

INFORME FINAL

Dra. Rebeca Hernández (ICTP-CSIC)

**Nuevos métodos de preparación de nanogeles
híbridos con aplicaciones en hipertermia
magnética**

FUNDACIÓN DOMINGO MARTINEZ

**DEPARTAMENTO DE POLÍMEROS NANOESTRUCTURADOS Y
BIOMATERIALES**

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

MARZO 2012



OBJETIVOS DEL PROYECTO

El **objetivo principal** de este proyecto es el desarrollo de terapias celulares basadas en hipertermia magnética mediante el empleo de nanogeles funcionalizados en su superficie. Como **aspecto innovador** se propone la utilización de estos sistemas como reactores de nanopartículas magnéticas de forma que se pueda controlar la respuesta magnética de las mismas. Además, este método de síntesis permite obtener sistemas en los que hay interacción entre las nanopartículas y la matriz polimérica y por tanto se evita la difusión de las nanopartículas fuera del gel. Para cumplir este objetivo se tendrán en cuenta diversos criterios:

- (1) tamaño de los nanogeles que es importante para su acumulación en tumores *in vivo*;
- (2) Capacidad de respuesta a diferentes estímulos del nanogel (ej. pH, temperatura)
- (3) Obtención de respuesta superparamagnética de las nanopartículas encapsuladas en el gel de forma que se libere calor cuando el sistema sea expuesto a campos magnéticos oscilantes.
- (4) Biofuncionalización de los nanogeles híbridos para reconocimiento celular.

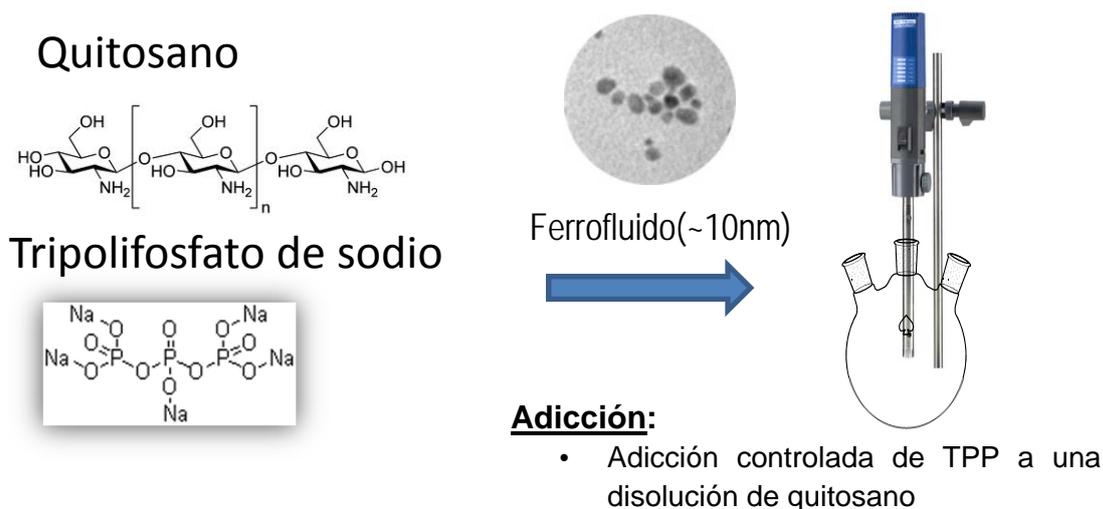
TAREAS Y RESULTADOS

A continuación se desglosan de forma resumida las principales tareas desarrolladas y los resultados obtenidos

TAREA A: Diseño de nanogeles híbridos

Para la obtención de nanogeles magnéticos de quitosano, se ha desarrollado una metodología para encapsular un ferrofluido acuoso comercial con nanopartículas de óxido de hierro de tamaño de 10 nm (NGAP FeO-05#4, Nanogap Sub powders) dentro

de nanogeles de quitosano entrecruzados con sales de tripolifosfato (TPP). El entrecruzamiento físico del CS con el TPP tiene lugar a través de las interacciones iónicas entre la amina protonada y el grupo fosfato. Se varió la cantidad de NPs en el sistema, para lo cual se pesaron 0.25, 0.1 y 0.025 g del ferrofluido y se disolvieron en 5 mL de agua ultrapura (5%, 2% y 0.5% m/v, respectivamente). Las muestras obtenidas se denominaron NP+Fe 0.5 donde el número indica la concentración de nanopartículas de óxido de hierro incorporadas. La dispersión de ferrofluido se añadió de forma controlada a 30 mL de quitosano (suministrado por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional de Costa Rica) al 0.5% m/v, en atmósfera de nitrógeno y se mantuvo el sistema bajo agitación constante a 8600 rpm. Finalizada la adición del ferrofluido se añadieron sales de tripolifosfato (TPP) como agente entrecruzante al 0.5% m/v y posteriormente se dejó el sistema en agitación por 10 min más. La muestra resultante, se centrifugó a 5000 rpm y posteriormente se dializó y liofilizó con el objetivo de eliminar residuos de la reacción de síntesis de los nanogeles. El esquema de formación de estos materiales se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Procedimiento de formación de nanogeles de quitosano

La morfología de los nanogeles de quitosano con nanopartículas de hierro se determinó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (figura 1) donde se pueda observar la formación de partículas esféricas y se puede concluir que las nanopartículas de óxido de hierro se encuentran encapsuladas dentro de la matriz polimérica de quitosano de manera eficiente.

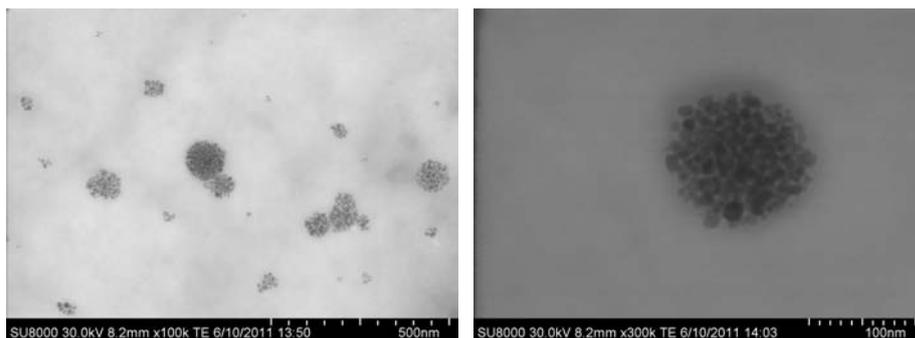


Figura 1. Microscopía TEM realizadas a dos magnificaciones diferentes correspondientes a nanogeles de quitosano con nanopartículas de óxido de hierro incorporadas.

Este método de obtención permite el escalado en la preparación de nanogeles híbridos mediante la utilización de reactores de mayor volumen. Actualmente, estamos explorando esta posibilidad mediante el ensayo de condiciones de preparación en la que se varíe tanto la concentración de los reactivos como el volumen de la dispersión.

Por otro lado, basándonos en la metodología desarrollada en el grupo para la obtención de nanopartículas de óxido de hierro *in situ* en geles de quitosano¹ (figura 2) se han realizado varios experimentos con el objetivo de llevar a cabo la síntesis *in situ* de nanopartículas de óxido de hierro en nanogeles de quitosano entrecruzados con sales de tripolifosfato. Para ello se llevó a cabo la formación de nanogeles de quitosano con TPP

¹ R. Hernández, V. Zamora-Mora, M. Sibaja-Ballesteros, J. Vega-Baudrit, D. López, C. Mijangos. Journal of Colloid and Interface Science, 2009, 339, 53-59

y posteriormente se adicionó una mezcla de cloruros de hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) en agitación constante. Terminado este proceso, se añadió una disolución básica para producir la oxidación de los cloruros de hierro a óxidos de hierro. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno lo cual es determinante para evitar la formación de hidróxido de hierro que no tiene propiedades magnéticas. Se varió tanto el orden de adición de los reactivos como las concentraciones de cloruros de hierro y de entrecruzante (TPP). En todos los casos se obtuvo un ferrofluido de quitosano y es necesario continuar optimizando el método para obtener nanopartículas esféricas de quitosano.

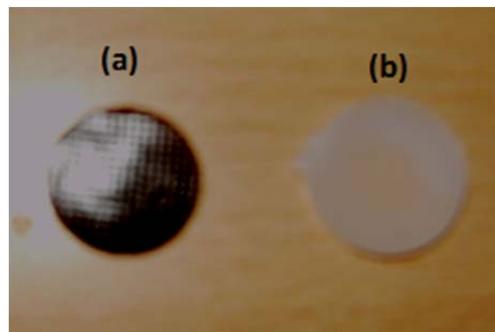


Figura 2. (a) Gel de quitosano con nanopartículas de óxido de hierro incorporadas y (b) gel de quitosano obtenido por precipitación en medio básico

Un tercer método de obtención de nanogeles híbridos de quitosano y que además está implementado a nivel industrial para la obtención de emulsiones coloidales con tamaño de gota homogéneo es la utilización de equipos de tipo microfluidizador. En dichos equipos, se somete a una cizalla muy alta a una determinada dispersión coloidal preformada mediante su paso a través de canales de tamaño nanométrico, de forma que las dispersiones resultantes tienen un tamaño de partícula homogéneo y que se puede variar en función del número de veces que se hagan pasar las nanopartículas a través de los canales del microfluidizador. Con este objetivo, realizamos una prueba en un equipo de tipo microfluidizador M-110PS (Microfluidics) en la facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva. Para dicha prueba se emplearon dispersiones coloidales de nanogeles de poliácido glicólico-láctico (PLGA) obtenidas

por un proceso de emulsión- evaporación (Máster Aurora Pérez Briones). Sin embargo, no se observaron cambios ni en el tamaño medio de las nanopartículas ni en la distribución de tamaños.

Dentro de esta línea, el grupo ha establecido recientemente una colaboración con el grupo de la Prof. Eugenia Kumacheva de la Universidad de Toronto con el objetivo de utilizar la técnica de microfluidos para la preparación de nanogeles poliméricos. Esta técnica está basada en la manipulación de volúmenes muy pequeños de fluidos y permite controlar tanto el tamaño como la distribución de tamaños de los nanogeles obtenidos mediante la reacción de entrecruzamiento del material dentro de canales de tamaño micrométrico en lo que constituye un dispositivo 'lab on a chip'² que permite la obtención en continuo de partículas con distribución de tamaño homogéneo.

En esta línea, D^a Vanessa Zamora-Mora, que forma parte del grupo realizará una estancia de tres meses (agosto-octubre 2012) en el laboratorio de la profesora Eugenia Kumacheva para la preparación de nanogeles de quitosano híbrido monodispersos. Para la realización de esta estancia se cuenta con la metodología desarrollada en el marco de este proyecto para la preparación de nanogeles híbridos de quitosano. Una representación esquemática del método de preparación a través de la técnica de microfluidos se muestra en la figura 3. Cabe destacar que la ayuda concedida por la fundación Domingo Martínez contribuirá a la financiación de la estancia en este mismo laboratorio de otra estudiante de doctorado implicada en el proyecto, D^a Aurora Pérez que desarrolla su proyecto en la preparación de nanogeles monodispersos de poliácido glicólico-láctico (PLGA) con nanopartículas de óxido de hierro incorporadas.

² A. Kumachev, J. Greener, E. Tumarkin, E. Eiser, P.W.Zandstra, E. Kumacheva. Biomaterials 32 (2011) 1477-1483

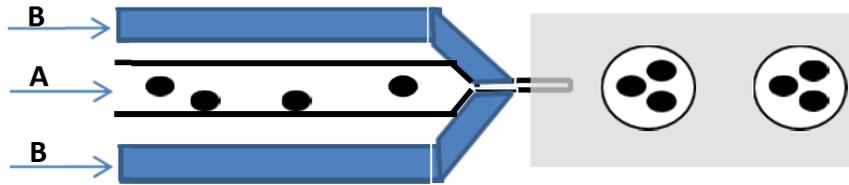


Figura 3. (a) Representación esquemática de la preparación de nanogeles de quitosano híbridos a través de la técnica de microfluidos: A Disolución que contiene nanopartículas y quitosano. B Disolución que contiene sales de tripolifosfato, TPP como entrecruzante.

TAREA B. Estudio de la respuesta a diversos estímulos de las partículas de nanogel y del comportamiento viscoelástico de los materiales híbridos.

El tamaño de los nanogeles de quitosano con y sin nanopartículas magnéticas, se determinó por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano-S, Malvern. Las muestras de nanogeles se midieron después del proceso de centrifugación, tras el cual las muestras se filtraron a través de un papel de filtro micropore de 800 nm y se añadió a 1 mL de ácido acético previamente filtrado. Para el estudio de la variación del tamaño de los nanogeles en función del pH, se dispersaron los nanogeles liofilizados en buffer de fosfatos a pH 6.8 y 7.4. Se mantuvieron las muestras en agitación por 30 minutos y posteriormente se midió el tamaño de los nanogeles por DLS. En la tabla 1, se resume el tamaño obtenido para los nanogeles de quitosano con diferente concentración en nanopartículas así como el correspondiente a la muestra con un contenido en nanopartículas de 2% (NP+Fe2%) medida a diferentes pH

Como se puede observar, la incorporación de nanopartículas a los nanogeles de quitosano da lugar a un aumento del tamaño de los nanogeles y además se observa una variación del tamaño de los nanogeles en función de la cantidad de ferrofluido

incorporada. Los estudios de la respuesta al pH de la muestra con un 2% de nanopartículas de óxido de hierro han puesto de manifiesto un aumento considerable del tamaño de partícula a pH fisiológico, esto podría deberse a la precipitación del quitosano a pH por encima de 6.8 que daría lugar a la formación de aglomerados.

Tabla 1. Tamaño de los nanogeles sintetizados obtenido por DLS.

Muestra	Tamaño (nm)
NP+Fe 0%	140 ± 7
NP+Fe 0.5%	192 ± 3
NP+Fe 2%	205 ± 3
pH=6.8	158±33
pH=7.2	772±142
NP+Fe 5%	259 ± 1

Determinación de las propiedades viscoelásticas de los nanogeles magneto-poliméricos mediante reometría de control de esfuerzo.

Actualmente, la terapia de hipertemia magnética se realiza mediante inyección de ferrofluidos en el área a tratar³. Para que un sistema coloidal sea inyectable es necesario que la viscosidad de las dispersiones sea lo suficientemente baja como facilitar la inyección o que la viscosidad disminuya como consecuencia de la aplicación de una deformación, es decir que el material presente un comportamiento self-thinning. Por tanto, el conocimiento de las propiedades reológicas de las dispersiones coloidales es de vital importancia para determinar sus aplicaciones como materiales inyectables. El estudio reológico de los nanogeles híbridos de quitosano se llevó a cabo en un reómetro AR-G2 TA Instruments siguiendo la metodología desarrollada en nuestro grupo recientemente publicada⁴. La geometría que se empleó fue la de platos paralelos de 60

³ Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Journal of Neurooncology, 2011, 103(2), pp317-24

⁴ C. Echevarría, C. Mijangos. Langmuir, 2011, 27 (13), pp 8027-8035

mm. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos (1) Barridos de deformación de (0.001-1000%) a una frecuencia constante y no destructiva, de 0.5 Hz a 25 °C. (2) Barridos de frecuencia (10-0.01 Hz) a una deformación constante dentro del rango de viscoelasticidad lineal del 0.5%.

Como resultados representativos, en la figura 4, se presenta la variación del módulo elástico y el módulo viscoso con la deformación de nanogeles de quitosano entrecruzados con TPP a distintas concentraciones de la dispersión (0.5, 1, 2, 2.5 % m/v).

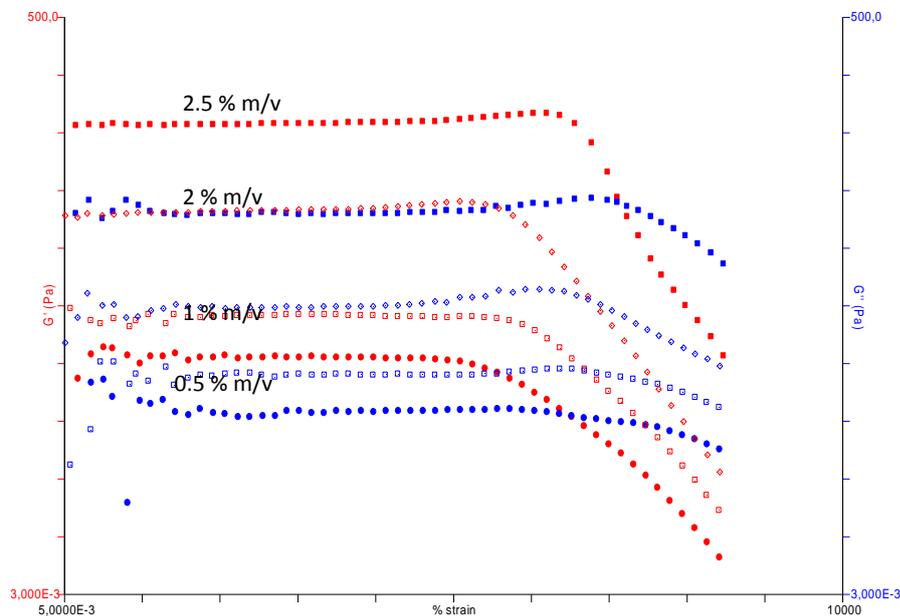


Figura 4. Variación del módulo elástico (G') (trazos rojos) y del módulo viscoso (G'') (trazos azules) en función de la deformación para dispersiones de nanogeles de quitosano en agua a diferentes concentraciones a 0.5, 1, 2 y 2.5% m/v.

Estos experimentos permiten determinar el rango de viscoelasticidad lineal, es decir, el rango en el cual el módulo elástico y viscoso son independientes de la deformación. En el rango de viscoelasticidad lineal, G' es mayor que G'' lo cual es una característica del estado gel e indica un comportamiento predominantemente elástico del material. El punto en el cual el módulo elástico G' disminuye con el incremento de la deformación

se conoce como deformación crítica y es donde se produce la ruptura de la estructura del gel por la deformación aplicada. Como se puede observar en la figura 4, la deformación crítica aumenta al aumentar la concentración de las dispersiones y en todos los casos las dispersiones presentan un comportamiento de self-thinning con la deformación aplicada lo que indica su aplicabilidad como materiales inyectables.

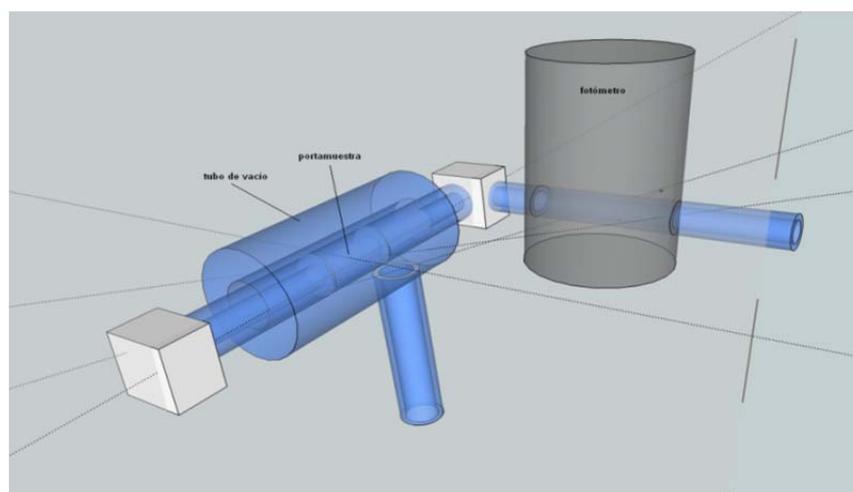
Los resultados correspondientes al estudio reológico realizado en muestras de nanogeles híbridos de quitosano se encuentran detallados en un artículo que se remitirá a la fundación una vez publicado y en el que consta de forma expresa el agradecimiento a la FDM.

TAREA C. Estudio de la respuesta magnética y del calentamiento de las nanopartículas a través de la aplicación de campos magnéticos alternantes para determinar sus aplicaciones en hipertermia magnética.

Este apartado se realiza en colaboración con los profesores G. Goya y R. Ibarra del Instituto de Nanotecnología de Aragón, y el objetivo es determinar si los nanogeles de quitosano con NPs incorporadas podrían ser sistemas útiles en terapias mediante tratamiento de hipertermia. El estudio consiste en determinar la capacidad que poseen los nanogeles híbridos para ser estimulados externamente mediante la aplicación un campo magnético alterno y cuantificar el calentamiento provocado. Este montaje está constituido por una fuente comercial (EASYHEAT AMBRELL) que genera una corriente de 390A a una frecuencia constante de 360KHz. La muestra se introduce en el espacio adiabático preparado para medir en fase líquida, cuyo volumen es de 1,5ml aproximadamente. Los datos de la temperatura se recogen mediante una sonda de fibra óptica (Reflex, Neoptix) (cable amarillo) inmune a las radio-frecuencias del ambiente.

Desarrollo de un dispositivo ad hoc que permite medir simultáneamente liberación controlada e hipertermia magnética

De forma paralela hemos comenzado a colaborar en el desarrollo de un dispositivo que permita medir simultáneamente la liberación controlada por efecto de un campo magnético e hipertermia magnética y que constituye el trabajo de tesis de D^o Ignacio Bruvera (Instituto de Nanotecnología de Aragón). Una representación esquemática del dispositivo desarrollado se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Representación esquemática del dispositivo diseñado para la medida simultánea de la liberación controlada y la hipertermia magnética en nanogeles híbridos de quitosano.

Este dispositivo permite aplicar un campo magnético dentro de una celda de medida de forma que el calentamiento producido por el gel de lugar a su contracción y liberación de un fármaco modelo (en este caso, vitamina B12). La cantidad liberada puede determinarse cuantitativamente por lectura a través de una lámpara UV-vis. Los resultados obtenidos hasta el momento sobre geles interpenetrados de alginato-poli (N-isopropilacrilamida) con nanopartículas magnéticas sintetizadas *in situ*⁵ han permitido

⁵ R. Hernandez y C. Mijangos. Macromol. Rapid Commun. 2009, 30, 176–181

determinar que este dispositivo es válido para este tipo de medidas simultáneas y permiten anticipar una aplicación a nivel industrial para este tipo de dispositivos.

TAREA D. Funcionalización de los nanogeles para reconocimiento celular.

La hipertermia magnética consiste en el calentamiento localizado de una región tumoral debido al calentamiento de nanopartículas magnéticas por acción de un campo magnético alterno. Sin embargo, y para que este calentamiento sea selectivo, es necesario que las nanopartículas sean internalizadas dentro del espacio intracelular de forma que una vez que se produzca el calentamiento, éste no afecte a las células sanas. Con el objetivo de determinar si los nanogeles híbridos de quitosano obtenidos en el grupo son internalizados dentro de células, hemos realizado los primeros ensayos en células Hela procedentes de un adenocarcinoma de útero humano en colaboración con el Instituto IMDEA Nano utilizando el ferrofluido comercial (NGAP FeO-05#4, Nanogap Sub powders) empleado en la preparación de nanogeles híbridos de quitosano.

Para ello se prepararon disoluciones del ferrofluido comercial en el medio de cultivo de las células. Previa incubación, las disoluciones fueron esterilizadas mediante filtración (filtros milipore 0.22 μm). Posteriormente se incubaron las células durante 24h con la disolución esterilizada. Trás ese tiempo, se lavaron y unas células se fijaron y tiñeron inmediatamente con Azul de Prusia (para teñir el Fe de las nanopartículas). Otras células se dejaron otras 24 horas en el incubador para estudiar la morfología de las células. Mediante estos experimentos, se ha podido determinar que tras 24 h de post-incubación, las células han internalizado las nanopartículas observándose puntos azules correspondientes a las nanopartículas dentro de las células. Además, trás 24 h de post-incubación no se observó ninguna variación de la morfología de las células que indicara muerte celular por lo que se puede concluir que las células son capaces de internalizar

las nanopartículas y que además éstas no son tóxicas para las células. Actualmente llevamos a cabo experimentos utilizando nanogeles de quitosano híbridos para determinar la respuesta celular. En función del resultado obtenido, abordaremos la funcionalización de los nanogeles híbridos de quitosano para hacerlos selectivos a las células tumorales.

Otras tareas desarrolladas en el grupo en relación con el proyecto financiado por la FDM.

Como continuación en el estudio de la relación estructura-propiedades en geles poliméricos con nanopartículas magnéticas para aplicaciones en hipertemia magnética que el grupo lleva realizando desde hace varios años^{6,7}, hemos abordado recientemente el estudio de la dinámica de estos materiales a través de espectroscopía de correlación de rayos X (XPCS). Para ello, se nos ha concedido una propuesta para el acceso a la línea P10 del sincrotrón de Hamburgo, Hasylab. Mediante esta técnica hemos podido determinar el tipo de dinámica presente en estos materiales y que no había sido reportado hasta el momento. La ayuda de la FDM ha contribuido a la adquisición de material específico para llevar a cabo este experimento y a financiar los gastos de estancia derivados de la estancia en el sincrotrón de Hamburgo. Los resultados de esta investigación constituyen el tema de una publicación que será remitida a la fundación una vez publicada y que incluye un agradecimiento expreso a la financiación obtenida de la fundación.

⁶ R. Hernández, J. Sacristán, L. Asín, T.E.Torres, M. R.Ibarra, G.F.Goya and C. Mijangos, *The Journal of Physical Chemistry B* **2010** 114, 12002-12007.

⁷ R. Hernandez, J. Sacristan, A. Nogales, M. Fernandez, T. A. Ezquerra and C. Mijangos, *Soft Matter* **2010**, 6, 3910-3917.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROYECTO

La realización del proyecto ha sido posible gracias a la participación activa del equipo investigador que constituye el actual grupo de polímeros nanoestructurados y geles del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC). Parte de los resultados presentados en esta memoria forman parte de la tesis de D^a Vanessa Zamora-Mora (JAE-Pre) 'Nanogeles de quitosano para aplicaciones en hipertermia' cuya defensa se espera en el año 2013. De acuerdo con los objetivos propuestos se han alcanzado resultados muy positivos que se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha desarrollado una metodología para la preparación de nanogeles híbridos con aplicación en hipertermia magnética con tamaños en el rango de 200 nm y con una gran eficiencia de encapsulación de nanopartículas de óxido de hierro que permite su escalado a nivel industrial. Mediante la medida de disipación de calor en presencia de campos magnéticos alternos, se ha probado su potencialidad en aplicaciones en hipertermia magnética. La contribución de la Fundación ha supuesto una gran aportación a la adquisición de equipamiento específico necesario para mantener un alto nivel en los resultados obtenidos.

- El apoyo recibido por la Fundación Domingo Martínez ha permitido reforzar la colaboración con el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) que se ha materializado en el comienzo de una tesis doctoral dirigida al desarrollo de un dispositivo para medir simultáneamente liberación controlada e hipertermia magnética de gran interés para el desarrollo de dispositivos a nivel industrial garantizando con ello la actividad cooperativa en los próximos años.

- Asimismo ha permitido contribuir a la financiación de estancias de investigadores pertenecientes a nuestro grupo en el extranjero (Aurora Pérez, U. Toronto, Canadá).

Dicha estancia unida a la estancia que realizará D^a Vanessa Zamora en la misma universidad facilitará el montaje de un laboratorio de microfluidos en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros para la preparación de nanogeles poliméricos de tamaño controlado.

- Se ha realizado una considerable labor de comunicación y proyección social a través de la participación en jornadas de puertas abiertas, difusión en blogs especializados y seminarios.

-Respecto a las contribuciones y publicaciones que ha desarrollado el grupo en relación con el proyecto financiado por la Fundación Domingo Martínez cabe destacar los siguientes aspectos:

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

-Preparation and rheological characterization of hybrid chitosan nanogels Vanessa Zamora-Mora y col *Biomacromolecules*. Fecha de envío Mayo

-Slow dynamics of nanocomposite polymer aerogels as determined through X-ray photocorrelation spectroscopy (XPCS) Rebeca Hernández y col *Physical Review Letters*. Fecha de envío Abril

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

AUTORES: Rebeca Hernández

TÍTULO: ` Polymer gels with magnetic nanoparticles. Applications in magnetic hyperthermia' **CONFERENCIA INVITADA**

CONGRESO: 9th International IUPAC Conference on *Polymer-Solvent Complexes and Intercalates*, 11-14 Septiembre 2011, Kiev, Ucrania.

AUTORES: Rebeca Hernández y col

TÍTULO: ` New developments on hybrid colloidal materials for applications in magnetic hyperthermia' **PARTICIPACIÓN ORAL**

CONGRESO: EPF 2011, XII GEP CONGRESS, 26 Junio-1 Julio, 2011, Granada

PERSPECTIVAS FUTURAS

De cara al desarrollo de aplicaciones en hipertermia magnética de los nanogeles de quitosano híbridos, es necesario funcionalizar de forma adecuada la superficie de forma que los materiales puedan ser internalizados dentro de las células tumorales de forma selectiva. En este aspecto y tal y como hemos comentado en la memoria mantenemos colaboraciones con el Instituto Imdea Nano y con el Instituto de Nanociencia de Aragón para el estudio de la internalización de nanogeles de quitosano dentro de células.

Una vez que hemos desarrollado una metodología nueva para la preparación de nanogeles híbridos de quitosano con nanopartículas magnéticas, nuestros esfuerzos de investigación irán dirigidos a la utilización de la técnica de microfluidos para la preparación de estos sistemas con el objetivo de controlar tanto el tamaño como la distribución de tamaños en estos materiales.

Otro de los aspectos fundamentales en la implementación de estos materiales a nivel industrial para las aplicaciones propuestas es el diseño de dispositivos que permitan la monitorización simultánea de liberación y efecto hipertérmico por aplicación de un campo magnético. En este contexto, el siguiente paso es la implementación de este dispositivo para la medida de la liberación controlada por campos magnéticos en nanogeles híbridos basándonos en los resultados preliminares obtenidos con macrogeles y descritos en la memoria.