ml}$$

$$\text{PM} = 270.3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\frac{1 \text{ moles}}{\text{L}} * 0.05 \text{ L} * \frac{270.3 \text{ g}}{\text{mol}} = 13,52 \text{ g de Fe}_3$$

- Hierro II

$$V_f = 25 \text{ ml}$$

$$\text{PM} = 198.81 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\frac{2 \text{ moles}}{\text{L}} * 0.025 \text{ L} * \frac{198.81 \text{ g}}{\text{mol}} = 9.94 \text{ g de Fe}_3$$

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- HCl al 37%

$$V_f = 100 \text{ ml}$$

$$\frac{37g}{100 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol}}{36.46} * \frac{1000 \text{ ml}}{L} = \frac{10 \text{ mol}}{L}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$\frac{2M * 100 \text{ ml}}{10M} = 20 \text{ ml de HCl}$$

80 ml de agua destilada

- NH_3 al 30%

$$V_f = 100 \text{ ml}$$

$$\frac{30g}{100 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol}}{35.05} * \frac{1000 \text{ ml}}{L} = \frac{8.6 \text{ mol}}{L}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$\frac{0.7M * 100 \text{ ml}}{8.6 M} = 8.1 \text{ ml de } NH_3.$$

91,9 ml de agua destilada

- Carbonato de sodio 0.1M

$$\frac{0.1 \text{ mol}}{L} * 0.001L * \frac{105.988 \text{ g}}{\text{mol}} = 0.01059 \text{ g de carbonato de sodio}$$

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anexo 2. Protocolo síntesis de microhidrogeles de alginato-quitosano

Materiales y Equipos

No.	Equipos	Marca	No.	Materiales
1	pH-metro	HACH sensION3	1	Agitador Magnético
2	Ultrasonido	Elma	3	Pipetas Pasteur
1	Plancha térmica con agitación magnética	SCHOTT instruments	-	Tubos Falcon 15ml y 50ml
1	Liofilizador	VirTis SP SCIENTIFIC	2	Probeta 25 ml
1	Refrigerador		1	Pipetas de vidrio
1	Balanza analítica	Precisa	1	Balón Volumétrico 100 ml
1	Termocupla		-	Papel aluminio
1	Cabina flujo laminar	Frontier JUNIOR	-	Papel vinipel
1	Sistema de filtración	Millipore	2	Beaker 50 ml
1	Centrifuga	Hettich ZENTRIFUGE EBA 20		

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
Alginato	1 g	-	Sigma-Aldrich

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Quitosano	1 g	-	Sigma-Aldrich
Ácido acético	5 ml	99.5%	Chemí
<i>NaOH</i>	5 ml	-	Chemí
<i>HCl</i>	5 ml	-	Chemí
Agua destilada	500 ml	-	-

Diseño experimental

- **Preparación de alginato**

1. Lavar los implementos de vidriería que serán usados con jabón neutro y agua destilada, dejar secar a temperatura ambiente o en autoclave y envolver en papel plástico si no serán usados inmediatamente
2. Pesar 1 g de alginato por 100 ml de agua destilada (1:100).
3. En un beaker de 200 ml disolver 1 g de alginato en 50 ml de agua destilada y luego agregar 50 ml de agua adicional.
4. Ubicar el beaker en la plancha térmica a 80°C y agitación de 100 rpm durante 4 horas.
5. Logrado las 4 horas suspender la temperatura y esperar lograr la temperatura ambiente.
6. Filtrar la solución en el sistema de vacío para eliminar impurezas.
7. Ajustar pH 6.1 - 6.5 con *NaOH* y *HCl*.
8. Almacenar el beaker en la nevera.

- **Preparación de quitosano**

1. Lavar los implementos de vidriería que serán usados con jabón neutro y agua destilada, dejar secar a temperatura ambiente o en autoclave y envolver en papel plástico si no serán usados inmediatamente
2. Pesar 1 g de quitosano por 100 ml de agua destilada (1:100).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3. En beaker de 200 ml disolver 1 g de quitosano en 50 ml de agua destilada y luego agregar 50 ml de agua adicional.
4. Ubicar el beaker en la plancha térmica a 40°C y agitación de 100 rpm durante 1 hora.
5. Logrado el tiempo reposar la muestra hasta lograr la temperatura ambiente.
6. Agregar ácido acético 2 ml en 100 ml de muestra (2:100).
7. Agitar durante 3 horas a 40 °C y agitación de 200 rpm.
8. Filtrar la solución en el sistema de vacío para eliminar impurezas.
9. Ajustar pH 3.1 - 3.5 con *NaOH* y *HCl*.
10. Almacenar el beaker en la nevera.

- **Preparación de microhidrogeles**

1. Lavar los implementos de vidriería que serán usados con jabón neutro y agua destilada, dejar secar a temperatura ambiente o en autoclave y envolver en papel plástico si no serán usados inmediatamente
2. Ubicar beaker de 20 ml en la plancha térmica, adicionar 10 ml de quitosano.
3. Adicionar lentamente 10 ml de alginato al beaker anterior y agitar a 100 rpm durante 24 horas.
4. Centrifugar la solución a 2000 rpm durante 10 minutos para eliminar el contenido que no logro el entrecruzamiento.
5. Adicionar gota a gota 1 ml de tripolifosfato de sodio y agitar durante 1 hora a 100 rpm.
6. Centrifugar tres veces la solución a 2000 rpm durante 10 minutos y agregar agua con el fin de retirar el exceso de polímero.
7. Filtrar la solución con acetona 10 veces para lavar las micro cápsulas formadas. En una proporción 1:10.
8. Almacenar la solución en la nevera.

Cálculos

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{litros de solución}}$$

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

*litros de solución * peso molecular = gramos de soluto*

- Tripolifosfato de sodio

$$V_f = 10 \text{ ml}$$

$$PM = 367.8 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\frac{\text{gramos de soluto}}{367.8 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 10 \text{ ml}} = 10 \text{ mM}$$

$$\text{gramos de soluto} = 3.678 \text{ gr}$$

Anexo 3. Protocolo encapsulación de nanopartículas magnéticas en microhidrogeles de alginato-quitosano.

Materiales y Equipos

Tabla 3. Materiales y Equipos.

No.	Equipos	Marca	No.	Materiales
1	Plancha térmica con agitación magnética	SCHOTT Instruments	1	Agitador Magnético
2	Ultrasonido	Elma	3	Pipetas Pasteur
1	Balanza analítica		-	Tubos Falcon 15ml y 50ml
1	Liofilizador	VirTis SP SCIENTIFIC	2	Probeta 25 ml
1	Sistema de filtración	Millipore	2	Beaker 50 ml

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
Alginato - quitosano	2 ml	-	Sigma-Aldrich
PVA	1 g	1% - 3%	Sigma-Aldrich
Tripolifosfato	5 ml	-	Sigma-Aldrich
Nanopartículas magnéticas	10 mg	-	-
<i>HCl</i>	5 ml	-	Chemí
Agua destilada	500 ml	-	-

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Diseño experimental

1. Ubicar beaker de 20 ml en la plancha térmica, adicionar 5 ml de quitosano.
2. Adicionar lentamente 5 ml de alginato al beaker anterior y agitar a 100 rpm durante 24 horas.
3. Centrifugar la solución a 2000 rpm durante 10 minutos para eliminar el contenido que no logro el entrecruzamiento.
4. Dividir el contenido de la muestra en dos beaker: beaker #1 y beaker #2
5. Adicionar 5 mg de MNPs a la mezcla de alginato-quitosano del beaker #1
6. Ultrasonicar la mezcla durante 10 minutos.
7. Adicionar gota a gota 1 ml de tripolifosfato de sodio y ultrasonicar durante 30 minutos.
8. Centrifugar tres veces la solución a 2000 rpm durante 10 minutos y agregar agua con el fin de retirar el exceso de polímero.
9. Filtrar la solución con acetona 10 veces para lavar micro cápsulas formadas. En una proporción 1:10.
10. Almacenar la solución en la nevera.
11. Preparar 8 ml de solución de PVA al 3% y 10 ml de solución de PVA al 1% en agua desionizada a 70 °C y 500 rpm (Xu et al., 2011).
12. Esperar que la solución de PVA logre llegar a temperatura ambiente.
13. Disolver 5 mg de MNPs en 2 ml de mezcla alginato-quitosano del beaker #2 y ultrasonicar durante 10 minutos (Mosafer et al., 2017).
14. Agregar la mezcla oleica anterior a 4 ml de solución de PVA al 3%.
15. Ultrasonicar durante 10 minutos.
16. La solución obtenida diluirla en 10 ml de solución acuosa de PVA al 1%.
17. Lavar 3 veces con agua desionizada para retirar el exceso de polímeros.
18. Almacenar las muestra en la nevera.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anexo 4. Protocolo para la preparación de las muestras y rejillas para TEM.

Materiales y Equipos

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Vortex (Thermo Scientific)	1	Cámara de Flujo Laminar
-	Jeringa de Insulina	1	Beaker 50ml
1	Pipeta Pasteur	-	Porta objetos
1	Tubo Eppendorf 5ml	-	Rejillas de cobre
1	Espátula	1	Balanza (Precisa)

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
MNPs secas	1mg	-	Previamente sintetizado
Hidrogeles de alginato-quitosano	0,5ml	-	Previamente sintetizado
Agua desionizada	20ml	-	-
Formvar	20ml	1%	Sigma Aldrich

Preparación de las rejillas

1. Lavar debidamente la vidriería que se vaya a utilizar
2. Tomar 20ml de Formvar y verterlo dentro de un Beaker de 50ml
3. Sumergir el portaobjetos dentro de la solución de Formvar tratando de cubrir la mayor área durante 5 segundos
4. Retirar el portaobjetos del Formvar y sumergirlo en un beaker con agua hasta lograr despegar la película y por tensión superficial dejarla sobre el agua

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

5. Colocar muy delicadamente las rejillas de cobre sobre la película por cualquiera de sus lados. Nota: Tratar de colocar las rejillas siempre por el mismo lado
6. Con el mismo portaobjetos pescar la película con las rejillas encima del agua y dejar secar durante 24 horas
7. Recortar cada rejilla y almacenar en el porta rejillas.

Preparación de muestra de MNPs

1. Pesar 1mg aproximadamente de cada muestra seca de MNPs
2. Diluir el polvo de MNPs en 4ml de agua desionizada
3. Llevar a vortex por 10 segundos
4. Servir con una jeringa de insulina una gota sobre cada rejilla previamente preparada
5. Dejar secar durante 24 horas

Preparación de muestra de hidrogel

1. Tomar con una jeringa de insulina 0,5ml de muestra de hidrogel
2. Servir con una jeringa de insulina una gota sobre cada rejilla previamente preparada
3. Dejar secar durante 24 horas

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anexo 5. Protocolo preparación de muestras para Espectroscopía de Infrarrojo.

Materiales y Equipos

No.	Equipos	Marca	No.	Materiales
1	Espectrofotómetro	Perkin Elmer Spectrum 100	1	Pipetas Pasteur

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
Acetona	10 ml	-	Aldrich
Etanol	10 ml	70%	Aldrich
Nanopartículas magnéticas	20 mg	-	-
Nanopartículas magnéticas encapsuladas	20 mg		
Ácido oleico	2 ml		
Carbonato de sodio	5 mg		
Agua destilada	10 ml	-	-

Diseño experimental

1. De la muestra sintetizada y previamente liofilizada, ubicar en el cristal del equipo la cantidad necesaria de muestra que recubra dicho espacio.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2. Configurar los parámetros del software:
 - Rango de lectura en el eje x: 500 – 2000 cm^{-1} .
 - Número de escaneos: 25.
3. Generar 90 N de fuerza en el mago que presiona la muestra.
4. Iniciar la lectura.
5. Almacenar datos

Anexo 6. Protocolo preparación de muestras para Dispersión de Luz Dinámica.

Materiales y Equipos

No.	Equipos	Marca	No.	Materiales	Marca
1	NanoPlus		1	Pipetas Pasteur	
1	Vortex	Vortex	5	Tubos Eppendorf	

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
Nanopartículas magnéticas con diferentes tratamientos	20 mg	-	-
Agua desionizada	10 ml	-	-

Diseño experimental

1. De las muestras sintetizadas y secas, resuspender en agua desionizada.
2. Depositar en tubos eppendorf.
3. Someter a vortex los tubos. Para dispersar las partículas.
4. Adicionar 30 μ l de la solución a la cubeta del equipo.
5. Configurar los parámetros del software:
 - Rango de lectura en el eje x: 500 – 2000 cm^{-1} .
 - Número de escaneos: 20.
6. Iniciar la lectura y almacenar datos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anexo 7. Protocolo preparación de muestras para Difracción de Rayos X.

Materiales y Equipos

No.	Equipos	Marca	No.	Materiales
1	difractómetro de Rayos X (DRX)	XPert PANalytical Empyrean Serie II-Alpha 1, modelo 2012	1	Pipetas Pasteur

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración
Nanopartículas magnéticas con diferentes tratamientos	4 mg	-
Agua desionizada	10 ml	-

Diseño experimental

1. De las muestras sintetizadas y secas tomar 1 gr de cada tratamiento.
2. Colocar 1 gr de las muestras en el lector del equipo de difracción de rayos X.
3. Iniciar la lectura.
4. Almacenar datos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anexo 8. Protocolo evaluación de citotoxicidad: Ensayo MTT

Equipos

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Cámara de flujo laminar	3	Flask de cultivo celular
4	Micropipetas diferentes volúmenes	1	Hemocytometro
3	Platos de cultivo	1	Espectrofotómetro (BIO-RAD X Mark)

Reactivos

Reactivo	Cantidad	Concentración	Marca
MTT	3 ml	5 mg/mL	Sigma M2128
DMSO	3 ml	-	Sigma Aldrich
Medio cultivo células (RPM)	1ml	-	Sigma Aldrich
PBS	50 ml	0.7 M	Sigma Aldrich
Agua destilada estéril	50 ml		
Tripsina	20 ml		Sigma Aldrich

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Diseño experimental

Plato curva de calibración

- X₁: Tratamiento 1: MNPs puras
- X₂: Tratamiento 2: MNPs + A.O
- X₃: Tratamiento 3: MNPs + A.O + Carbonato de sodio encapsuladas en micro-nano-hidrogeles de alginato/quitosano
- CP: Control positivo: Etanol
- CN: Control negativo = células sin tratamiento

1. Sembrar las células en plato de 24 pozos de la siguiente manera:

20k Células	40k Células	60k Células	80k Células	100k Células	120k Células	140k Células	160k Células
20k Células	40k Células	60k Células	80k Células	100k Células	120k Células	140k Células	160k Células
20k Células	40k Células	60k Células	80k Células	100k Células	120k Células	140k Células	160k Células
20k Células	40k Células	60k Células	80k Células	100k Células	120k Células	140k Células	160k Células

2. Incubar a 37°C durante 24 h.
3. Remover el medio.
4. Agregar 100 µl de MTT (5 mg/ml), cubrir el plato en papel aluminio e incubar durante 4h.
5. Descartar sobrenadante y agregar 10 µl de DMSO.
6. Incubar 5 minutos.
7. Realizar lectura en el equipo durante 10 segundos con movimiento orbital y una longitud de onda de 595 nm. Verificar que la absorbancia debe ser máximo 1.5

En los tiempos de incubación realizar el montaje de los siguientes platos:

1. Sembrar las células en plato de 24 pozos de la siguiente manera:

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células
30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células
30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células
30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células	30k Células

2. Agregar medio y tratamiento en otro plato de la siguiente manera:

X1	X1	X1	X1	CP	
X2	X2	X2	X2	CP	
X3	X3	X3	X3	CP	
CN	CN	CN	CN	CP	

3. Incubar ambos platos durante 24 horas.
4. Remover el contenido del plato que contiene medio y tratamientos.
5. Transferir el contenido del plato donde están las células sembradas.
Nota: Tener cuidado de sólo transferir el sobrenadante líquido. No transferir nada precipitado ni sólido, pues induce necrosis (falsos positivos) y puede generar ruido en la lectura espectrofotométrica.
6. Incubar durante 24 h.
7. Remover el medio y agregar 100 µl de MTT.
8. Incubar durante 4h.
9. Remover sobrenadante.
10. Agregar 100 µl DMSO e incubar durante 5 minutos.
11. Realizar lectura en el equipo.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.