

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

Nanopartículas metalo-orgánicas: síntesis, caracterización y aplicación a la vehiculización de Paclitaxel, 5-Fluorouracilo y Doxorubicina

Memoria presentada por **D^a Ana Isabel Moscoso Reina** para optar al grado de Doctora en Ingeniería Química por la Universidad de Málaga.

Programa de Doctorado en Química y Tecnologías Químicas. Materiales y Nanotecnología.

Málaga, Marzo 2019

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Ana Isabel Moscoso Reina

 <http://orcid.org/0000-0003-4192-259X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización

pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



El doctorando, **Ana Isabel Moscoso Reina** y los directores de tesis, **Juan Manuel López Romero** y **Rafael Contreras Cáceres**, garantizamos al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de Tesis respetándose, además, los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Málaga a 15 de Febrero de 2019

Directores de Tesis

Doctorando

Fdo.: **J. Manuel López Romero**

Fdo.: **Ana I. Moscoso Reina**

Fdo.: **Rafael Contreras Cáceres**

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. JUAN MANUEL LÓPEZ ROMERO, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y D. RAFAEL CONTRERAS CÁCERES, PROFESOR DOCTOR CONTRATADO

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta, titulada “NANOPARTÍCULAS METALO-ORGÁNICAS: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN A LA VEHICULIZACIÓN DE PACLITAXEL, 5-FLUOROURACILO Y DOXORRUBICINA”, que para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química presenta **D^a. Ana Isabel Moscoso Reina**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga.

Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 15 de Febrero de 2019.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Fdo.: **J. Manuel López Romero**

Fdo.: **Rafael Contreras Cáceres**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi hijo **Martín**,

Nace un hijo, nace una madre. El mayor aprendizaje en la vida, la maternidad.

“Tomar la decisión de tener un hijo es trascendental, significa decidir que desde ese momento tu corazón empezará a caminar también fuera de tu cuerpo”

(Elisabeth Stone)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Elaborar una Tesis Doctoral supone un mérito a nivel personal debido al grado de compromiso, responsabilidad y esfuerzo que se requiere para llevar a cabo dicha labor de investigación. Sin embargo, este trabajo no es un resultado individual sino el conjunto del compromiso, la implicación y la colaboración de otros investigadores que han hecho posible, gracias a sus aportaciones, realizar este documento. Por ello, este apartado supone el agradecimiento a todas las personas que han colaborado en esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera expresar mi especial agradecimiento al Dr. Juan Manuel López Romero como tutor y director de esta Tesis y por ser mi referente como profesor. Trabajar con él ha supuesto, desde el inicio, un cambio en mi carrera profesional y en mi vida personal. Un punto de inflexión para comenzar una etapa dedicada a la labor docente y a la investigación. Por ello, agradezco la confianza depositada en mí desde el primer día para formar parte de su grupo, así como su inestimable ayuda y su apoyo incondicional.

En segundo lugar, agradecer al Dr. Rafael Contreras Cáceres como director de esta Tesis, su dedicación y su ayuda siempre que la he necesitado, así como las aportaciones realizadas para guiarme en este trabajo.

Además, y como he comentado al inicio, este documento recoge el trabajo y el esfuerzo de investigadores cuyas aportaciones han sido especialmente valiosas, de ahí mi sincero agradecimiento,

Al Departamento de Química Orgánica y en especial a su director el Dr. Francisco Sarabia García por permitirme realizar la Tesis Doctoral en dicho departamento.

Al Dr. Diego Romero del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga por el suministro de la línea celular de Escherichia coli DH5- α para el estudio de la actividad antimicrobiana de las membranas modificadas.

A la Dra. Juana Benavente del Departamento de Física Aplicada I de la Universidad de Málaga, por el suministro de las membranas RC/6 y la medida de los potenciales de membrana.

Al Dr. Ignacio Fernández de la Universidad de Almería por los análisis de Resonancia Magnética Nuclear realizados.

Al Dr. Pablo Guardia del Departamento de Física Fundamental e Instituto de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad de Barcelona, por las muestras de nanopartículas de magnetita para la preparación de sistemas poliméricos con núcleo magnético.

Al grupo de investigadores del Dr. José Prados de la Universidad de Granada por la aplicación directa de las muestras en el estudio de la citotoxicidad y de la actividad de las mismas.

Además quiero agradecer a mis compañeras de departamento Ana, Cristina y María todos esos ratitos juntas, esos momentos únicos de compartir vivencias, risas y el día a día de nuestro trabajo. Y a Carlos, mi compañero de laboratorio, por toda su ayuda y nuestras interesantes charlas. A ellos les deseo lo mejor en sus carreras profesionales.

Por último, y no por ello menos importante, a mi familia la que me ha apoyado siempre y de forma incondicional en todos mis proyectos. A ellos que me han aconsejado, animado y escuchado en todo momento y a quienes les debo todo lo que soy a día de hoy, gracias.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
RESUMEN.....	31
1. INTRODUCCIÓN.....	37
1.1. Nanopartículas en medicina	37
1.2. Tipos de nanopartículas	40
1.3. Funcionalización de nanopartículas	48
1.4. Fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer:	
Paclitaxel, 5-Fluorouracilo y Doxorubicina	52
1.4.1. Paclitaxel	52
1.4.2. 5-Fluorouracilo.....	54
1.4.3. Doxorubicina	57
2. OBJETIVOS	63
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	67
3.1. Técnicas de caracterización	67
3.1.1 Análisis por HPLC.....	67
3.1.2 Análisis de la liberación de activos	68
3.1.3 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	68
3.1.4 Microscopía electrónica de transmisión y barrido (TEM / SEM) y dispersión de Rayos X de ángulo pequeño (SAXS).....	69
3.1.5 Microscopía μ Raman / SERS	70
3.1.6 Dispersión dinámica de luz (DLS) y Potencial Zeta.....	70

3.1.7	Difracción de Rayos X (XRD)	71
3.1.8	Propiedades elásticas de las membranas	71
3.1.9	Medida del potencial de membrana.....	71
3.2.	Nanopartículas poliméricas de 4-vinilpiridina (p4VP)	73
3.2.1.	Materiales	73
3.2.2.	Preparación de nanopartículas de oro (Au@NPs).....	74
3.2.3.	Preparación de nanopartículas recubiertas de p4VP (p4VP@Au)	76
3.2.4.	Oxidación del núcleo metálico. Obtención de nanopartículas huecas (p4VP@HU)	77
3.2.5.	Preparación de nanopartículas macizas de p4VP (p4VP@MZ)	78
3.2.6.	Encapsulación de fármacos en nanopartículas de p4VP.....	79
3.3.	Nanopartículas poliméricas de N-isopropilacrilamida (pNIPAM)	82
3.3.1.	Materiales	82
3.3.2.	Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM (pNIPAM@MZ)	82
3.3.3.	Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM funcionalizado con ácido 3-butenoico (pNIPAM@MZ-3BA)	84
3.3.4.	Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM funcionalizado con ácido fólico (pNIPAM@MZ-3BA-FOL).....	84
3.3.5.	Encapsulación de fármacos en nanopartículas de pNIPAM.....	85
3.4.	Nanopartículas con núcleo de magnetita (Fe₃O₄)	87
3.4.1.	Materiales	87

3.4.2.	Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de microgel: p4VP@Fe ₃ O ₄ y pNIPAM@Fe ₃ O ₄	87
3.4.3.	Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de pNIPAM funcionalizado con ácido 3-butenoico (pNIPAM@Fe ₃ O ₄ -3BA).....	89
3.4.4.	Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de pNIPAM funcionalizado con ácido fólico (pNIPAM@Fe ₃ O ₄ -3BA-FOL)	89
3.4.5.	Encapsulación de 5-Fluorouracilo en nanopartículas poliméricas con núcleo de magnetita.....	90
3.5.	Nanopartículas de plata (Ag@NPs). Inclusión en membranas y actividad antimicrobiana.....	92
3.5.1.	Materiales.....	92
3.5.2.	Preparación de nanopartículas de plata, inclusión en la membrana RC/6 y análisis de su resistencia a la oxidación.....	93
3.5.3.	Ensayo de la actividad antimicrobiana.....	94
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
4.1.	Nanopartículas de p4VP.....	97
4.1.1.	Antecedentes.....	97
4.1.2.	Resultados obtenidos en la preparación de p4VP@Au.....	102
4.1.2.1.	Influencia del pH, de la concentración de monómero y de agente entrecruzante en las propiedades de los sistemas p4VP@Au	104
4.1.3.	Nanopartículas de p4VP huecas (p4VP@HU)	126
4.1.4.	Nanopartículas de p4VP macizas (p4VP@MZ).....	128

4.1.5.	Encapsulación y actividad de Paclitaxel en nanopartículas de p4VP huecas (p4VP@HU) y macizas (p4VP@MZ).....	131
4.1.6.	Encapsulación y actividad de Doxorubicina en nanopartículas corteza@núcleo de p4VP (p4VP@Au).....	139
4.2.	Nanopartículas macizas de pNIPAM.....	146
4.2.1.	Antecedentes.....	146
4.2.2.	Síntesis y caracterización de pNIPAM@MZ.....	147
4.2.3.	Funcionalización de pNIPAM@MZ con ácido 3-butenoico.....	149
4.2.4.	Funcionalización de pNIPAM@MZ-3BA con ácido fólico.....	154
4.2.5.	Encapsulación y actividad de sistemas pNIPAM con 5FU.....	160
4.3	Nanopartículas con núcleo magnético: p4VP@Fe₃O₄ y pNIPAM@Fe₃O₄.....	168
4.3.1.	Antecedentes.....	168
4.3.2.	Síntesis y caracterización de sistemas p4VP@Fe ₃ O ₄ y pNIPAM@Fe ₃ O ₄	171
4.3.2.1.	Sistemas p4VP@Fe ₃ O ₄	172
4.3.2.2.	Sistemas pNIPAM@Fe ₃ O ₄	174
4.3.3.	Encapsulación de fármacos: 5-Fluorouracilo.....	176
4.4.	Nanopartículas de plata (Ag@NPs) sobre membranas de celulosa.....	179
4.4.1.	Antecedentes.....	180
4.4.2.	Preparación y caracterización de Ag@NPs.....	182
4.4.3.	Preparación y caracterización del sistema RC/6-Ag@NPs.....	183
4.4.4.	Ensayo de la actividad antimicrobiana.....	191

5.	CONCLUSIONES.....	197
6.	BIBLIOGRAFIA.....	203





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS

A

AA	Ácido ascórbico
A549	Línea celular humana de cáncer de pulmón

B

BA	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida
----	-----------------------------------

C

CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
------	------------------------------------

D

D _h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DOX	Doxorrubicina
dUMP	Desoxiuridilato
dTMP	Timidilato

E

EDBE	2,2'-(etilendioxi) bis(etilamina)
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida

EPR Efecto de permeabilidad y retención aumentada

F

FOL Ácido Fólico

H

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

HT29 Línea celular humana de cáncer de colon

L

L132 Línea celular humana de cáncer de pulmón

M

MCF7 Línea celular humana de cáncer de mama

MCF10A Células epiteliales de mama

N

NCI Instituto Nacional de Cáncer

NHS *N*-hidroxisuccinimida

NIPAM *N*-isopropilacrilamida

NP Nanopartícula

NPs Nanopartículas

Au@NPs	Nanopartículas de oro
Ag@NPs	Nanopartículas de plata
Fe ₃ O ₄ @NPs	Nanopartículas de núcleo magnético
p4VP@Au	Nanopartículas híbridas de oro y poli(4-vinilpiridina)
p4VP@HU	Nanopartículas huecas de poli(4-vinilpiridina)
p4VP@MZ	Nanopartículas macizas de poli(4-vinilpiridina)
p4VP@Fe ₃ O ₄	Nanopartículas de poli(4-vinilpiridina) con núcleo de magnetita
pNIPAM@MZ	Nanopartículas macizas de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
pNIPAM@MZ-3BA	Nanopartículas macizas de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) funcionalizado con ácido 3-butenoico
pNIPAM@MZ-3BA-FOL	Nanopartículas macizas de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) funcionalizado con ácido fólico
pNIPAM@Fe ₃ O ₄	Nanopartículas de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) con núcleo de magnetita

pNIPAM@Fe₃O₄-3BA Nanopartículas de poli(*N*-isopropilacrilamida) con núcleo de magnetita funcionalizadas con ácido 3-butenoico

pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL Nanopartículas de poli(*N*-isopropilacrilamida) con núcleo de magnetita funcionalizadas con ácido fólico

P

PCL Poli-ε-caprolactona

PEG Polietilenglicol

PLA Ácido poliláctico

PLGA Ácido poli (láctico-co-glicólico)

PMA Polimetacrilato

pNIPAM Poli(*N*-isopropilacrilamida)

PTX Paclitaxel

p4VP Poli(4-vinilpiridina)

R

RC/6 Membrana de celulosa regenerada

RC/6-Ag@NPs Membrana de celulosa regenerada modificada por inclusión de Ag@NPs

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RTI Research Triangle Institute

S

SAXS Dispersión de Rayos X de ángulo pequeño

SEM Microscopía electrónica de barrido

SERS Espectroscopía Raman de superficie mejorada

T

TEM Microscopía electrónica de transmisión

T84 Línea celular humana de cáncer de colon

U

UV-Vis Espectroscopía ultravioleta visible

V

V50 Dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)

X

XRD Difracción de Rayos X

3

3BA Ácido 3-butenoico

4

4VP

4-vinilpiridina

5

5-FdUMP

Monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina

5FU

5-Fluorouracilo



RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

En las últimas décadas la síntesis y optimización de sistemas de nanopartículas (partículas que se encuentran en el rango de los nanómetros, $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$) en medicina muestra un interés especial debido a las características únicas que presentan: i) son sensibles a estímulos externos, como son el pH, la temperatura, la luz, la naturaleza del disolvente, la concentración de iones o el campo magnético; y ii) la alta relación superficie-volumen que presentan permite el transporte efectivo de algunos compuestos en su interior. Estas características se aprovechan para vehicular fármacos, mejorando las propiedades del mismo.

Paclitaxel (PTX) es uno de los fármacos más efectivos contra el cáncer de pulmón y de mama.¹ Actúa bloqueando la β -tubulina induciendo apoptosis en las células tumorales. Sin embargo, presenta muy baja solubilidad en disolventes acuosos, baja especificidad y elevada toxicidad, lo que limita su aplicabilidad.² Para su uso se presenta disuelto en disolventes orgánicos (Cremofor EL) o vehiculado en nanoformulaciones, como es la de nanopartículas de albúmina (Abraxano). Estas formulaciones provocan efectos secundarios no deseados como hipersensibilidad, neuropatía periférica o anafilaxis, debiendo en un alto porcentaje de casos la necesidad de interrumpir el tratamiento. Por todo lo anterior, se desarrolla nuevas formulaciones alternativas que permitan la continuación de los tratamientos.³

El transporte de fármacos encapsulados en sistemas coloidales y en polímeros solubles es una manera de mejorar su biodisponibilidad. Sistemas como nano- y micropartículas poliméricas huecas, preparadas a partir de núcleos de oro o de sílice, y utilizando polímeros derivados de *N*-isopropilacrilamida, de ácido

acrílico, de 4-vinilpiridina, de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), de policaprolactona, etc, se han empleado para la encapsulación de fármacos como Doxorubicina y Paclitaxel.⁴ En particular, los sistemas huecos derivados de 4-vinilpiridina permiten obtener una elevada eficiencia de encapsulación, a costa de un bajo porcentaje de fármaco en la muestra (alrededor de 0.5 mg de PTX en 3 mL de emulsión), siendo además el proceso de preparación complejo, ya que es necesaria la preparación de núcleos de oro, recubrimiento de polímero y, finalmente, es necesaria la eliminación del núcleo metálico por oxidación.⁵

En esta Tesis Doctoral se pretende avanzar en este tipo de formulaciones, utilizando otros polímeros que permitan alcanzar mayores cantidades de compuesto activo en las muestras, controlar de forma efectiva su liberación y simplificar el proceso de preparación, centrándonos en nanopartículas macizas. Asimismo, se plantea el estudio de la citotoxicidad de las muestras en colaboración con la Universidad de Granada (Grupo del Profesor J.C. Prados). Por otra parte, otro agente activo de interés en el tratamiento de estos tipos de cáncer, es 5-Fluorouracilo (5FU). Durante los últimos 60 años, ha sido el agente quimioterapéutico más usado. Este fármaco presenta mayor eficacia para las células tumorales, ya que dichas células se están continuamente dividiendo y captan mayor cantidad de este análogo de uracilo que las células no tumorales, cuya división es mucho más pausada.⁶ Por ello, en esta Tesis Doctoral también se pretende la preparación de nanopartículas poliméricas que contengan este compuesto activo.

Es importante mencionar que, las aplicaciones de los sistemas de nanopartículas se extienden a otras muy diversas áreas, incluyendo la industria

textil, el sector alimentario, la agricultura y los sistemas de purificación de agua. Es en este último sector en el que se estudia la inclusión de sistemas de nanopartículas metálicas de plata (Ag@NPs) para la modificación de membranas celulósicas de alto grado de absorción de agua, con el fin de mejorar el rendimiento de las mismas, sus propiedades químicas y mecánicas, así como su estabilidad.⁷ Aprovechando la experiencia en la preparación de nanopartículas, se incluye en esta Tesis un análisis de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de membranas de celulosa asociados a la presencia en su estructura de estos sistemas metálicos. En particular se analiza la resistencia a la oxidación y el transporte difusivo a través de la membrana.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



1. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 NANOPARTÍCULAS EN MEDICINA.

La nanotecnología puede definirse como la ciencia e ingeniería implicada en el diseño, la síntesis, la caracterización y la aplicación de materiales y dispositivos a escala nanométrica.⁸ Es una ciencia emergente que mezcla distintas áreas de la ciencia como ingeniería, química, física, biología y medicina. Sus beneficios han sido probados en diversos campos como la descontaminación de aguas, las tecnologías de la comunicación e información, el desarrollo de nuevos materiales, la agricultura, la energía y las ciencias de la salud. En este último campo, la nanotecnología está adquiriendo vital importancia en la detección, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades mediante el uso de productos derivados de la investigación nanotecnológica.⁹ En este contexto las nanopartículas (NPs) presentan una gran utilidad en la liberación de fármacos, en las técnicas de imagen y, debido a su pequeño tamaño, para la superación de barreras biológicas. De forma general, están formadas por diferentes materiales y presentan una alta relación superficie/volumen. A nivel biológico son capaces de interactuar a escala subcelular, pudiendo ejercer su actividad en tejidos o células específicas.¹⁰

En la última década, el auge de la nanotecnología ha permitido que el uso de diversos tipos de NPs para el tratamiento de tumores esté siendo ampliamente estudiado. De forma mayoritaria los estudios van dirigidos al transporte de fármacos, aunque también se está estudiando su aplicación para el tratamiento del cáncer en otras estrategias terapéuticas, como son la terapia génica o la hipertermia.¹¹

Hay que tener en cuenta que los fármacos antitumorales presentan una serie de limitaciones que reducen su eficacia y producen toxicidad inespecífica que afecta a tejidos sanos del paciente. El principal objetivo de su incorporación a las NPs se basa en producir una acumulación del fármaco en el tejido tumoral, evitando su diseminación por el resto del organismo,¹² no obstante, el uso de NPs como transportadores de fármacos antitumorales presenta otras ventajas:

- ✓ Proporcionan protección al fármaco frente a la metabolización y excreción, ya que retrasa la acción que sobre el fármaco ejercen los mecanismos de detoxificación del paciente, lo que aumenta su tiempo de circulación y su biodisponibilidad, características ventajosas en el tratamiento antitumoral.
- ✓ Aumentan la acumulación de los fármacos en el tejido tumoral gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) o a mecanismos de direccionamiento activo mediante la funcionalización de las NPs con moléculas que son específicamente reconocidas por las células tumorales.¹³

En cuanto al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), éste se basa en las características diferenciadoras del entorno tumoral, donde el tejido vascular se encuentra alterado.¹⁴ Este efecto se ha atribuido a la elevada proliferación de vasos sanguíneos en el interior del tumor. Así, cuando la masa tumoral alcanza un tamaño de 2-3 mm comienza la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. La neovasculatura resultante difiere ampliamente de la de un tejido sano, los vasos sanguíneos son irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, lo que facilita una mayor permeabilidad a los componentes del plasma

sanguíneo.¹⁴ Esto explica la mayor acumulación de NPs en la masa tumoral, en comparación con un tejido sano.

- ✓ La capacidad de transportar moléculas poco hidrosolubles. Esto es posible gracias a las propiedades físico-químicas de algunas NPs que son capaces de solubilizar estos compuestos a altas concentraciones.¹⁵
- ✓ La posibilidad de liberar el fármaco en determinadas condiciones de pH y de temperatura por la presencia de alguna molécula específica, o debido a estímulos externos.¹⁶
- ✓ Estos sistemas posibilitan la incorporación conjunta de varios agentes activos así como la posibilidad de ejercer varios efectos diferentes al mismo tiempo.¹⁷
- ✓ Por último, conviene resaltar que el hecho de poder concentrar el agente activo en su lugar de acción ofrece la posibilidad de minimizar los efectos secundarios en los pacientes y de aumentar el efecto terapéutico de la molécula en cuestión.

1.2 TIPOS DE NANOPARTÍCULAS.

Los tipos de NPs que se estudian para el transporte de fármacos incluyen liposomas, NPs lipídicas, NPs de oro, nanodiamantes, NPs magnéticas, nanotubos de carbono, quantum dots, NPs poliméricas, dendrímeros o NPs basadas en virus (figura 1). En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio y la preparación de tres tipos de NPs como son las poliméricas, las magnéticas y las de núcleo metálico de oro.

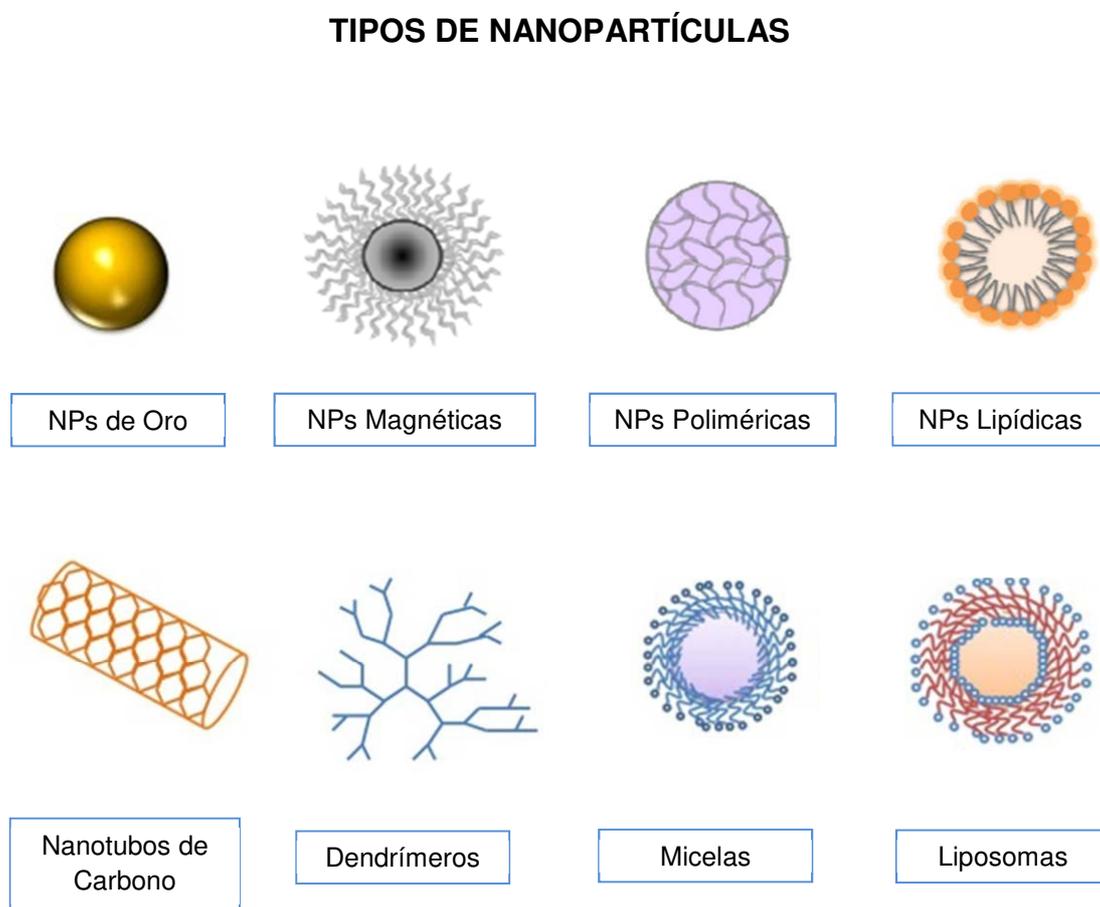


Figura 1. Esquema representativo de varios tipos de NPs.

A. Nanopartículas metálicas de Oro.

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (Au@NPs) exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico.^{18,19} Además pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos como anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.^{20,21} Todo esto hace que las Au@NPs despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario.^{22,23} En medicina estas NPs destacan por sus propiedades foto-terapéuticas. En presencia de luz láser se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales (hipertermia plasmónica).²⁴ Por ello, en los últimos años se han realizado notables esfuerzos en la investigación y en la aplicación de las Au@NPs para la detección precoz, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.²³ Además pueden utilizarse en la elaboración de partículas poliméricas para el transporte, detección y vectorización selectiva de fármacos.²⁵ También destaca el empleo de las Au@NPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo.²⁶

B. Nanopartículas magnéticas.

Las NPs magnéticas se sintetizan a partir de un elemento metálico, como puede ser hierro, cobalto o níquel, o bien a partir de un óxido de estos metales.²⁷ Las más estudiadas dentro de este grupo son las NPs de óxido de hierro.²⁸ Esto es debido a que son biocompatibles, biodegradables y

superparamagnéticas, lo que las habilita para aplicaciones en terapia fototérmica, resonancia magnética o como agente de contraste en diagnóstico por imagen.^{29,30,31} Asimismo, presentan una buena capacidad para modificar su superficie mediante anticuerpos u otros elementos que permitan su direccionamiento activo.³² Las NPs magnéticas se componen de un núcleo de óxido de hierro que puede ser recubierto con lípidos, polisacáridos o polímeros para conferirles estabilidad.

C. Nanopartículas poliméricas.

Las NPs poliméricas se preparan por polimerización de los correspondientes monómeros generando NPs con un tamaño que va desde unos 100 nm hasta unos pocos micrómetros. Estas NPs son de muy diverso tipo dependiendo del monómero, y su uso para el transporte de fármacos está muy extendido.³³

Entre los polímeros más empleados se encuentra PEG (polietilenglicol), poli(4-vinilpiridina), poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli(*N*-isopropilacrilamida), ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) o polimetacrilato (PMA).^{34,35} Para aplicaciones biomédicas es muy importante que los polímeros sean biodegradables, que no presenten toxicidad en el paciente y que sean de cadena pequeña-media para ser eliminados de forma natural. Aquellos polímeros que presentan estas propiedades se convierten en candidatos ideales para su uso clínico.³⁶

Además, dentro de las partículas poliméricas se encuentran los microgeles que son polímeros de tamaño micro o nanométrico formados por cadenas entrecruzadas. Algunos de los monómeros usados en la síntesis de los microgeles son capaces de responder a cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura o el pH,^{37,38} sufriendo modificaciones

químicas o físicas que cambian su conformación y permiten controlar la liberación de su contenido.³⁹ Estos polímeros se utilizan para la síntesis de NPs pH o T dependientes, que suponen una gran ventaja en los tratamientos contra el cáncer, ya que aportan cierta especificidad por el microambiente tumoral.

Por otro lado, las NPs huecas son otro subtipo dentro de este grupo que despiertan un gran interés.⁴⁰ Esto es debido a que, en general, presentan una buena capacidad para encapsular moléculas químicamente muy diferentes entre sí, permiten una elevada carga de fármaco en su interior y presentan un volumen interno hidrofílico lo que es muy útil para incorporar compuestos con baja solubilidad acuosa.⁴¹

D. Nanopartículas lipídicas.

Las NPs lipídicas son sistemas compuestos por una matriz de lípidos que son sólidos a temperatura ambiente y corporal, y que se encuentran estabilizados mediante tensioactivos. Estos sistemas presentan buena estabilidad física (que incrementa la protección de los fármacos lábiles), permiten una liberación controlada del fármaco, el direccionamiento activo y permiten su administración por varias vías, no solo la intravenosa. Además, son bien tolerados por el organismo, el coste de los materiales empleados en su preparación es bajo y durante su síntesis pueden combinarse con diversas moléculas, obteniendo derivados con distintas funcionalidades. Este tipo de NPs se estudia como una alternativa a los liposomas (otro tipo de formulación lipídica que tiene la misma estructura que la membrana celular) y a las NPs poliméricas, ya que no presentan algunos de sus inconvenientes. Si las comparamos con los liposomas, las NPs lipídicas tienen una mayor estabilidad física, existe un menor riesgo de liberación indeseada del fármaco, tienen más especificidad por

el tumor y más posibilidades de modulación. Las ventajas frente a las NPs poliméricas se centran en que tienen una menor toxicidad y permiten una mayor producción a gran escala.¹⁰

La buena biocompatibilidad de las NPs lipídicas depende de su naturaleza y de la cantidad utilizada de los diferentes componentes que la conforman. Los lípidos utilizados para la síntesis de estas NPs pueden ser triglicéridos (como la tripalmitina o triestearina), monoalclgliceroles (como la monoestearina), ácidos grasos (como el ácido esteárico), esteroides (como el colesterol) y ceras (como el palmitato de cetilo). Los tensioactivos utilizados para estabilizar la formulación son polímeros, lecitinas, polisorbatos y monoglicéridos polioxietilenados, los cuales pueden aportar toxicidad a las NPs.⁴²

Un ejemplo de la influencia del surfactante en la toxicidad de la formulación son las NPs que usan dodecilsulfato sódico, que han demostrado ser más tóxicas que las sintetizadas con otros tensioactivos.⁴³ También las NPs formuladas con ácido esteárico han presentado una mayor toxicidad que las que contenían otros lípidos como tripalmitina o monoestearina.⁴² El tamaño de las NPs, su forma o el estado físico del núcleo sólido lipídico también podrían estar relacionados con este fenómeno. Para estudiar *in vitro* la biocompatibilidad de las NPs lipídicas blancas o sin carga, se utilizan técnicas como ensayos de citotoxicidad, estudios de la función mitocondrial, del ciclo celular, o técnicas de análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, el análisis de la hemólisis de los eritrocitos o glóbulos rojos procedentes de sangre humana está alcanzando cada vez más importancia como técnica de estudio de la biocompatibilidad de estas NPs, especialmente debido a que se

están usando cada vez más para la administración intravenosa de compuestos.⁴³

Las NPs lipídicas presentan otro inconveniente, como la limitada capacidad de carga del fármaco, que depende en gran medida de la estructura del lípido utilizado y su estado polimórfico (cuanto más imperfecciones tenga el cristal que forma el lípido al solidificar mayor será la carga de fármaco). Este hecho no solo limita la carga inicial del fármaco, sino que también puede provocar un escape del mismo si se produce la transición polimórfica al estado más ordenado durante el almacenamiento.⁴⁴

E. Nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono son cilindros huecos de tamaño nanométrico sintetizados a partir de carbono en disposición hexagonal, que puede presentar una estructura con una sola capa o con múltiples capas.⁴⁵ Se usan en la detección del cáncer mediante dos mecanismos diferentes: como un electrodo en una reacción redox y otro como un transistor de efecto de campo capaz de detectar cambios en la carga de superficie. En el primer caso, el proceso es específico, ya que el antígeno es reconocido de forma dual, mientras que en el segundo caso se requiere solamente un anticuerpo para emitir la señal.⁴⁶

En cuanto a la terapia antitumoral, los nanotubos de carbono mejoran la internalización celular y la eficacia de incorporación del fármaco,⁴⁷ y ha sido asociado a fármacos antitumorales, como Doxorrubicina,⁴⁸ Docetaxel,⁴⁹ Oxaliplatino⁵⁰ o Paclitaxel⁵¹, mejorando el efecto de los fármacos en disolución en todos los casos. Asimismo nanotubos de carbono multicapa con polietilenglicol (PEG) han mejorado la solubilidad de Oxaliplatino, produciendo una liberación progresiva del fármaco y aumentando la muerte en células de

adenocarcinoma de colon.⁵⁰ Esto se consiguió mediante la “pegilación”, que retardó la liberación de Oxaliplatino, a la vez que mejoró su biodisponibilidad.

F. Dendrímeros.

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas compuestas de ramificaciones repetitivas con un patrón geométrico de numerosos brazos que se extienden desde el núcleo.⁵² Las NPs formadas por estos compuestos han sido diseñadas para incrementar la eficacia de los fármacos antitumorales, dirigiendo el fármaco hacia el tejido tumoral. Esto se consigue gracias a la presencia de los brazos del dendrímero, ya que las posiciones terminales permiten la unión de moléculas activas o anticuerpos.¹⁰

Uno de los fármacos vehiculizados en dendrímeros es Doxorrubicina, que se ha conjugado con dendrímeros “pegilados” mediante enlaces hidrazona, que presentan una rotura dependiente de pH, liberándose el fármaco al alcanzar el medio un pH de 5.0.⁵³ Se han sintetizado también dendrímeros de poliamidoamina para el transporte de Cisplatino, los cuales presentan una doble funcionalización: liberación dependiente del pH y direccionamiento activo al incorporar también Herceptin.⁵⁴

G. Micelas.

Se trata de NPs formadas por polímeros anfifílicos, y tienen una estructura formada por un núcleo hidrófobo y una cubierta hidrófila.⁵⁵ Se han utilizado para el transporte no sólo de fármacos, sino también de genes y nutracéuticos, y presentan propiedades ventajosas como buena solubilidad, permeabilidad, biodisponibilidad y consiguen la reducción de la dosis de fármaco administrada y de los efectos adversos.⁵⁶

Oxaliplatino ha sido incorporado en micelas, en este caso formando complejos con un metal. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* no mostraron un aumento de la citotoxicidad con estos sistemas, pero sí que fueron prometedores los resultados de inhibición del tumor *in vivo*.⁵⁷

En otros casos, las micelas poliméricas se han usado para el transporte conjunto de dos fármacos, alojados en diferentes compartimentos de la partícula, con el fin de lograr una sinergia en el efecto antitumoral.⁵⁸

H. Liposomas.

Los liposomas son vesículas esféricas formadas por una bicapa lipídica similar a la membrana celular, con un núcleo y la superficie de naturaleza hidrosoluble, mientras que el interior de la membrana es lipófilo.⁵⁹ Por tanto, se trata de sistemas anfifílicos con capacidad para incorporar tanto moléculas hidrosolubles como liposolubles. Además presentan interés por su habilidad para reducir la toxicidad de los fármacos y sus efectos adversos, incrementar su tiempo de acción y controlar su liberación.⁶⁰ Otra ventaja de este tipo de NPs es su buena biocompatibilidad, lo que hace que sea uno de los sistemas de liberación de fármacos más estudiados. Así, varios fármacos antitumorales han sido encapsulados por liposomas como son Doxorrubicina, Paclitaxel, Oxaliplatino, Irinotecan, Daunorrubicina, Citarabina o Vincristina.⁶¹

Por otro lado, los liposomas pueden ser funcionalizados para mejorar sus características físico-químicas e incrementar el éxito del tratamiento. Un ejemplo es el desarrollo de liposomas pH-sensibles, cuya bicapa lipídica se desestabiliza mediante la protonación, lo que promueve la liberación del fármaco en ambientes ácidos como puede ser el tejido tumoral, o la liberación del fármaco mediante mecanismos de hipertermia.⁶²

1.3 FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

Una de las principales ventajas de las NPs es que presentan una gran versatilidad a la hora de ser diseñadas, lo que permite aportarles características deseadas mediante funcionalización específica. Ésta puede hacerse modulando las características físico-químicas de su formulación química, por la presencia de un determinado componente o por la adición de moléculas con propiedades específicas en su superficie.

La funcionalización permite incorporar determinadas características que aumenten la efectividad y reduzcan los efectos secundarios frente al fármaco sin encapsular. Además, presenta otras ventajas ya que los grupos funcionales sirven de anclaje para otras moléculas, se logra una mayor afinidad con el medio e incluso puede facilitar la purificación de los sistemas de NPs.

Los principales métodos de funcionalización se pueden clasificar en dos categorías:

- ✓ Funcionalización no covalente: se refiere a la unión sin enlace químico de las NPs a distintas moléculas o especies. Por lo general las interacciones que ocurren son débiles del tipo fuerzas de Van der Waals. La asociación de nanotubos de carbono con algunas biomoléculas y polímeros entran dentro de esta categoría.⁶³
- ✓ Funcionalización covalente: en este caso hay enlace químico entre la superficie de la NP y la especie anclada a ella. La funcionalización de los extremos da lugar a cambios muy localizados y no alteran las propiedades del conjunto. Este tipo de funcionalización amplía las posibilidades del uso de las NPs ya que los grupos que se incluyen pueden actuar como sensores en el reconocimiento de moléculas, ampliar las propiedades

conductoras de la partícula e incluso dotarla de propiedades magnéticas. Dentro de la funcionalización covalente destacan métodos como la activación térmica, la funcionalización por reacción electroquímica o por reacción fotoquímica (figura 2).

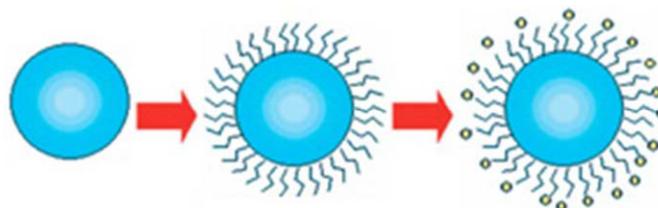


Figura 2. Esquema general de la funcionalización covalente de NPs.

La funcionalización de las NPs tiene como objetivo principal incrementar la especificidad de las NPs mediante el direccionamiento activo o *drug targeting*. Éste puede definirse como la capacidad de un fármaco de acumularse en el lugar de acción de forma selectiva y cuantitativa independientemente de la vía y modo de administración.⁶⁴ De esta forma se pretende resolver los principales problemas asociados a la administración sistemática de fármacos como pueden ser la falta de afinidad por el lugar de acción, la necesidad de administrar una alta dosis de fármaco para conseguir la concentración adecuada y el aumento de toxicidad debido a esa alta concentración.

Una vez producida la administración de las NPs, el reconocimiento a nivel celular se produce mediante la unión del agente activo a un ligando que presenta afinidad con la célula a tratar (targeting activo). De esta forma uno de los mayores retos es definir el ligando de dirección óptima para transportar selectivamente y con éxito los sistemas de NPs al tejido tumoral. Estas estrategias se basan en la capacidad de estos ligandos para unirse a la superficie de las células tumorales de manera apropiada para desencadenar la

endocitosis del receptor, de modo que los agentes terapéuticos sean capaces de entrar en la célula cancerosa.⁶⁵

Como se ha mencionado previamente, para llevar a cabo este direccionamiento activo también pueden usarse materiales que respondan a estímulos como el pH, la temperatura (hipertermia), actividad enzimática, potencial redox, ultrasonido, luz o campos magnéticos o eléctricos.³⁹ De entre estos mecanismos los más estudiados son la hipertermia y el uso de NPs dependientes del pH. En cuanto al primer método, éste se basa en la sensibilidad que presentan las células tumorales al aumento de temperatura con respecto a las células normales. Se están realizando, por ejemplo, estudios basados en la ablación fototérmica mediante el uso de láser de infrarrojos.⁶⁶ Sin embargo, se ha comprobado que el tejido tumoral absorbe muy poca luz de este tipo por lo que es necesario aumentar la energía lo que provoca también daño a las células sanas. Por tanto, el uso de NPs puede ayudar a focalizar la hipertermia e intensificarla en el tejido tumoral.⁶⁷ Para el segundo mecanismo, el uso de NPs dependientes del pH supone una gran ventaja en el tratamiento del cáncer. Esto es debido a que el medio extracelular en el tejido tumoral presenta un pH más ácido que el resto de tejidos sanos, por la presencia de lactato. Así, se ha observado que la modulación del pH en los tumores favorece el crecimiento tumoral, la aparición de metástasis y angiogénesis y está relacionada con la respuesta clínica a la quimioterapia y radioterapia.⁶⁸

Las NPs sensibles al pH serían, por tanto, capaces de liberar el fármaco específicamente en el tejido tumoral en respuesta a este estímulo, aumentando la concentración terapéutica del fármaco en el tumor y, por tanto, la eficacia del tratamiento, y a su vez reducirían los efectos secundarios del fármaco, ya que

disminuye la concentración del mismo en los tejidos sanos al no liberarse al pH de éstos.⁶⁹

1.4 FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER: PACLITAXEL, 5-FLUOROURACILO Y DOXORRUBICINA.

1.4.1 Paclitaxel.

Paclitaxel (PTX) es uno de los fármacos más efectivos contra el cáncer de pulmón y de mama.¹ Fue descubierto por el Research Triangle Institute (RTI) cuando Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani aislaron el compuesto extraído de la corteza del Tejo del Pacífico. Ésta había sido recolectada junto con otras plantas como parte de un estudio organizado por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) de Estados Unidos, con el objeto de identificar nuevos componentes antitumorales. Durante la década de los 70 se descubrieron las propiedades de este compuesto, conocido como Taxol®, y se publicó su estructura convirtiéndose en uno de los fármacos de mayor éxito para el tratamiento del cáncer (figura 3).

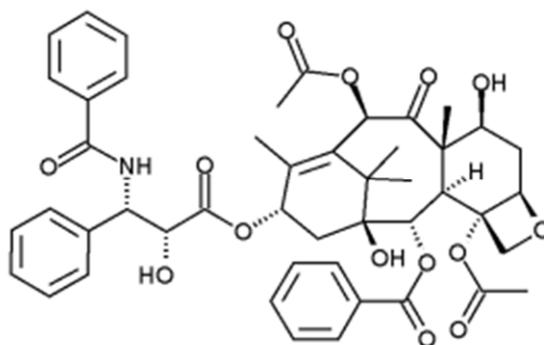


Figura 3. Estructura química de Paclitaxel (PTX).

A pesar de su escasa solubilidad los prometedores resultados de este antitumoral hizo que en 1984 se llevaran a cabo los primeros ensayos clínicos. Sin embargo, debido a la baja disponibilidad de la especie de la que se extrae y los altos costes de producción, se planteó la síntesis química del compuesto

altamente demandado en el momento. No fue hasta 1994 cuando se consiguió la síntesis completa de esta molécula de gran complejidad.⁷⁰

En 1992 la compañía farmacéutica Bristol-Myers Squibb adquirió el compuesto, registrando la marca comercial como Taxol® y dándole el nombre genérico de PTX convirtiéndose en ese momento en el agente quimioterápico más rentable. En primer lugar fue probado en el cáncer de ovario, a continuación se extendió al cáncer de mama y rápidamente se mostraron también sus propiedades antitumorales en el cáncer endometrial, cervical, páncreas, leucemia, sarcoma de Kaposi y gastroesofágico.^{70,71}

El mecanismo de acción de PTX se produce durante el proceso de la mitosis celular. En éste la tubulina (proteína globular que genera el citoesqueleto de los microtúbulos) polimeriza formando el huso mitótico para posteriormente llevar a cabo el proceso de despolimerización por el que se divide el material genético en cada copia durante la división celular. La unión de PTX a la subunidad β de la tubulina estabiliza los microtúbulos e impide el proceso de despolimerización (figura 4). Por lo tanto, el proceso de mitosis se detiene produciéndose la muerte celular mediante la activación del proceso de apoptosis celular.⁷²

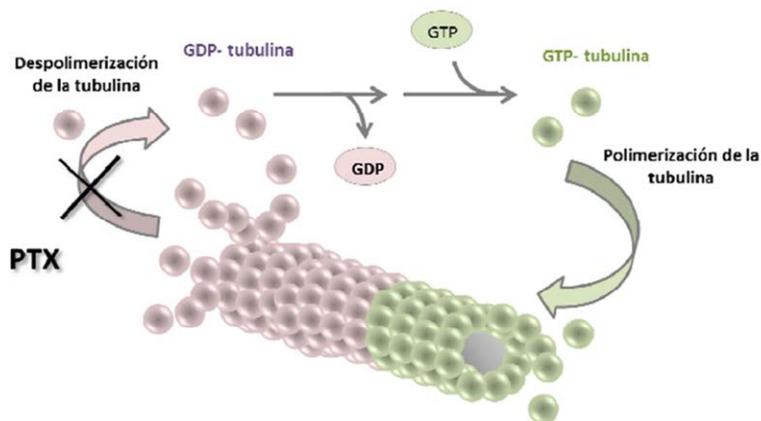


Figura 4. Mecanismo de acción de Paclitaxel.

A pesar de la efectividad de este fármaco, su administración presenta múltiples inconvenientes ya que provoca la aparición de diversos efectos adversos como mielosupresión, cardiotoxicidad y efectos relacionados con la neurotoxicidad, como neuropatía periférica, neutropenia y reacciones de hipersensibilidad.⁷³ El 60 % de los pacientes tratados se ven afectados por neuropatía periférica lo que lleva a menudo a disminuir la dosis o incluso a suspenderla. Se trata de una neurotoxicidad que produce una parestesia dolorosa en las extremidades así como entumecimiento, hormigueo y pérdida del sentido del tacto. Por otro lado, la hipersensibilidad es un fenómeno serio que puede ir acompañada de broncoespasmos, urticaria, enrojecimiento, erupciones cutáneas, hipotensión y aumento de la presión arterial.⁷⁴

Debido a la escasa solubilidad de PTX en agua (0.4 µg/mL) se hace necesaria la utilización de disolventes orgánicos como el Cremophor EL o vehiculizar con nanoformulaciones compuestas por nanopartículas de albúmina, como el Abraxano. El Cremophor EL es altamente tóxico por lo que es necesaria la premedicación de los pacientes con corticoides e histaminas antes de su administración. Además, se ha visto que modifica la farmacocinética de PTX haciéndola impredecible por lo que es otra razón más que limita su uso clínico.⁷⁵

1.4.2 5-Fluorouracilo.

5-Fluorouracilo (5FU) fue uno de los primeros fármacos utilizados en oncología y desde que se descubrió su actividad antitumoral en la década de los 60 se han buscado distintas formas de atacar las células tumorales con el uso de este medicamento.⁷⁶ Fue sintetizado por primera vez por el equipo del doctor Charles Heidelberg en el laboratorio McArdle de la Universidad de Wisconsin

en la década de los 50. Desde entonces el 5-Fluorouracilo sigue siendo utilizado para el tratamiento del cáncer de estómago, colon y mama.

5-Fluorouracilo se encuentra en el grupo de los fármacos antineoplásicos que actúan preferentemente sobre la fracción tumoral en fase de división. Así, mientras que PTX se trata de un fármaco que actúa sobre la formación de los microtúbulos en la división celular,⁷² 5-Fluorouracilo es un fármaco antimetabolito que inhibe la formación de un metabolito específico. En este caso impide la formación de timina a partir de timidilato ya que inhibe la timidilato sintasa e interrumpe, por tanto, la síntesis de ADN celular. Su acción es potenciada por la presencia de folatos reducidos en el interior de la célula ya que éstos favorecen la unión del 5-Fluorouracilo a la enzima, aumentando así su eficacia. Las células tumorales captan con mayor facilidad este fármaco ya que su mecanismo de división es más rápido que las células sanas.⁶ La incorporación de 5-Fluorouracilo en el proceso conlleva la formación del metabolito 5-FdUMP (monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina) que compite directamente con el desoxiuridilato (dUMP) por la timidilato sintasa, provocando la ruptura de la síntesis de ADN celular (figura 5).

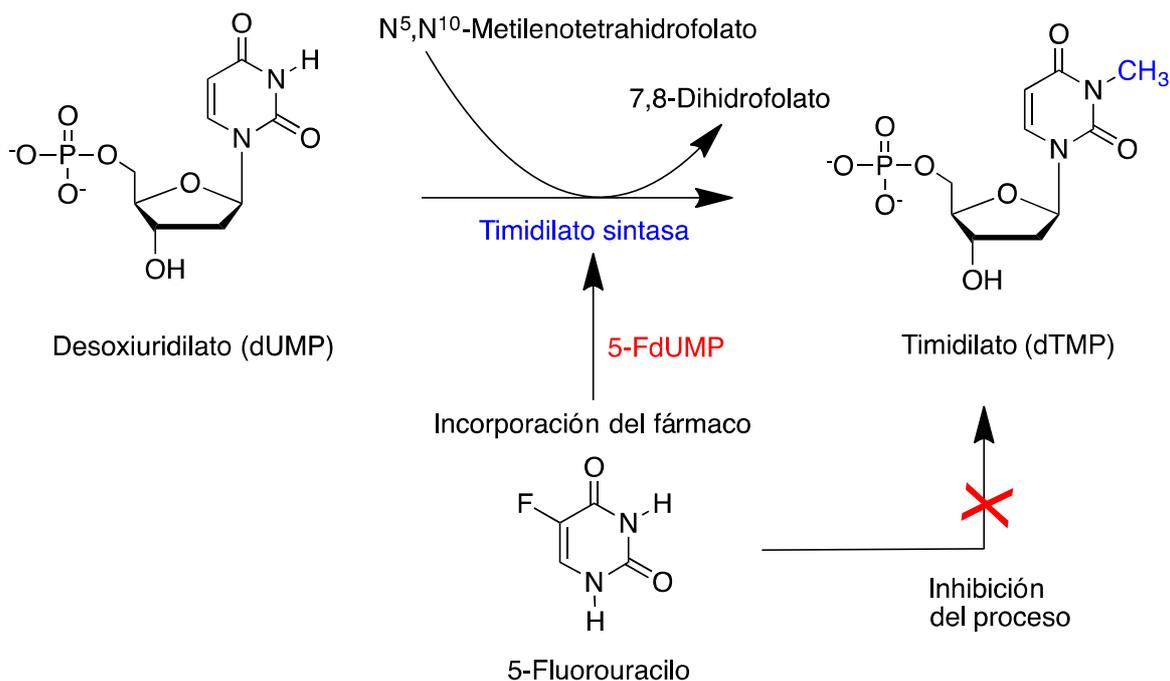


Figura 5. Esquema representativo del mecanismo de acción de 5-Fluorouracilo.

La administración de este fármaco provoca efectos secundarios al menos al 30 % de los pacientes. Éstos pueden ser diarreas, náuseas y vómitos ocasionales, llagas en la boca, poco apetito y disminución del nivel de glóbulos rojos, blancos y plaquetas, lo que incrementa el riesgo para los pacientes de padecer anemia, infección o hemorragias.

Además 5FU tiene una absorción digestiva muy baja y variable por lo que no se administra de forma oral. Si se realiza una aplicación tópica sobre la piel se absorbe únicamente un 6 % de la dosis. Por ello, una de las vías de administración del medicamento en pacientes con cáncer es vía intravenosa, pero debido a que el tiempo medio de eliminación es muy corto (del orden de 20 minutos), es necesario un aumento de dosis intravenosas. La consecuencia es que disminuye la captación hepática. Esto es debido a una saturación de los procesos de metabolización del fármaco. Una pequeña cantidad de 5-

Fluorouracilo es transformada en metabolitos activos en los diferentes tejidos y el resto de la dosis es transformada en dihidropirimidina. En algunos pacientes una baja cantidad de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa hace que el 5-Fluorouracilo sea muy tóxico incluso en dosis muy pequeñas.

1.4.3 Doxorrubicina.

Doxorrubicina (DOX) es uno de los agentes anticancerígenos más efectivos que se conocen. Su aparición en 1950 se debió a la investigación de una compañía italiana, Farmitalia Research Laboratories, para encontrar compuestos anticancerosos en microbios del suelo. Se aisló una muestra de suelo de los alrededores de Castel del Monte, una fortaleza del siglo XIII, encontrándose en una cepa de *Streptomyces peuceticus*. Se trataba de un antibiótico que mostraba una buena actividad antitumoral, conocido como Daunorrobucina. Debido a los efectos cardiotoxicos de este antibiótico⁷⁷ se mutó la cepa original con *N*-nitroso-*N*-metil-uretano obteniéndose un nuevo antibiótico, Doxorrubicina. Este nuevo compuesto mostró una mejor actividad que su predecesor.⁷⁸

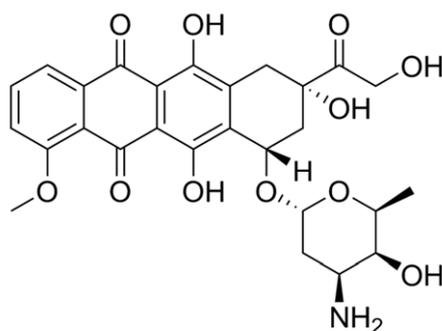


Figura 6. Estructura química de Doxorrubicina.

Doxorrubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas con una estructura muy similar a la Daunomicina y al igual que ésta se trata de un intercalante del ADN. Es activo contra más tipos de cáncer, incluyendo leucemia, linfoma, pulmón, ovario y mama, que cualquier otro agente antineoplásico. El mecanismo de acción es complejo y aún no está plenamente esclarecido, pero se conoce que al intercalarse en el ADN inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, ya que dificulta el avance de la enzima topoisomerasa II encargada de la apertura de la doble hélice durante la transcripción. De esta forma se detiene el proceso de replicación.⁷⁹

La administración de Doxorrubicina provoca severos efectos adversos. Entre ellos se encuentra náuseas, vómitos y arritmias. También produce un descenso en el recuento de leucocitos así como una alopecia completa. Cuando la dosis acumulada de este fármaco alcanza los 500 mg/m² de superficie corporal, el riesgo de desarrollar efectos secundarios cardiacos se incrementa de forma drástica. El más grave es la cardiotoxicidad que va desde una arritmia hasta un paro cardíaco, lo que limita enormemente su uso.⁸⁰

En 1979 se comenzó a investigar sobre la capacidad de los liposomas para encapsular, transportar y liberar Doxorrubicina. En 1998 se aprobó el uso de un sistema de liposomas funcionalizados con polietilenglicol (PEG) para el cáncer de ovario y el cáncer de mama. La eficacia del tratamiento es equivalente a los convencionales reduciéndose los efectos adversos.⁸¹

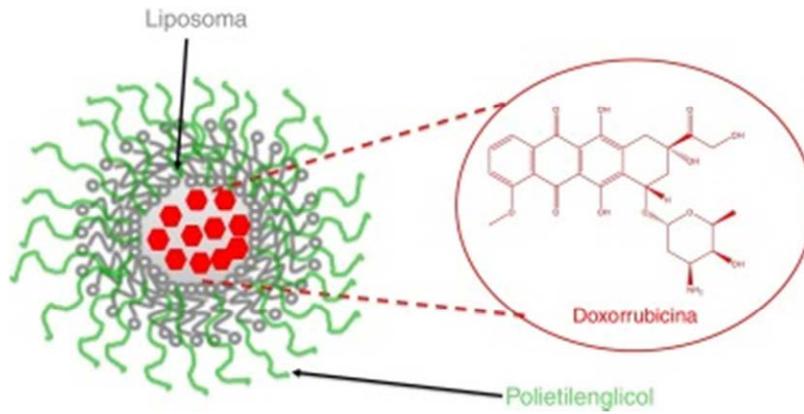


Figura 7. Esquema de la NP de Doxorubicina en liposomas.

No obstante, la disminución de la cardiotoxicidad es un tema que genera bastante controversia. Es por ello que numerosos esfuerzos continúan en la búsqueda de sistemas de NPs que sean capaces de dirigir selectivamente este fármaco a las células tumorales y se reduzca o evite el daño a las células cardíacas.^{82,83}



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



2. OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. OBJETIVOS.

Los objetivos que se pretenden alcanzar mediante la realización de esta Tesis Doctoral son:

- ❖ Optimizar el procedimiento de preparación de nanopartículas poliméricas huecas de poli(4-vinilpiridina) (p4VP) y poli(*N*-isopropilacrilamida) (pNIPAM) a partir de núcleos de oro que se encuentran recubiertos con dichos polímeros.
- ❖ Preparar nanopartículas macizas de p4VP y pNIPAM.
- ❖ Encapsulación de Paclitaxel, 5-Fluorouracilo y Doxorubicina en las nanopartículas preparadas. Optimización del proceso.
- ❖ Modificar las NPs poliméricas con ácido 3-butenoico y ácido fólico con objeto de vectorizarlas, es decir, dirigir las con preferencia al lugar donde debe ser liberado el fármaco.
- ❖ Analizar la actividad de los fármacos encapsulados en líneas celulares tumorales, en particular, de colon, mama y pulmón.
- ❖ Sintetizar y caracterizar nanopartículas poliméricas con núcleo metálico principalmente Au@NPs, y avanzar en la preparación de aquellas que presentan núcleo magnético (nanopartículas de Fe₃O₄).
- ❖ Llevar a cabo el estudio del efecto del pH en la capacidad de incorporación y liberación del fármaco en la nanopartícula, en especial a los nanocompuestos p4VP@Au.
- ❖ Incorporar y estabilizar Ag@NPs en membranas para modular la liberación de los agentes activos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



3. PARTE EXPERIMENTAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

La caracterización, morfología y química de las NPs preparadas se ha llevado a cabo mediante cromatografía HPLC, espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), microscopía electrónica de transmisión o barrido (TEM/SEM), microscopía μ Raman, dispersión dinámica de luz (DLS) y Potencial Zeta. Asimismo, se ha caracterizado las membranas modificadas con NPS por medidas de fuerza de elongación, difracción de rayos X y de potencial eléctrico.

3.1.1 Análisis por HPLC.

Los análisis HPLC han sido realizados con el objetivo de medir la cantidad de agente activo incorporado a la nanopartícula, así como evaluar su liberación. Se ha llevado a cabo en un cromatógrafo Thermo Spectrasystem, equipado con un detector de fotodiodo. La separación de las muestras se realizó empleando una columna Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 μ m, Varian) operando a 25 °C. La fase móvil usada se compone de una mezcla de agua:acetonitrilo (60:40), con un tiempo de cromatografía de 40 min y un flujo de 0.7 mL/min. El volumen de inyección fue 10 μ L. Previamente al análisis, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de Teflón de 0.2 μ m.

PTX se detectó a 227 nm y bajo estas condiciones se observó con un tiempo de retención de 5 min, lo que permitió su cuantificación. Las curvas de calibración fueron preparadas según el método descrito en la referencia.⁸⁴

Para determinar la cantidad de PTX incorporado a las nanopartículas 2 mL de la emulsión de NPs fueron centrifugados (3000 rpm, 5 min). La fase acuosa se decantó (aprox. 1.5 mL) y el sólido resultante, *pellet*, se extrajo con etanol (7

mL a 80 °C) durante 5 min. El extracto etanólico se centrifugó (3000 rpm, 5 min) para eliminar cualquier sólido presente, y el sobrenadante se filtró y se inyectó en el equipo de HPLC para determinar la cantidad de agente activo en la fase etanólica, lo que permitió establecer asimismo, la cantidad de compuesto en las NPs.⁸⁵

3.1.2 Análisis de la liberación de activos.

Para estudiar la liberación de PTX, muestras representativas de dispersiones de NPs (2 mL) fueron centrifugadas (3000 rpm, 5 min) en tubos de ensayos con tapón. La fase acuosa se decantó y se añadió agua (3 mL) al sólido resultante centrifugándose de nuevo (3000 rpm, 5 min). Este procedimiento se repitió una vez más. Después de la última decantación, se obtuvieron muestras sólidas de NPs de 3 mg, cada una. Estas muestras se dispersaron en tampón fosfato (PBS, 5 mL para cada muestra, pH = 7.5) y Tween® 80 (0.02 mL); y los tubos fueron colocados en un baño de agua a 37 °C con agitación a 100 rpm. A intervalos de tiempo determinado, el medio donde se libera el agente activo se extrajo con etanol (2 x 3 mL), añadiéndose, a continuación, más disolución tamponada (5 mL) para continuar el estudio de liberación. El extracto etanólico se evaporó y se reconstituyó con agua/acetonitrilo (3 mL, 60:40) para el análisis por HPLC.

3.1.3 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).

Los espectros de UV-Vis fueron realizados en un espectrofotómetro Hewlett – Packard modelo 8452A, y en un AGILENT 8453. Este último equipo, permite el registro de espectros UV-Vis de muestras sólidas y líquidas en un rango espectral de 190-1100 nm, llegando al infrarrojo. Dispone, además, de un

sistema de detección multicanal tipo *diode-array*, que reduce el tiempo de registro. Puede acoplarse también el módulo Specac P/N 2100 para temperatura variable.

3.1.4 Microscopía electrónica de transmisión y barrido (TEM / SEM) y dispersión de Rayos X de ángulo pequeño (SAXS).

El estudio de la morfología de las NPs se ha realizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleando un microscopio JEM 1400 (JEOL), que opera a un voltaje de 80 kV ó 100 kV. Con las dispersiones coloidales una cantidad de muestra de 10 μ L se deposita en una rejilla de cobre de 100 mallas y se deja secar a temperatura ambiente antes de realizar la medida.

Las imágenes TEM de Ag@NPs son obtenidas usando un microscopio Philips CM 200, mientras que el estudio de la microscopía electrónica de barrido (SEM) para las membranas RC/6 y RC/6-Ag@NPs se llevan a cabo usando el software ImageJ en un microscopio Jeol JSM-6400 que trabaja a un voltaje de 20 kV.

El estudio cryo-TEM se ha llevado a cabo con muestras vitrificadas, usando Vitrobot (FEI) o Grid Plunger (Leica). Una gota de la muestra se deposita en una rejilla eliminándose el exceso de agua con un papel de filtro. A continuación, la rejilla se introduce en etano líquido (- 88 °C). Para evitar la descongelación de las muestras, éstas se mantienen en nitrógeno líquido hasta que se introducen en el microscopio JEOL JEM-1230 o Zeiss Libra 120.

Los datos SAXS se han obtenido utilizando la línea BL11 de las instalaciones de sincrotrón Alba (Barcelona, España) y empleando un detector ADSC. La calibración del instrumento y el resto de los datos se han realizado utilizando los protocolos de Alba.

3.1.5 Microscopía μ Raman / SERS.

El instrumento utilizado en esta técnica ha sido el microscopio Invia Reflex Raman (RENISHAW). Éste incluye tres líneas de excitación láser (488, 514.5 y 785 nm). El aparato se encuentra equipado con un objetivo Leica 50x (apertura numérica 0.75), con una potencia de salida de 2 mW sobre la muestra. Cada espectro se adquiere usando un 10 % del poder máximo del láser y añadiendo 5 escáneres de 50 s de exposición. La resolución se establece a 4 cm^{-1} y la geometría de las medidas a 180° .

Para obtener los espectros de NPs una pequeña porción de la muestra centrifugada es añadida a un portaobjetos de cristal, calibrando el instrumento previamente con una muestra estándar de Si (520 cm^{-1}).

3.1.6 Dispersión dinámica de luz (DLS) y Potencial Zeta.

Los análisis de dispersión dinámica de luz y de Potencial Zeta se realizaron usando un equipo Zetasizer Nano-ZS, con un ángulo de detección de 173° y un vector q de dispersión $q = 0.0264\text{ nm}^{-1}$. Este instrumento usa un láser de 4 mW He-Ne que opera a una longitud de onda de 633 nm.

La función de correlación de DLS se usó para calcular el promedio del diámetro hidrodinámico (D_h) a través de la ecuación de Stokes-Einstein. Las mismas muestras de DLS se emplearon para realizar mediciones de carga superficial de Potencial Zeta.

3.1.7 Difracción de Rayos X (XRD).

Los patrones de difracción de Rayos X se han obtenido en un difractómetro automático X'Pert Pro (PANalytical) empleando una radiación monocromática Ge (111) Cu K α y un detector X'Celerator. Los difractogramas obtenidos se encontraron en un intervalo de ángulos entre 5° y 45° (2 θ) con pasos de 0.017° y con potenciales de 45 kV y 35 mA, durante un tiempo de 30 min. Las muestras de RC/6 y RC/6-Ag@NPs fueron colocadas en un soporte de aluminio, adaptándolas al goniómetro con una configuración de ángulos de entre θ y 2 θ .

3.1.8 Propiedades elásticas de las membranas.

La caracterización de las propiedades elásticas de la membrana se ha realizado midiendo la tensión de la membrana en función de la fuerza de elongación. Para ello se ha empleado un calibrador de fuerzas digital (modelo Mark-T) conectado a un ordenador. La tensión máxima de medida ha sido 100 N con una precisión en longitud de ± 0.01 mm. Las medidas se han llevado a cabo a una velocidad en el cambio de fuerza de 10 mm/s.

3.1.9 Medida del potencial de membrana.

Los potenciales de membrana ($\Delta\Phi_{mbr}$) se han obtenido en células de potencial (ΔE) empleando disoluciones de cloruro de potasio de diversas concentraciones y a temperatura ambiente (25 ± 2 °C en el laboratorio). Asimismo, se han medido a un pH estándar de 5.8 ± 0.3 y con una velocidad de agitación de 500 rpm, para minimizar la polarización debida a la concentración en las superficies de las membranas.⁸⁶ Las medidas se realizaron con dos electrodos reversibles de Ag/AgCl conectados a un

voltímetro digital (Yokohama 7552, de 1 G Ω de resistencia de entrada) manteniendo constante la concentración de la disolución de KCl en un lado de la membrana ($C_C = 0.01$ M) y cambiando gradualmente la concentración en el otro lado (0.002 M $\leq C_V \leq 0.1$). El potencial de membrana de cada par C_C , C_V de disoluciones se ha obtenido restando el potencial de electrodo ($\Delta\Phi_{\text{elet}} = (RT/F) \ln(C_V/C_C)$) al potencial medido (ΔE , según la expresión $\Delta\Phi_{\text{mbr}} = \Delta E - \Delta\Phi_{\text{elet}}$).

3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE 4-VINILPIRIDINA (p4VP).

La preparación de nanopartículas esféricas huecas de p4VP se realiza en tres pasos.^{5,87} En primer lugar, se preparan las semillas de oro (partículas esféricas de aproximadamente 15 nm de diámetro) y se lleva a cabo su crecimiento controlado hasta tamaños del orden de 50 nm (Au@NPs). En segundo lugar, se recubren con el polímero, obteniéndose las partículas híbridas p4VP@Au, y en tercer lugar, se elimina el núcleo metálico oxidándolo, convirtiéndose en partículas huecas (p4VP@HU). Por otra parte, las partículas macizas de p4VP (p4VP@MZ) se preparan mediante polimerización radicalaria a partir del monómero 4-vinilpiridina, utilizando como entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA). En este apartado se incluye también el proceso de encapsulación de fármacos en estas nanopartículas.

3.2.1 Materiales.

Los reactivos utilizados son una disolución de ácido tetracloroaúrico trihidratado 167 mM preparada a partir de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99.9\%$ en base de traza metálica, citrato de sodio trihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99.9\%$), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $\geq 98.0\%$), ácido ascórbico (AA, $\geq 99.0\%$), ácido 3-butenoico (3BA, 97 %), 4-vinilpiridina (4VP, 95 %), *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA, $\geq 99.5\%$) y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (V50, 97 %). Todos estos productos así como Paclitaxel, Doxorrubicina y 5-Fluorouracilo han sido suministrados por la compañía Sigma-Aldrich. Asimismo, en todos los ensayos se ha utilizado agua desionizada de grado Milli-Q (Millipore).

3.2.2 Preparación de nanopartículas de oro (Au@NPs).

Las nanopartículas de oro esféricas de unos 15 nm de diámetro se han sintetizado mediante el método de Turkevich.⁸⁸ En este método se emplea una sal precursora del metal, en este caso, ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), el cual se hace reaccionar a ebullición con un agente reductor (citrato de sodio).

En primer lugar, se prepara una disolución de citrato de sodio 68 mM (0.2 g, 0.68 mmol) en agua (10 mL). Por otro lado, se prepara una disolución de ácido tetracloroáurico trihidratado 0.5 mM, a partir de la disolución inicial (150 μL , 0.025 mmol) en agua (50 mL). Esta disolución de sal de oro se lleva a ebullición en un matraz Erlenmeyer y se añade citrato de sodio (1.10 mL, 0.0748 mmol). De esta forma se obtiene una dispersión de concentración 0.5 mM de oro y 1.5 mM de citrato de sodio. La reacción se mantiene en agitación. A partir de ese momento se observa un cambio de color de amarillo pálido (correspondiente a la disolución inicial de ácido tetracloroáurico) a un azul oscuro y va adquiriendo varias tonalidades pasando por el violeta hasta llegar al rojo oscuro. Este cambio de color es debido al cambio del estado de oxidación del oro desde su forma iónica Au^{3+} a su estado metálico Au^0 . En ese momento se da por finalizada la reacción, pero se mantiene en agitación sin calentar.

Por otro lado, debido a la posibilidad de precipitación de las partículas metálicas, es necesario estabilizarlas con un agente surfactante. Para ello se prepara una disolución de CTAB 100 mM en agua (15 mL) a partir de la dilución de una disolución inicial 300 mM (2.75 g, 7.5 mmol) en agua (25 mL). Esta disolución se prepara a 40 °C para evitar la precipitación de CTAB. Una

vez preparada y con ayuda de una pipeta de vidrio, se trasvasa la dispersión de nanopartículas de oro con citrato a la disolución de CTAB. En ese momento la concentración resultante de las semillas obtenidas es de 0.4 mM obtenida mediante espectrofotometría UV-Vis (figura 8).

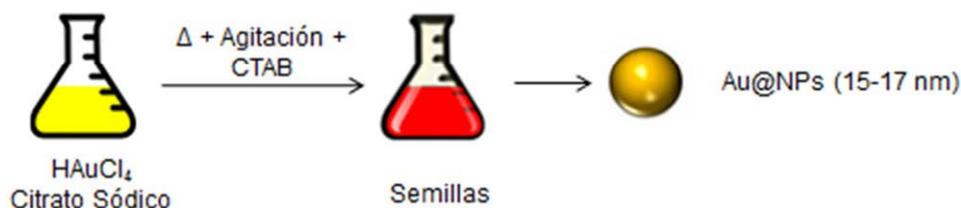


Figura 8. Primera fase de la preparación de Au@NPs: obtención de las semillas.

Una vez obtenidas estas nanopartículas de oro esféricas de tamaño comprendido entre 15 y 17 nm el siguiente paso es su crecimiento, que se lleva a cabo mediante un procedimiento denominado crecimiento mediado por semilla (seed-mediated method). Para ello se prepara una disolución de crecimiento formada por ácido tetracloroáurico trihidratado 0.5 mM (600 μ L, 0.1 mmol), a partir de la disolución de partida, en agua (200 mL). A esta disolución se añade CTAB 300 mM (7 mL, 2.1 mmol) obteniéndose una disolución 10 mM de CTAB y 0.5 mM de sal de oro. A continuación, se añade el agente reductor, en este caso ácido ascórbico 100 mM (2 mL, 0.2 mmol) y por último, se añade la semilla de oro (12 mL, $4.8 \cdot 10^{-3}$ mmol).

De esta forma la concentración de semilla resultante en la disolución es 0.024 mM. Ésta se ha calculado teniendo en cuenta el diámetro inicial de las nanopartículas y el diámetro final que se pretende conseguir.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 40 °C y con agitación magnética suave hasta obtener un color rojizo en la dispersión resultante. En

ese momento se continúa la reacción a temperatura ambiente durante 1 h. La muestra obtenida se almacena en un lugar cerrado y protegido de la luz solar. El estudio de la morfología de las nanopartículas obtenidas se lleva a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión, para lo que es necesario depositar una gota de muestra (~10 μL) en una rejilla de cobre y dejar secar a temperatura ambiente (figura 9).

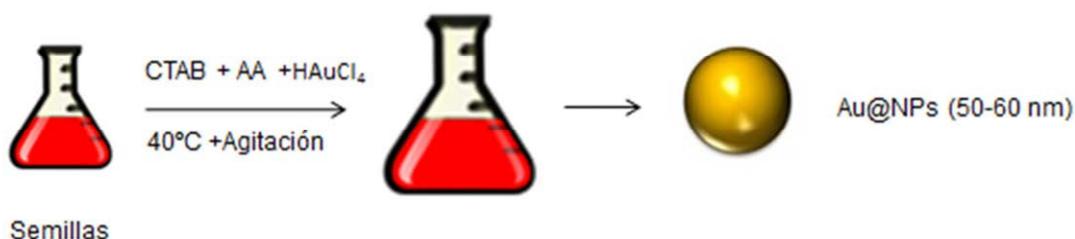


Figura 9. Segunda fase de la preparación de Au@NPs: crecimiento.

3.2.3 Preparación de nanopartículas recubiertas de p4VP (p4VP@Au).

Para el recubrimiento de las nanopartículas de 50 nm de Au con p4VP, en primer lugar se lleva a cabo una centrifugación a 6000 rpm durante 20 min de 25 mL de la muestra preparada en el apartado 3.2.2. A continuación, se elimina el sobrenadante. Sobre el *pellet* se añade una disolución de CTAB 300 mM (830 μL , 0.25 mmol) y se redispersa en agua destilada (25 mL). La disolución resultante presenta una concentración 10 mM de CTAB. La disolución se calienta a 70 °C y se añaden 100 μL de ácido 3-butenoico para funcionalizar las partículas con un doble enlace terminal. La mezcla se deja reaccionar durante 1 h a 70 °C.

Transcurrido ese tiempo, la disolución se centrifuga a 6000 rpm durante 20 min. A continuación, se elimina el sobrenadante y sobre el *pellet* se añade una

disolución de CTAB 300 mM (250 μ L, 0.075 mmol) y se redispersa en agua destilada (25 mL). La disolución resultante presenta una concentración 3 mM de CTAB. Posteriormente, la disolución se centrifuga a 6000 rpm durante 20 min. Finalizado el tiempo, se elimina el sobrenadante y sobre el *pellet* se añade CTAB 4 mM (200 μ L, $8 \cdot 10^{-4}$ mmol) y 10 mL de agua destilada. A continuación, la disolución se coloca en agitación en un baño de agua a 70 $^{\circ}$ C y se desgasifica con argón durante 10 min. Una vez transcurrido ese tiempo se añade 4-vinilpiridina (110 μ L, 1.0 mmol), *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.01 g, 0.06 mmol, 6 % mol/mol respecto a la cantidad de monómero) y el iniciador radicalario V50 0.1 M (150 μ L, 0.015 mmol) para que comience la polimerización. Una vez añadido el iniciador, la disolución se mantiene en el baño a 70 $^{\circ}$ C sin agitación durante 3 h para que se complete la reacción de polimerización. Por último la mezcla se centrifuga hasta en 5 ocasiones durante 30 min a 4500 rpm, de forma que tras cada centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* se redispersa en agua destilada (25 mL). En la última centrifugación la muestra obtenida se deja dispersa en 10 mL de agua y se almacena protegida de la luz solar.⁵

3.2.4 Oxidación del núcleo metálico. Obtención de nanopartículas huecas (p4VP@HU).

La obtención de las NPs huecas de p4VP se lleva a cabo mediante un proceso de oxidación de p4VP@Au en presencia de una mezcla de CTAB y $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.^{89,40} Para una completa oxidación del núcleo de Au la relación $\text{Au}^0/\text{Au}^{3+}$ debe ser 2:1. Así, 0.5 mL de la muestra p4VP@Au preparada en el apartado 3.2.3 se diluye en 4.5 mL de agua y, a continuación, se le añaden 5 mL de una solución de CTAB (50 mM) y $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.250 mM) a 28 $^{\circ}$ C bajo

agitación magnética. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 4 h. Una vez finalizado este período se elimina el sobrenadante de la muestra mediante centrifugación a 7000 rpm durante 1 h. El precipitado obtenido se dispersa en 10 mL de agua. En ese momento se obtiene una dispersión coloidal de NPs huecas de p4VP. La figura 10 muestra un esquema del proceso de preparación.

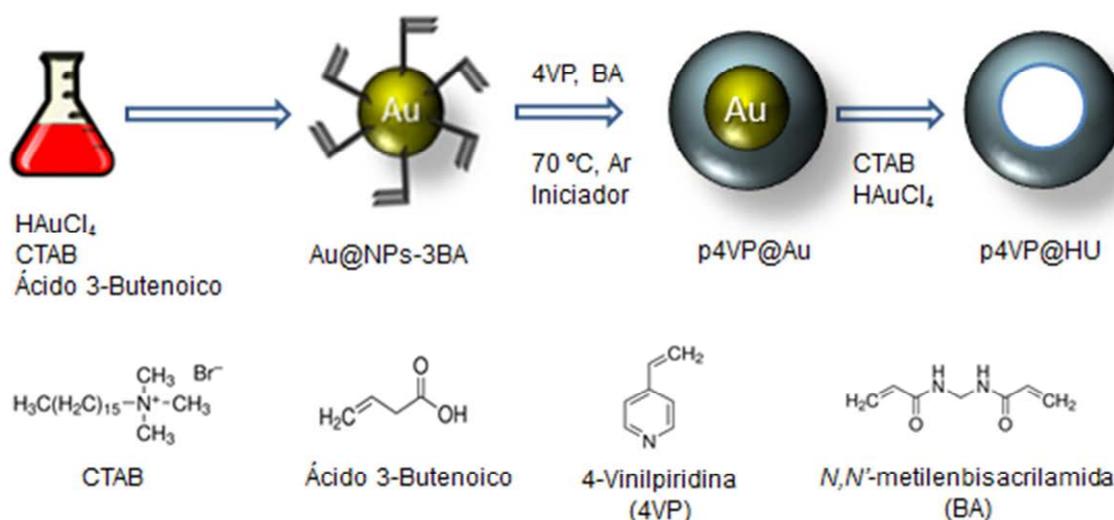


Figura 10. Representación esquemática del proceso de obtención de p4VP@HU .

3.2.5 Preparación de nanopartículas macizas de p4VP (p4VP@MZ).

El proceso de obtención de NPs macizas de p4VP (p4VP@MZ) se lleva a cabo mediante polimerización radicalaria de 4-vinilpiridina usando como agente entrecruzante N,N' - metilenbisacrilamida y como iniciador dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida). Se han preparado dos nanogeles de concentraciones 0.15 M y 0.20 M de monómero. Para ello se prepara una disolución de 4VP (165 μL , 1.53 mmol ó 220 μL , 2 mmol) en agua (10 mL) a la que se añade CTAB 5 mM (125 μL , $6.25 \cdot 10^{-4}$ mmol). Se añade además el agente entrecruzante BA (14 mg, 0.092 mmol ó 18 mg, 0.12 mmol, 6 % mol/mol

con respecto a la cantidad de monómero) y el iniciador V50 0.1 M (175 μ L, 0.0175 mmol ó 200 μ L, 0.02 mmol dependiendo de la concentración de nanogel a preparar).⁹⁰ La disolución se mantiene en el baño a 70 °C con agitación magnética y bajo una corriente de argón durante 3 h. Una vez finalizada la reacción, la muestra se deja enfriar hasta temperatura ambiente manteniendo la agitación. Por último, con el objetivo de separar monómeros y posibles oligómeros formados durante el proceso de polimerización, la mezcla se centrifuga a 7000 rpm durante 1 h. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* se redispersa en agua destilada (25 mL). Esta operación se repite hasta en cinco ocasiones para llegar a la completa purificación, dejando la muestra obtenida dispersada en 10 mL de agua (figura 11).



Figura 11. Representación esquemática del proceso de obtención de p4VP@MZ.

3.2.6 Encapsulación de fármacos en nanopartículas de p4VP.

Poli(4-vinilpiridina) es un polímero sensible a los cambios de pH y dicha característica es utilizada para llevar a cabo con efectividad el atrapado de compuestos activos.

PTX se ha encapsulado en concentraciones que van desde 0.4 mg/mL hasta 1.8 mg/mL. En un procedimiento típico, se añade PTX (0.5 mg) a una

dispersión previamente preparada de p4VP@HU en agua (3 mL, 3 mg de NPs). Tras 30 min en agitación no se observa ningún sólido blanco en la solución. A continuación, la mezcla se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 min a 20 °C. Transcurrido este tiempo, se añade una disolución de HCl (200 µL, 0.1 M), por lo que se disminuye el pH de la muestra a valores en torno a pH = 2. Como consecuencia de la protonación de los grupos amino de p4VP (pKa = 4.8) se produce una repulsión electrostática dentro de la red polimérica del microgel que hace que el tamaño aumente y en este momento se incorpora PTX a las NPs. La muestra se mantiene en agitación durante otros 30 min adicionales. A continuación, se incrementa el pH de la muestra añadiendo una disolución de NaOH (200 µL, 0.1 M) lo que provoca que se desprotonen los átomos de nitrógeno del anillo de piridina. Esto origina un colapso hidrofóbico y la red polimérica recupera su tamaño original con PTX atrapado en su interior (figura 12).⁵

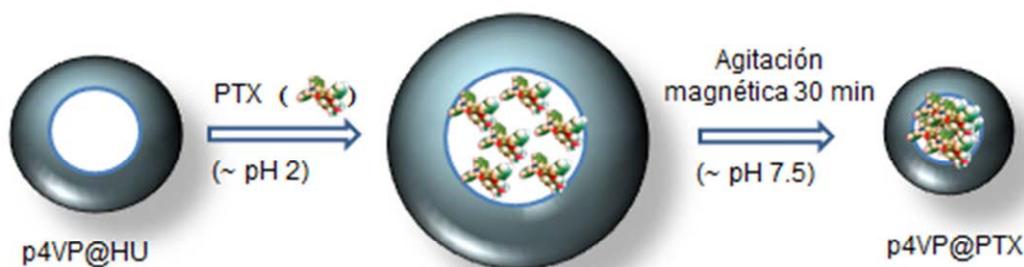


Figura 12. Esquema representativo de la encapsulación de PTX en p4VP@HU mediante la variación del pH.

Siguiendo este mismo procedimiento de atrapado del compuesto activo se ha llevado a cabo un estudio preliminar de la encapsulación de 5FU. Así, las muestras de p4VP@5FU se han preparado en concentraciones de 5FU 1 mM (3 mg 5FU en 3 mL agua).

Para el caso de DOX, una cantidad inicial de 2 mg del agente activo se ha encapsulado en muestras p4VP@Au (100 mM 4VP) preparadas de acuerdo al método explicado en el apartado 3.2.3. Se han llevado a cabo tres procedimientos de encapsulación en función del pH. En el primer método la cantidad inicial de DOX se añade a la dispersión coloidal preparada p4VP@Au (0.7 mL, 0.88 mg de NPs) a pH = 2. Tras un tiempo de reacción de 0.5 ó 12 h en agitación, la mezcla se centrifuga a 5000 rpm durante 30 min. El sólido resultante se redispersa en agua deuterada para su cuantificación. El segundo procedimiento se realiza a pH = 6 y en el tercer método una vez añadida la cantidad de DOX en el sistema híbrido a pH = 2 y dejando la reacción durante 0.5 ó 12 h, el pH se incrementa a 6 añadiendo 45 μ L de una disolución de NaOH 0.1 M. Al igual que en los casos anteriores la mezcla se centrifuga y una vez eliminado el sobrenadante, el sólido resultante se redispersa en D₂O. Los datos de atrapamiento obtenidos se detallan en la Tabla 2 del apartado 4.1.6.

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE *N*-ISOPROPILACRILAMIDA (pNIPAM).

En este apartado se describe la parte experimental de preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM (pNIPAM@MZ) y su funcionalización superficial sucesiva con ácido 3-butenoico (pNIPAM@MZ-3BA) y ácido fólico (pNIPAM@MZ-3BA-FOL), así como la encapsulación de fármacos (5FU, PTX).

3.3.1 Materiales.

Los reactivos utilizados para la preparación de pNIPAM@MZ son *N*-isopropilacrilamida (NIPAM, 97 %), *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA, ≥ 99.5 %) y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (V50, 97 %). Para las nanopartículas funcionalizadas con grupos vinílicos en su superficie se ha empleado ácido 3-butenoico (3BA, 97 %). Todos los compuestos han sido suministrados por la compañía Sigma-Aldrich. La sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil) propiónico-2,2,3,3- d_4 utilizado para la cuantificación de los ensayos de RMN fue adquirido en Eurisotop. Para la funcionalización con ácido fólico se emplea 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 99 %), 2,2'-(etilendioxi) bis(etilamina) (EDBE, 98 %) y ácido fólico (FOL, > 97 %). Asimismo, en todos los ensayos se ha utilizado agua desionizada de grado Milli-Q (Milipore).

3.3.2 Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM (pNIPAM@MZ).

El proceso de obtención de NPs macizas de pNIPAM se inicia preparando una disolución de *N*-isopropilacrilamida (169.7 mg, 1.5 mmol) en agua (10 mL), la cual se calienta a 70 °C y se mantiene con agitación magnética suave y bajo una corriente de argón. A continuación, se añade el agente entrecruzante BA

(23.12 mg, 10 % mol/mol respecto a la cantidad de monómero). Al cabo de 15 min se añade el iniciador V50 0.1 M (150 μ L, 0.015 mmol). La disolución se vuelve turbia pasados 10 min. Se mantiene la reacción en agitación durante 3 h a 70 °C. Pasado este tiempo, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente manteniendo la agitación. Por último, la mezcla se centrifuga a 7000 rpm durante 1 h. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* se redispersa en agua destilada (25 mL). Esta operación se repite hasta en cinco ocasiones para llegar a la completa purificación, dejando la muestra obtenida dispersada en 10 mL de agua (figura 13). La muestra se almacena protegida de la luz solar.



Figura 13. Proceso de obtención de NPs macizas de pNIPAM.

El análisis de la morfología de las nanopartículas obtenidas se lleva a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello se deposita una gota de muestra ($\sim 10 \mu$ L) en una rejilla de cobre y se deja secar a temperatura ambiente.

3.3.3 Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM funcionalizado con ácido 3-butenoico (pNIPAM@MZ-3BA).

El proceso de obtención de NPs de pNIPAM@MZ-3BA se inicia preparando una disolución acuosa de *N*-isopropilacrilamida (169.7 mg en 10 mL de agua) a 70 °C con agitación magnética suave y bajo una corriente de argón. Sobre ella se añade *N,N'*-metilenbisacrilamida (23.12 mg en relación 10 % mol/mol con respecto a la cantidad de monómero). Al cabo de 15 min se añade el iniciador V50 0.1 M (150 µL, 0.015 mmol). Con el objetivo de introducir grupos carboxílicos en la superficie de los microgeles de pNIPAM, a los 5 min de reacción se añade ácido 3-butenoico (11 µL, 0.013 mmol). La solución se muestra turbia pasados 10 min. Se mantiene la reacción en agitación durante 3 h a 70 °C. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente manteniendo la agitación. Por último, se centrifuga a 7000 rpm durante 1 h siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para pNIPAM@MZ.

3.3.4 Preparación de nanopartículas macizas de pNIPAM funcionalizado con ácido fólico (pNIPAM@MZ-3BA-FOL).

A partir de una disolución de NPs de pNIPAM@MZ-3BA 0.0129 M (5 mL) se añade en exceso, relación 1:1.5, 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (0.0185 g, 0.0965 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (0.0112 g, 0.0973 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo se añade la diamina 2,2'-(etilendioxo) bis(etilamina) (EDBE) (10 µL, 0.0645 mmol), manteniéndose la reacción durante 6 h más a temperatura ambiente.⁹¹

Por otro lado, sobre una disolución de ácido fólico 0.0193 M (5 mL, 0.096 mmol) se añade EDC (0.0278 g, 0.145 mmol) y NHS (0.0167 g, 0.145 mmol). Se mantiene la reacción durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo, se añade esta disolución a la disolución de nanopartículas de pNIPAM@MZ-3BA funcionalizadas con la diamina, y se deja reaccionar durante 6 h más. Por último, la dispersión se centrifuga a 7000 rpm durante 1 h. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* se redispersa en agua destilada (25 mL). Esta operación se repite hasta en tres ocasiones para llegar a la completa purificación, dejando la muestra obtenida dispersada en 10 mL de agua.

3.3.5 Encapsulación de fármacos en nanopartículas de pNIPAM.

La encapsulación de fármacos en nanopartículas de pNIPAM se lleva a cabo teniendo en cuenta que, como se ha mencionado anteriormente, el pNIPAM es un polímero sensible a los cambios de temperatura. Así, 5-Fluorouracilo (desde 1.2 g hasta 5.4 g) se añade a una dispersión coloidal de NPs de pNIPAM en agua (3 mL, 3.0 mg de nanopartículas). Se ha llevado a cabo el proceso de encapsulación en concentraciones que van desde 0.4 mg/mL hasta 1.8 mg/mL. En todos los casos la mezcla se somete a ultrasonidos durante 5 min a 40 °C. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar a 20 °C y se centrifuga a 5000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se decanta y liofiliza. El sólido blanco obtenido se utiliza para la caracterización morfológica y química.

En el caso de PTX se procede de igual forma, preparando muestras en concentraciones que van desde 0.4 a 1.8 mg por cada mL de dispersiones coloidales 1 mM de NPs de pNIPAM@MZ o pNIPAM@MZ-3BA-FOL resultando

visible la no encapsulación del compuesto activo al encontrarse un precipitado blanco en el fondo de la muestra.

3.4 NANOPARTÍCULAS CON NÚCLEO DE MAGNETITA (Fe₃O₄).

3.4.1 Materiales.

Para la preparación de los sistemas de NPs con núcleo de magnetita inicialmente se han utilizado Fe₃O₄@NPs preparadas mediante el método de descomposición térmica con ácido decanoico.⁹² Además, se ha utilizado ácido 3-butenoico (97 %) para funcionalizar la superficie de óxido de hierro con grupos vinílicos, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, ≥ 98.0 %) como agente estabilizador, 4-vinilpiridina (4VP, 95 %) y *N*-isopropilacrilamida (NIPAM, 97 %) utilizados como monómeros para el recubrimiento polimérico, *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA, ≥ 99.5 %) como agente entrecruzante y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (V50, 97 %) como iniciador del proceso de polimerización radicalaria. Para la funcionalización con ácido fólico se ha empleado 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 99 %), 2,2'-(etilendioxi) bis(etilamina) (EDBE, 98 %) y ácido fólico (FOL, > 97 %). Asimismo, en todos los ensayos se ha utilizado agua desionizada de grado Milli-Q (Milipore).

3.4.2 Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de microgel: p4VP@Fe₃O₄ y pNIPAM@Fe₃O₄.

El proceso de preparación de nanopartículas poliméricas con núcleo magnético de óxido de hierro se realiza a partir de una disolución de Fe₃O₄@NPs (350 μL, 3.7 % en peso) en agua (10 mL). Esta disolución se sonica durante 15 min y, a continuación, se calienta a 70 °C y se añade 80 μL de ácido 3-butenoico. La disolución se mantiene durante 1 h a esa temperatura. Una vez transcurrido ese tiempo, se añade CTAB 0.2 M (200 μL, 0.04 mmol) a la muestra y se

centrifuga a 4000 rpm durante 30 min. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante, se dispersa en 10 mL de agua y se somete de nuevo a ultrasonidos durante 15 min.

En ese momento los núcleos magnéticos ya están funcionalizados para proceder a la polimerización radicalaria con 4VP o NIPAM, la cual se inicia con la disolución anterior.

Para la preparación de pNIPAM@Fe₃O₄ se añade *N*-isopropilacrilamida (0.2264 g, 2 mmol) y *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.0312 g, 0.2 mmol) a la disolución inicial de Fe₃O₄@NPs funcionalizadas con 3BA (10 mL). Al cabo de 15 min, se añade el iniciador V50 0.1 M (100 µL, 0.01 mmol). La disolución se muestra turbia pasados 10 min. Se mantiene la reacción en agitación durante 3 h a 70 °C. Pasado este tiempo, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente manteniendo la agitación. Por último, con el objetivo de separar el sobrenadante de la reacción, el vial se deja sobre un imán de neodimio de 1.2 T durante 24 h. Transcurrido ese tiempo el sobrenadante se descarta y el precipitado que aparece en el fondo del vial se dispersa en 10 mL de agua.

Para el caso de la preparación de p4VP@Fe₃O₄ el proceso es similar al anterior teniendo en cuenta que se añade 4-vinilpiridina (323 µL, 3 mmol), *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.027 g, 0.175 mmol) e iniciador V50 0.1 M (300 µL, 0.03 mmol).

3.4.3 Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de pNIPAM funcionalizado con ácido 3-butenoico (pNIPAM@Fe₃O₄-3BA).

El proceso de preparación de este tipo de nanopartículas se inicia con la funcionalización de la superficie de la magnetita con un doble enlace, como se ha comentado en el apartado anterior. A continuación se añade *N*-isopropilacrilamida (0.2264 g, 2 mmol) y *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.0312 g, 0.20 mmol) a la disolución inicial de Fe₃O₄@NPs funcionalizadas (10 mL). Al cabo de 15 min se añade el iniciador V50 0.1 M (100 μL, 0.01 mmol). Transcurridos otros 5 min se añade ácido 3-butenoico (15 μL, 0.178 mmol). La reacción se lleva a cabo a 70 °C con agitación magnética y bajo una corriente de argón. La dispersión se muestra turbia pasados 10 min. La reacción se mantiene durante 3 h. Una vez pasado este tiempo, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente, manteniendo la agitación. Por último, con el objetivo de separar el sobrenadante de la reacción, el vial se deja sobre un imán de neodimio de 1.2 T durante 24 h. Transcurrido ese tiempo el sobrenadante se descarta y el precipitado que aparece en el fondo del vial se dispersa en 10 mL de agua.

3.4.4 Preparación de nanopartículas magnéticas recubiertas de pNIPAM funcionalizado con ácido fólico (pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL).

En primer lugar, se prepara una disolución de nanopartículas magnéticas recubiertas de pNIPAM funcionalizado con ácido 3-butenoico (pNIPAM@Fe₃O₄-3BA, apartado 3.4.3), y sobre esta disolución 0.0176 M (5 ml) se añade EDC (0.025 g, 0.161 mmol) y NHS (0.015 g, 0.13 mmol), manteniéndose la mezcla con agitación y a temperatura ambiente durante 30

min. Transcurrido ese tiempo, se añade EDBE (12 μ L, 0.082 mmol) manteniéndose la mezcla de reacción durante 6 h más a temperatura ambiente.

En segundo lugar, sobre una disolución de ácido fólico 0.0088 M (5 mL, 0.044 mmol) se añade EDC (0.0168 g, 0.087 mmol) y NHS (0.010 g, 0.087 mmol). Se mantiene la reacción durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo, se añade esta disolución a la disolución de nanopartículas de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA funcionalizadas con la diamina, y se deja reaccionar durante 6 h más. Por último, la dispersión se centrifuga a 7000 rpm durante 1 h. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* se redispersa en agua destilada (25 mL). Esta operación se repite hasta en tres ocasiones para llegar a la completa purificación, dejando la muestra obtenida de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL dispersada en 10 mL de agua.

3.4.5 Encapsulación de 5-Fluorouracilo en nanopartículas poliméricas con núcleo de magnetita.

La encapsulación de este agente activo se ha llevado a cabo teniendo en cuenta las características físico-químicas de ambos polímeros, ya que éstos son capaces de responder a determinados estímulos externos como la variación del pH y de la temperatura. Así, para, 5-Fluorouracilo (desde 1.2 g hasta 5.4 g) se añade a una dispersión coloidal de NPs de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL en agua (3 mL, 3.0 mg de nanopartículas). Se ha encapsulado en concentraciones que van desde 0.4 mg/mL hasta 1.8 mg/mL. La mezcla resultante se sonica durante 5 min a 40 °C. Pasado este tiempo, la muestra se deja enfriar a 20 °C y se centrifuga a 5000 rpm durante 15 min. La fase acuosa

se decanta y liofiliza. El sólido blanco obtenido se utiliza para la caracterización morfológica y química.

Para incluir 5FU en muestras de p4VP@Fe₃O₄ se sigue el procedimiento detallado en el apartado 3.2.6 de este documento para PTX en p4VP@NPs.

3.5 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag@NPs). INCLUSIÓN EN MEMBRANAS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

3.5.1 Materiales.

Se ha utilizado en este estudio una membrana de celulosa regenerada, la cual es muy hidrofílica. La membrana presenta un contenido de celulosa regenerada de 0.06 kg/m² y fue adquirida a la empresa La Cellophane Española, S.A. (Burgos). Las muestras originales de membrana se denominarán RC/6, mientras que las muestras que se modifican por inclusión de nanopartículas de plata (Ag@NPs) se denominan RC/6-Ag@NPs.

Por otro lado, para la preparación de nanopartículas de plata, Ag@NPs, los reactivos empleados son nitrato de plata (99 %), citrato sódico (98 %), permanganato potásico (99 %) e hidróxido potásico (90 %), y todos ellos adquiridos en la casa comercial Aldrich. Asimismo, en todos los ensayos se ha empleado agua desionizada de grado Milli-Q (Milipore).

El medio de cultivo que se utiliza en el estudio de la actividad antibacteriana es el denominado Luria-Bertani (LB), adquirido en Aldrich. Este medio contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de levadura y 5 g/L de cloruro de sodio. La línea celular de *Escherichia coli* DH5- α fue suministrada por el Departamento de Microbiología (Universidad de Málaga).

3.5.2 Preparación de nanopartículas de plata, inclusión en la membrana RC/6 y análisis de su resistencia a la oxidación.

El proceso de preparación de Ag@NPs se ha llevado a cabo siguiendo el método de citrato de sodio.⁸⁸ Este procedimiento consiste en calentar a 100 °C una disolución acuosa de nitrato de plata 0.5 M (50 mL) a pH = 5.5 y con agitación magnética. Una vez alcanzado el punto de ebullición, se añade 1.1 mL de disolución de citrato de sodio (de concentración 1 g en 50 mL de agua). Se mantiene la reacción durante 5 min. Transcurrido este tiempo la disolución se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

La inclusión de las Ag@NPs en las muestras de membrana RC/6 se ha realizado por inmersión dando lugar a la muestra RC/6-Ag@NPs. Así, una porción de membrana de 2 x 6 cm se introduce en la dispersión coloidal (51.1 mL) de Ag@NPs manteniéndose en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las membranas se dejan escurrir para eliminar el exceso de disolución y se lavan con agua. En este momento las muestras RC/6-Ag@NPs están preparadas para ser analizadas. Debido a que una de las propiedades a medir es la resistencia a la oxidación varias porciones de las muestras RC/6 y RC/6-Ag@NPs se sumergen durante 1 min en una disolución acuosa de KMnO₄ (5 %, pH = 7.5) en agitación magnética. Pasado este tiempo, las membranas se sacan de la disolución, lavándose ambas superficies con abundante agua y se dejan secar en un desecador.

3.5.3 Ensayo de la actividad antimicrobiana.

Para llevar a cabo el ensayo de la actividad microbiana las cepas de *Escherichia coli* DH5- α se precultivan en el medio LB a 37 °C durante 18 h hasta alcanzar una concentración de alrededor de 10^8 CFU/mL (unidad de formación de colonia/mL). En ese momento 1 mL de la mezcla se añade al medio LB sólido donde se llevan a cabo los ensayos. Las muestras de las membranas RC/6 y RC/6-Ag@NPs son cortadas en cuadrados de 1 x 1.2 cm, aproximadamente, y esterilizadas en un autoclave. La muestra control y las muestras analizadas son colocadas en los cultivos de *E. coli* (1 mL de 10^8 CFU/mL) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Estos ensayos se repiten hasta en 4 ocasiones.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 NANOPARTÍCULAS DE p4VP.

4.1.1 Antecedentes.

Los sistemas híbridos de nanopartículas formados por un núcleo metálico recubierto de una capa de polímero sensible a estímulos, constituyen un área de investigación de gran importancia en la química-física coloidal.⁹³ Dichos sistemas pueden mostrar propiedades ópticas y espectroscópicas novedosas, las cuales son proporcionadas por el núcleo metálico, y además, mejores características de estabilidad y capacidad de atrapamiento de moléculas, aportadas por el recubrimiento polimérico.⁹⁴

Desde hace unos años estos sistemas son de elevado interés por sus múltiples aplicaciones en diversas áreas como medicina, industria, biología, e incluso, la conservación del medio ambiente.⁹⁵ La razón principal radica en que estos nanogeles son sensibles a estímulos externos, como la temperatura, el pH, la radiación lumínica, la naturaleza del disolvente, la fuerza iónica o los campos eléctricos y magnéticos.⁹⁶ Además, dichos materiales muestran un buen comportamiento en fase, ya que al ajustar varios parámetros como la interacción entre partículas, la concentración, la rigidez o la geometría, es posible obtener estados de vidrio o de gel.⁹⁷ Por ejemplo, nanopartículas de Au recubiertas de materiales inorgánicos como el SiO₂, o de microgeles y nanogeles sensibles a la naturaleza del disolvente, como poliestireno, o de polímeros que responden a variaciones de pH como poli(4-vinilpiridina), entre otros, han sido publicados en los últimos años. Existe además, una gran variedad de polímeros biocompatibles que se utilizan para el recubrimiento de partículas metálicas, como son polietilenglicol (PEG), poli-ε-caprolactona (PCL),

ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) o polimetacrilato (PMA), entre otros muchos.³⁴ Estos sistemas tienen como aplicación principal el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Para esta aplicación, adquiere especial importancia, además, que estos polímeros sean biodegradables, que no presenten toxicidad en el paciente y que puedan ser eliminados de forma natural.

En algunos estudios se han sintetizado NPs fluorescentes de p4VP, con potencial aplicación en el diagnóstico por imagen, y en el tratamiento mediante terapia fotodinámica del cáncer, comprobándose su biocompatibilidad y su capacidad para ser internalizadas por células de cáncer cérvico-uterino humanas.⁹⁸ Otra de las aplicaciones de este polímero se debe a su capacidad antibacteriana, ya que estas NPs son capaces de actuar debido a la interacción de la carga positiva del polímero con la carga negativa de la pared bacteriana, desestabilizando la misma y provocando la muerte celular.⁹⁹ La preparación de NPs con núcleo metálico se puede llevar a cabo atendiendo a métodos físicos y métodos químicos.¹⁰⁰ Los *métodos físicos* están basados en la subdivisión de partículas grandes de metales, mediante trituración mecánica, pulverización de metales a granel y descarga de arco entre electrodos metálicos.¹⁰¹ Las NPs producidas por estos métodos suelen ser de tamaño micrométrico además de presentar una alta polidispersidad. Los *métodos químicos*, por otro lado, se basan en la reducción de iones metálicos o la descomposición de los precursores para formar átomos metálicos neutros, seguido por la agregación de éstos hasta conseguir la semilla, cuyo posterior crecimiento dará lugar a las NPs metálicas (figura 14). Las nanopartículas preparadas por estos métodos tienen, por lo general, una distribución pequeña de tamaños, y su tamaño y

morfología final puede ser controlada de manera precisa. Los reductores químicos utilizados son hidrógeno, alcoholes, hidracina, NaBH_4 , LiAlH_4 o el anión citrato.¹⁰² La energía necesaria para la reducción puede ser proporcionada en forma de electricidad, calor, luz o energía sonoquímica.

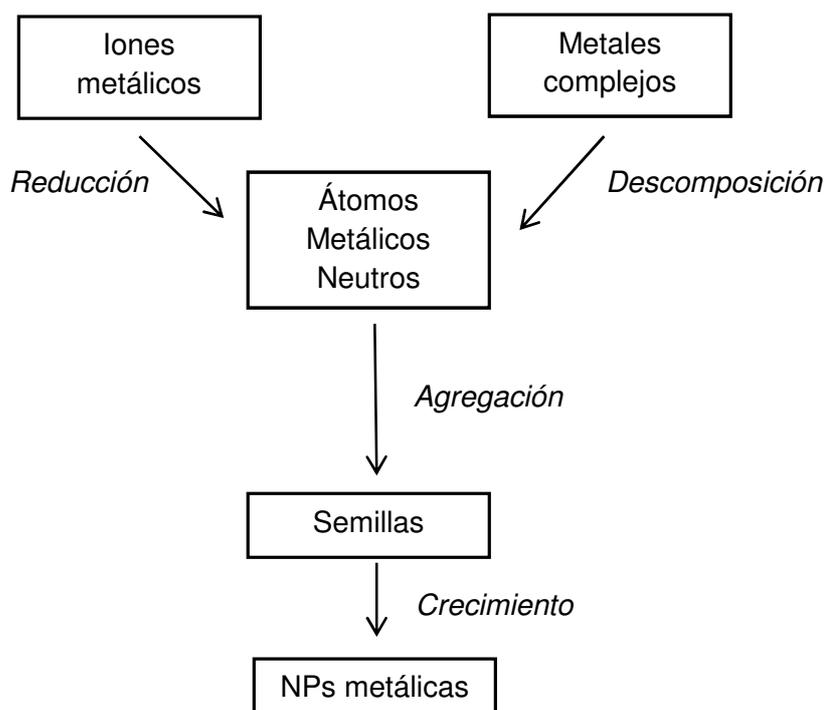


Figura 14. Esquema de preparación de nanopartículas metálicas por métodos químicos.

Asimismo, es necesario hacer uso de agentes o métodos de estabilización, manteniendo la dispersión coloidal estable durante el proceso de preparación. En una dispersión coloidal de metales, las cargas eléctricas pueden ser usadas como estabilizantes, siendo la repulsión eléctrica entre las partículas del metal lo que impide la agregación de las mismas. Estas cargas eléctricas son debidas a los aniones absorbidos sobre la superficie del metal. Otro método para estabilizar dispersiones de partículas metálicas es la repulsión estérica entre los agentes estabilizadores absorbidos sobre las partículas. Éstos pueden ser

polímeros solubles en agua o moléculas pequeñas que se unen fuertemente a la superficie de las partículas metálicas como ligandos del metal.

En general, los métodos químicos implican la reducción de una disolución acuosa de una sal metálica que puede formar una partícula o clúster de partículas en la primera etapa de nucleación y conducir al proceso de crecimiento. La concentración y tipo de reactivos, la temperatura y el pH tienen una gran influencia en la cinética de la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas, y por lo tanto, en el control del tamaño y la morfología de la partícula.¹⁰³

Las NPs de oro se han preparado reduciendo el oro (III) del ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4) con citrato de sodio (el cual también actúa como un agente estabilizante coloidal) en disolución acuosa. El proceso se lleva a cabo mediante el mecanismo de nucleación y crecimiento, y estas partículas se utilizan como semilla hasta alcanzar un tamaño determinado.²⁵ Posteriormente se ha llevado a cabo un proceso denominado por semilla. Este método permite obtener Au@NPs esféricas en disolución acuosa en un amplio rango de tamaños.¹⁰⁴ En esta etapa de crecimiento, se pueden utilizar reductores más débiles, como por ejemplo, ácido salicílico¹⁰⁵ o ácido 3-butenoico.^{25,94} Este último permite, además, funcionalizar la partícula en la superficie metálica con un doble enlace terminal, pudiéndose llevar a cabo simultáneamente a la reducción, reacciones de polimerización,¹⁰⁶ y con ello el recubrimiento de la nanopartícula metálica con material polimérico.

El interés de preparar sistemas metálicos recubiertos de polímeros reside en la capacidad que presentan para encapsular un amplio rango de moléculas, como polisacáridos, enzimas, ácidos nucleicos o fármacos. Además, admiten un

porcentaje elevado de agente activo en su interior, lo que resulta de especial utilidad para compuestos poco solubles.⁴¹ Además, existen varios estudios sobre el proceso de polimerización para el recubrimiento de núcleos metálicos, de sílice (SiO₂) o de polímeros, y su posterior eliminación mediante oxidación para la fabricación de sistemas coloidales huecos con el fin de encapsular el mayor número posible de fármacos.¹⁰⁷ De hecho, la mayoría de las líneas de investigación han ido encaminadas a la obtención de sistemas poliméricos que sean capaces de dirigir y liberar uno de los agentes activos más insolubles, Paclitaxel. Por ello, se ha llevado a cabo estudios de NPs con respuestas a campos magnéticos, variaciones de temperatura o variaciones de pH.¹⁰⁸ Es importante indicar que no hay muchos procedimientos publicados para la encapsulación de nanopartículas metálicas con un microgel de p4VP. Recientemente, Nabid et al. utilizaron microgeles de p4VP como semillas para la incorporación de nanopartículas de níquel (Ni@NPs), pero sólo aplicaron este sistema en la reducción catalítica de nitrilos alifáticos y aromáticos.¹⁰⁹ Dai et al. sintetizaron un sistema de tipo corteza@núcleo (core@shell) formado por puntos cuánticos (quantum dots, QD) CdTe como núcleos recubiertos con p4VP para una posible aplicación como biosensor de ADN. Desafortunadamente, este trabajo sólo incluyó la síntesis y la caracterización de los sistemas híbridos mencionados.¹¹⁰

4.1.2 Resultados obtenidos en la preparación de p4VP@Au.

En esta Tesis Doctoral, el método usado para la síntesis de nanopartículas metálicas de oro (Au@NPs) ha sido el método de reducción química de la sal de oro mediante un agente reductor y su posterior crecimiento mediante el método mediado por semilla.⁸⁸ A partir de éstas, se ha fabricado sistemas de NPs recubiertas de polímero p4VP, preparado a partir de 4-vinilpiridina (4VP). Este polímero reúne buenas características ya que es biocompatible, biodegradable, presenta baja toxicidad para el paciente y se excreta de forma natural. Además, es un polímero sensible a las variaciones de pH.⁹⁶ Esta última propiedad es de especial interés, ya que puede aprovecharse para alcanzar un atrapado más efectivo de moléculas y controlar asimismo su liberación posterior.⁵

Por un lado, se ha utilizado como recubrimiento de núcleos metálicos de oro, obteniéndose sistemas híbridos de p4VP@Au y, por otro lado, se han preparado microgeles de este polímero sin núcleo metálico, tanto los formados por nanopartículas huecas (p4VP@HU) como por macizas (p4VP@MZ). De esta forma se han podido comparar los resultados obtenidos al encapsular distintos fármacos en NPs de p4VP huecas y macizas.

El proceso de preparación de nanopartículas poliméricas con núcleo metálico de oro se inicia a partir de una disolución de NPs de este metal de tamaño aproximado de 50 nm, preparadas a partir del mecanismo de crecimiento mediado por semilla. A continuación, se utiliza ácido 3-butenoico con el fin de funcionalizar la superficie metálica con dobles enlaces terminales. Aunque este ácido puede ser utilizado como agente reductor, puede además funcionalizar a las NPs con un grupo vinílico, siendo necesario para una posterior

polimerización por radicales libres.²⁵ La preparación de nanopartículas de p4VP@Au se ha realizado de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.2.3 de este documento.

Los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran imágenes de partículas de p4VP@Au formadas a partir de núcleos esféricos de oro de 50 nm de diámetro encapsulados por un recubrimiento de microgel de p4VP. Puede observarse que además de la estructura corteza@núcleo no hay agregación de partículas de oro dentro de los microgeles de p4VP. La diferencia de densidad entre el núcleo metálico y la corteza orgánica permite la observación de la morfología de ambas partes. El tamaño de las NPs de p4VP@Au se obtuvo midiendo 100 partículas mediante el programa ImageJ, resultando un tamaño medio de 125.8 ± 3.2 nm. En la figura 15 se incluye una imagen representativa de este sistema.

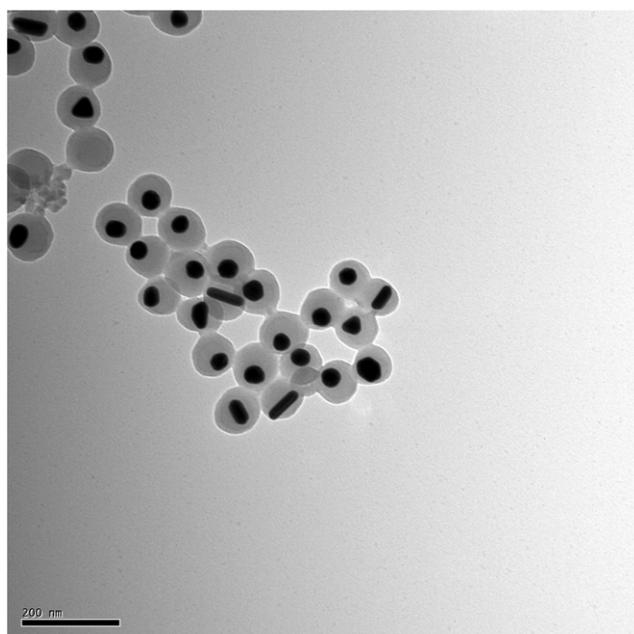


Figura 15. Imagen TEM de p4VP@Au.

4.1.2.1 Influencia del pH, de la concentración de monómero y de agente entrecruzante en las propiedades de los sistemas p4VP@Au.

Como se ha indicado, la característica principal de los nanogeles de p4VP es la respuesta a la variación del pH del medio.⁹⁶ Por tanto, las partículas de p4VP@Au también muestran una respuesta de hinchamiento-deshinchamiento en función del pH, que depende, además, de la densidad de agente entrecruzante dentro del polímero. Este comportamiento se debe a la naturaleza básica del nitrógeno piridínico y a la naturaleza hidrófoba de los grupos vinilo.⁹⁶ Una ligera variación del pH puede modificar la carga de la red polimérica e inducir diferentes configuraciones con respecto a los estados poliméricos hinchados o colapsados. Por debajo de su transición de fase, a un pH de 4.8, los grupos piridínicos se encuentran protonados y, en consecuencia, la contribución electrostática repulsiva induce el hinchamiento de la estructura del polímero. Por encima de dicho pH, los grupos piridínicos se encuentran en estado desprotonado y la naturaleza hidrofóbica atractiva de los grupos vinilo da como resultado un colapso del polímero.

Como se ha comentado anteriormente, en medios acuosos, esta partícula coloidal sensible al pH se prepara normalmente mediante polimerización por radicales libres, usando como monómero 4-vinilpiridina en presencia de un agente entrecruzante (*N,N'*-metilenbisacrilamida, divinilbenceno o etilenglicoldimetacrilato) y usando dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida), persulfato de amonio o potasio como agentes iniciadores de radicales libres.¹⁶ Como ejemplo, Li et al. sintetizaron nanocompuestos de tipo p4VP@Au a través de polimerización radicalaria de transferencia de átomos iniciada en superficie (SI-ATRP).¹¹¹ Sin embargo, no fueron capaces de



controlar el grosor de la capa de polímero alrededor del núcleo de Au, lo que es crucial para aumentar la eficiencia en la captura de fármacos y con fines de detección.

Utilizando tanto técnicas estáticas como dinámicas se ha indicado que, por debajo del pH crítico de 4.8, el recubrimiento polimérico muestra una estructura abierta similar a una estrella, mientras que por encima de dicho punto crítico, la cubierta polimérica permanece en un estado colapsado. Es importante remarcar que recientemente, se ha demostrado que los microgeles de 4VP puros son sistemas adecuados para aplicaciones biocompatibles.⁵ Por lo tanto, la estructura corteza@núcleo de p4VP@Au también es biocompatible, ya que la adición de un núcleo de Au no revierte tales propiedades.

En esta Tesis se ha estudiado el efecto de diferentes cantidades de monómero y agente entrecruzante en el proceso de polimerización, preparando con ello p4VP@Au de distintos tamaños y capacidades de hinchamiento de forma controlada.

El método de preparación de sistemas p4VP@Au se ha descrito en el apartado 3.2.3 de este documento. El comportamiento en función del pH de las partículas de p4VP@Au se ha estudiado mediante medidas de DLS, ZP y análisis cryo-TEM, las cuales se han llevado a cabo a valores de pH por encima y por debajo de la transición de fase del polímero. Además, se han caracterizado las propiedades estáticas de las NPs a través de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS).

Para obtener estos nanocompuestos híbridos con diferentes espesores de polímero, se han preparado tres sistemas cada uno con diferente cantidad de monómero 4VP y manteniendo constante la cantidad de agente entrecruzante

al 6 % mol/mol. De esta forma, las muestras preparadas y sus concentraciones de monómero 4VP, han sido: p4VP@Au-1 (150 mM 4VP), p4VP@Au-2 (100 mM 4VP) y p4VP@Au-3 (75 mM 4VP).

Por otro lado, con el fin de obtener sistemas híbridos con diferentes capacidades de hinchamiento, la polimerización de 4VP también se realizó usando una cantidad fija de 4VP (100 mM) pero con 3 % y 1 % mol/mol de agente entrecruzante (BA). Estas muestras se denominaron p4VP@Au-4 y p4VP@Au-5. El esquema de esta síntesis se muestra en la figura 16.

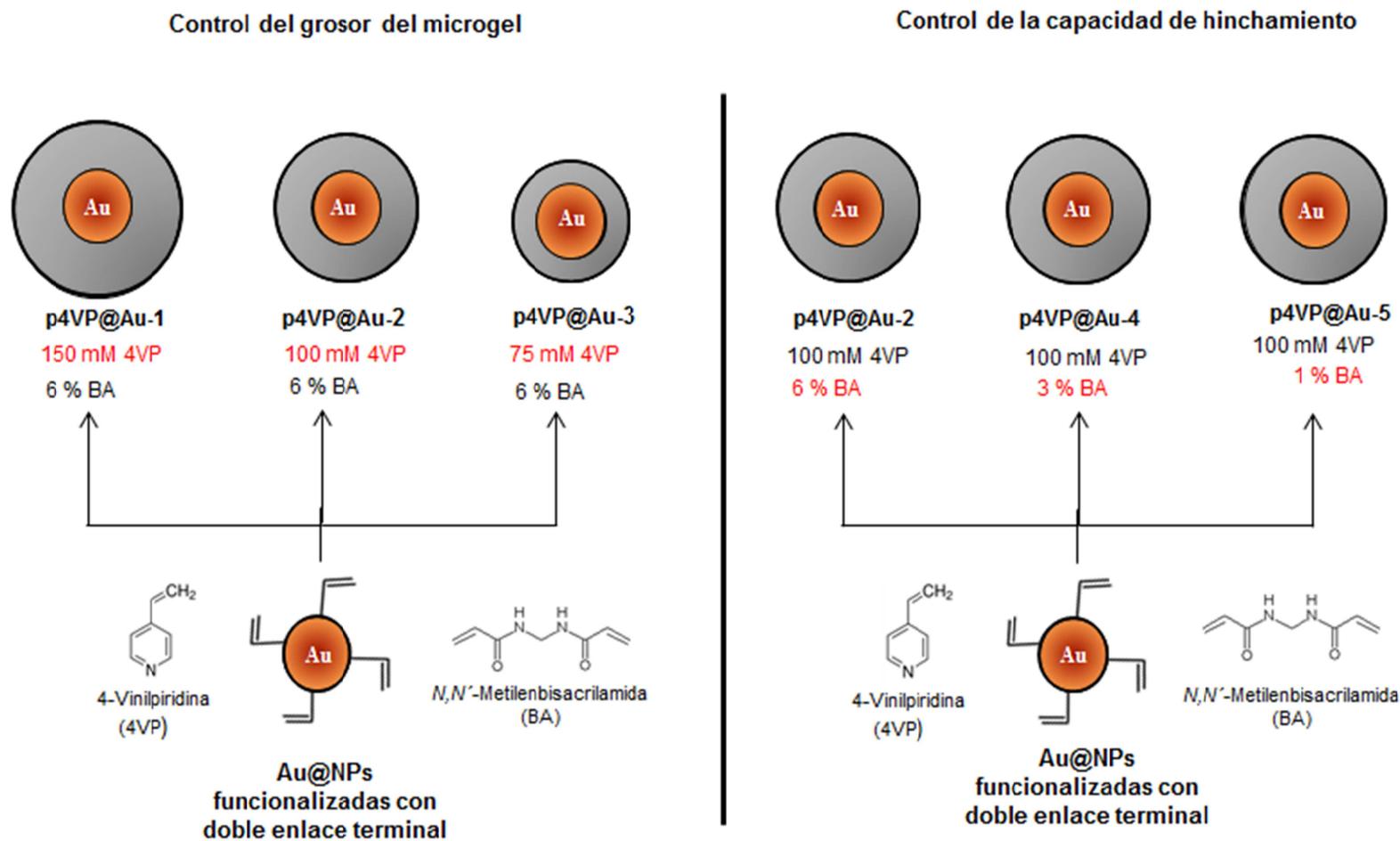


Figura 16. Esquema de la síntesis de sistemas p4VP@Au con distintas cantidades de monómero (izquierda) y de agente entrecruzante (derecha).

Las medidas del diámetro hidrodinámico (D_h) y de la carga superficial se realizaron con las técnicas DLS y Potencial Zeta, ajustando de forma automática los tiempos de acumulación para cada muestra según los valores de pH seleccionados, los cuales se ajustan mediante la adición de HCl o NaOH, 0.1 M.

Las imágenes TEM se han obtenido depositando 10 μ L de cada dispersión coloidal sobre rejillas de cobre de 100 mallas, dejándolas secar a temperatura ambiente. Las medidas de cryo-TEM se han llevado a cabo con muestras vitrificadas. Éstas se mantienen en nitrógeno líquido hasta que se introducen en el microscopio. En los experimentos de SERS se excita la muestra con una línea láser de 785 nm.

Por último, los datos SAXS se han realizado sobre muestras a pH = 2 y a pH = 7, ambas con una concentración de partículas de 0.1 mg/mL.

Las imágenes TEM de las distintas muestras preparadas a partir de cantidades distintas de monómero, p4VP@Au-1, p4VP@Au-2 y p4VP@Au-3, muestran núcleos esféricos de Au encapsulados con un recubrimiento de p4VP, como puede observarse en la figura 17.

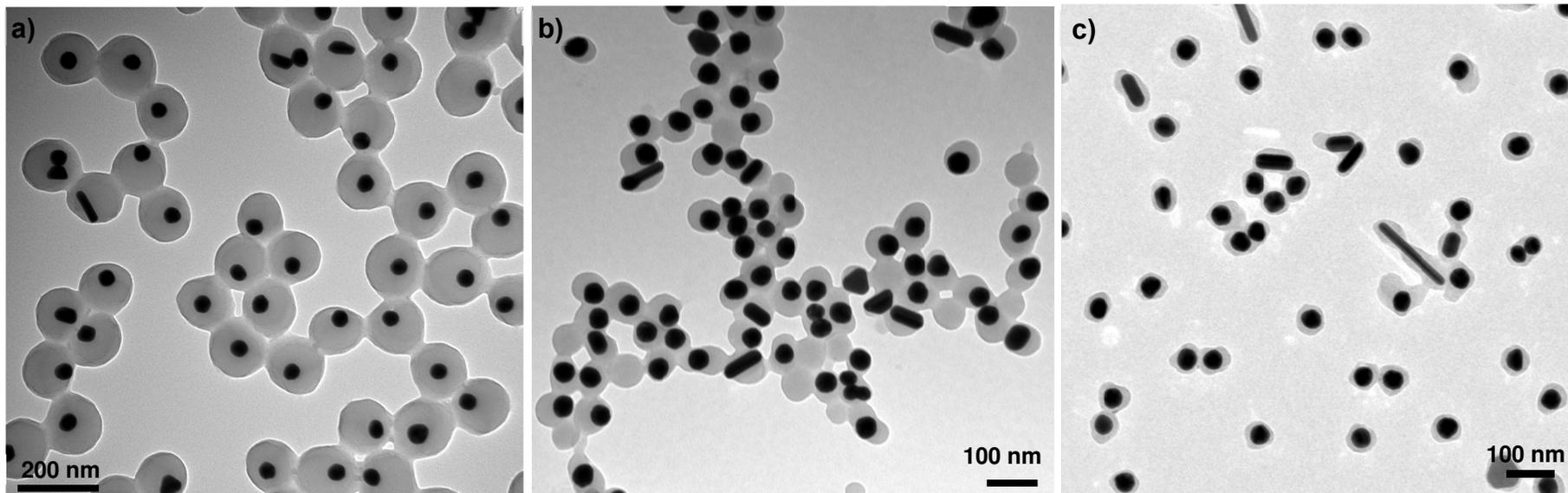


Figura 17. Imágenes TEM de nanopartículas p4VP@Au para a) p4VP@Au-1 (150 mM 4VP), b) p4VP@Au-2 (100 mM 4VP) y c) p4VP@Au-3 (75 mM 4VP).

Asimismo, y como era de esperar, cada una de las partículas presenta un espesor de recubrimiento distinto en función de la concentración de monómero. El tamaño final de las partículas se ha obtenido mediante el análisis de las imágenes de microscopía, midiendo 100 partículas en cada caso (figura 18). El tamaño medio medido y su desviación estándar fue de 153.0 ± 4.9 nm para el sistema p4VP@Au-1 (150 mM 4VP), 89.8 ± 4.1 nm para el sistema p4VP@Au-2 (100 mM 4VP) y 69.8 ± 3.4 nm para el sistema p4VP@Au-3 (75 mM 4VP). Como puede observarse, un aumento en la concentración de monómero durante el proceso de polimerización, da como resultado un incremento del espesor de la capa de polímero. Este grosor de polímero que rodea a la nanopartícula esférica de oro se calculó en cada caso como la mitad de la diferencia entre el diámetro total de las partículas p4VP@Au (medidas en imágenes TEM) y el diámetro del núcleo de oro (tamaño del recubrimiento = $[\text{diámetro de partícula (nm)} - 50] / 2$).

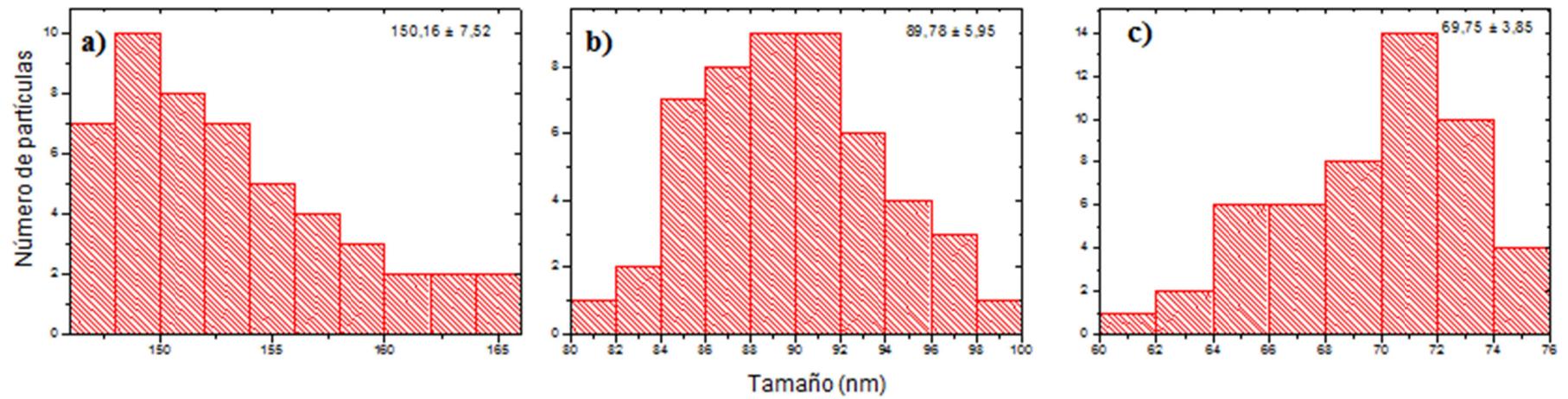


Figura 18. Análisis dimensional para nanopartículas de p4VP@Au para tres concentraciones distintas de monómero a) 150 mM, b) 100 mM y c) 75 mM.

En la Tabla 1 se recogen los datos correspondientes a la cantidad de 4VP utilizada durante la etapa de polimerización, el porcentaje de agente entrecruzante, el diámetro del núcleo de Au, el tamaño de p4VP@Au y el grosor de polímero resultante. Como se observa, cuando la concentración de monómero utilizado es de 150 mM, el grosor medio de la envoltura alrededor del núcleo de Au es cercano a 52 nm. En el caso en el que la concentración de monómero se reduce a 100 mM, el grosor de capa disminuye hasta alrededor de 20 nm, mientras que para las nanopartículas sintetizadas con una concentración de monómero de 75 mM, el grosor del polímero se reduce a sólo 10 nm. La disminución en el espesor del recubrimiento polimérico en función de la concentración de monómero podría indicar que una vez iniciada la polimerización, los núcleos metálicos actúan como semillas para la polimerización, produciéndose una capa que crece hasta agotar las moléculas de monómero en la disolución.¹¹² Como resultado, el crecimiento de la capa de polímero se ve fuertemente afectado por la concentración de monómero, siendo esta dependencia una forma simple y fácil de controlar el tamaño final del microgel.

Tabla 1: Datos referidos a la cantidad de 4VP utilizada durante la etapa de polimerización, el porcentaje de agente entrecruzante, el diámetro del núcleo de Au, el tamaño de p4VP@Au y el grosor de polímero.

Muestra	[4VP] (mM)	% BA*	Núcleo (nm)	p4VP@Au (nm)	Grosor polímero (nm)
p4VP@Au-1	150	6	50	153.0	51.5
p4VP@Au-2	100	6	50	89.8	19.9
p4VP@Au-3	75	6	50	69.8	10.0

(*) El porcentaje utilizado de agente entrecruzante está referido en % en moles con respecto a la cantidad de monómero.

Con el objetivo de observar las diferentes conformaciones y el tamaño de partícula de los sistemas p4VP@Au a pH neutro y ácido, se obtuvieron imágenes *cryo-TEM* a dos pH distintos. Esta técnica se emplea de forma habitual para visualizar el comportamiento de las partículas en una fase acuosa mediante congelación de una suspensión de partículas, y se ha utilizado recientemente para caracterizar partículas coloidales compuestas por un núcleo con varias estructuras adjuntas, como sistemas biológicos, polímeros lineales, cadenas de polielectrolitos o redes entrecruzadas.^{113,114,115} Asimismo esta técnica permite observar sistemas coloides *in situ* (en estado congelado), proporcionando información real de los mismos, y por ello se puede aplicar sobre nuestro sistema sintetizado p4VP@Au. La figura 19 muestra imágenes *cryo-TEM* de partículas coloidales del sistema p4VP@Au-1 a pH = 2 y pH = 7.

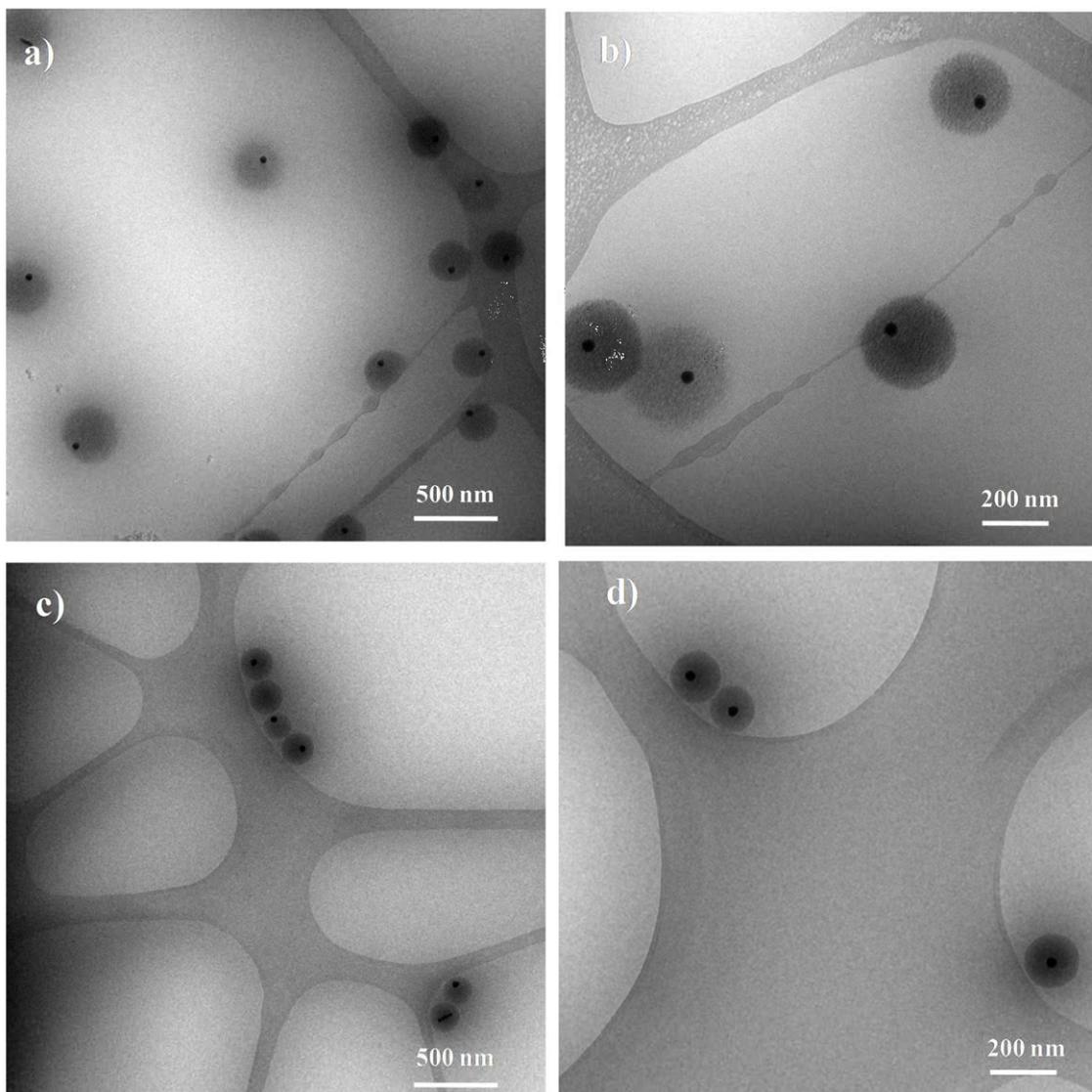


Figura 19. Imágenes cryo-TEM de p4VP@Au-1 a pH = 2 (a y b) y a pH = 7 (c y d).

Como puede observarse, las partículas congeladas a pH = 7 (figuras 19 c y 19 d) exhiben recubrimientos más delgados que aquellas partículas congeladas a pH = 2 (figuras 19 a y 19 b), con lo que se confirma que el pH del medio influye en la capacidad de hinchamiento del polímero. El tamaño medido de la partícula de p4VP@Au a pH = 2 mediante cryo-TEM fue de alrededor de 380 nm. Por el contrario, cuando el análisis se hizo para partículas preparadas a pH = 7, su tamaño se redujo a aproximadamente 160 nm.

Es importante destacar que a partir de estas imágenes cryo-TEM e incluso de TEM, se aprecia que el núcleo de Au no se encuentra exactamente en el centro del sistema híbrido en todas las partículas. Esta característica se refleja en la figura 20 que muestra dos imágenes cryo-TEM para partículas p4VP@Au a pH = 7 adquiridas con dos ángulos de inclinación diferentes, + 30° y - 30°.

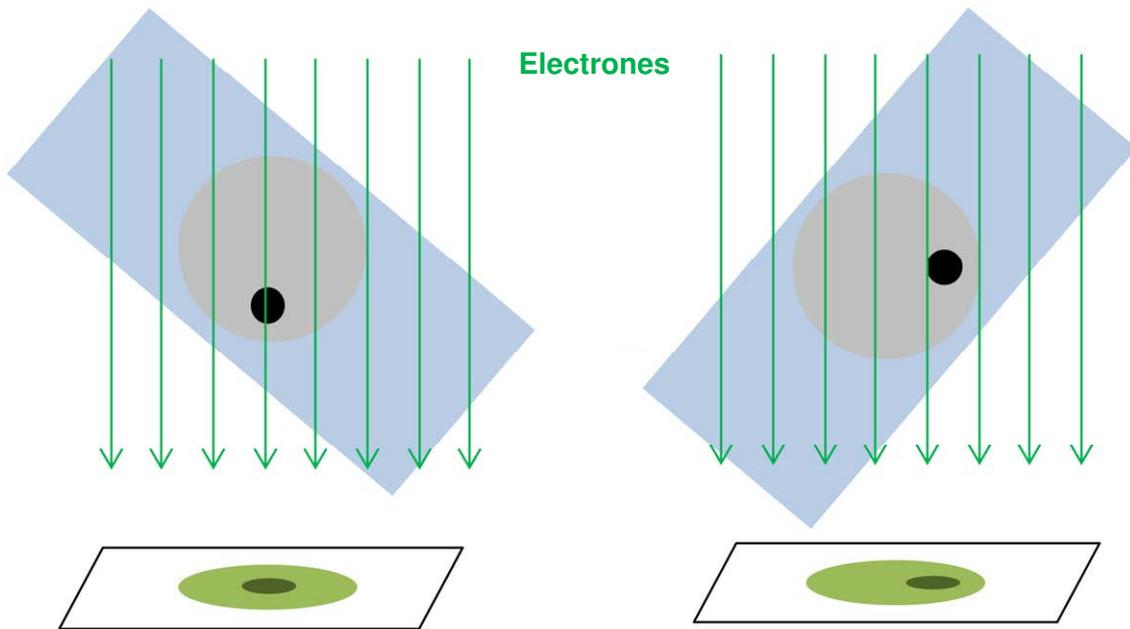
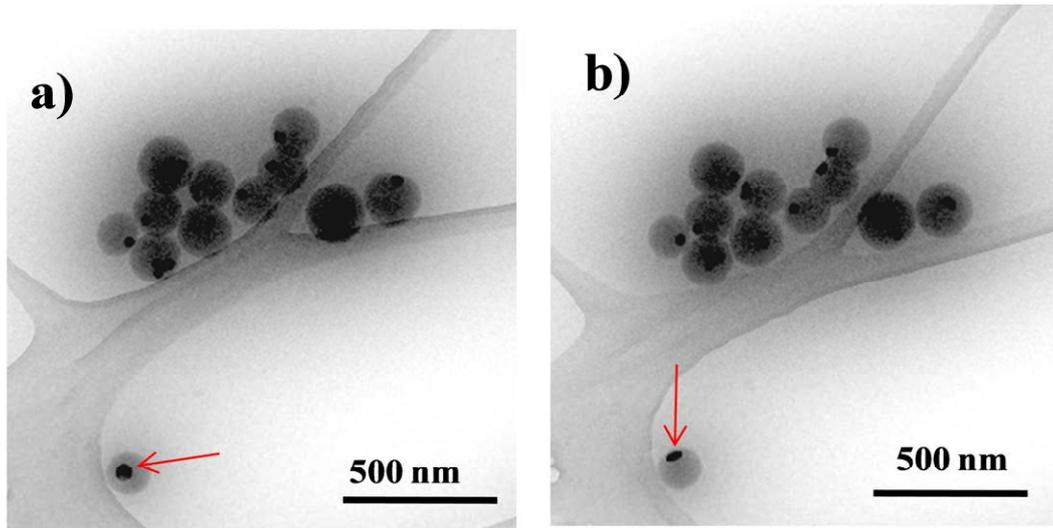


Figura 20. Imágenes cryo-TEM de NPs p4VP@Au a pH = 7 con ángulos de inclinación a) - 30° y b) + 30°.

Como se observa, el núcleo de Au (indicado con una flecha roja en la figura 20) está situado en el centro del sistema híbrido cuando la imagen es realizada a -30° . Sin embargo, cuando el ángulo de inclinación es de $+30^\circ$, el núcleo de Au aparece cerca del borde de la capa de p4VP, lo que sugiere que el núcleo de Au no está en el centro de la nanoestructura. Esta característica indica que la polimerización de p4VP no se produce de forma homogénea sobre la superficie del metal. Sin embargo, esta situación no supone un impedimento para el atrapamiento de moléculas orgánicas dentro de la red polimérica. Una investigación más detallada de las imágenes cryo-TEM de las partículas p4VP@Au muestra una estructura "en forma de colina" que pudiera producirse en las rejillas de TEM justo antes de la congelación por choque (figura 21).

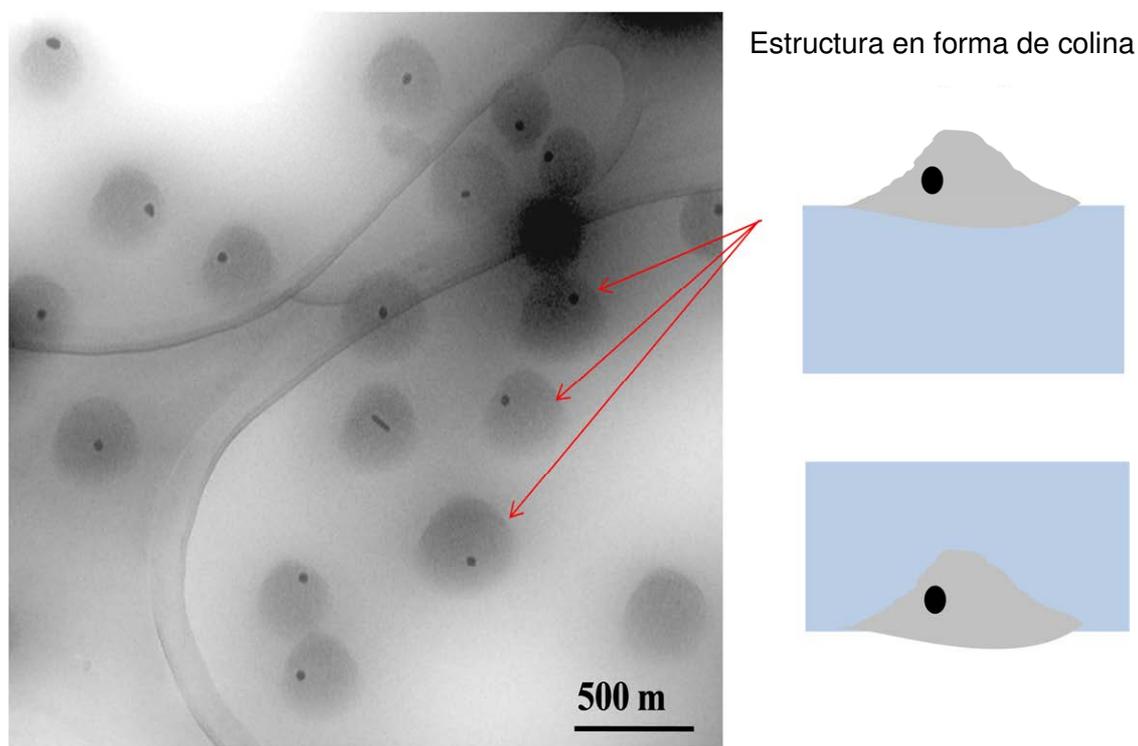


Figura 21. Imágenes cryo-TEM a pH = 2 donde se muestra la estructura "en forma de colina" debido al proceso de congelación.

Por otro lado, la capacidad de hinchamiento del polímero en función del pH se ha estudiado mediante DLS. La figura 22 representa el diámetro hidrodinámico (D_h) en función del pH para partículas híbridas p4VP@Au que han sido preparadas con cantidades diferentes de agente entrecruzante: 6 % (p4VP@Au-2), 3 % (p4VP@Au-4) y 1 % (p4VP@Au-5).

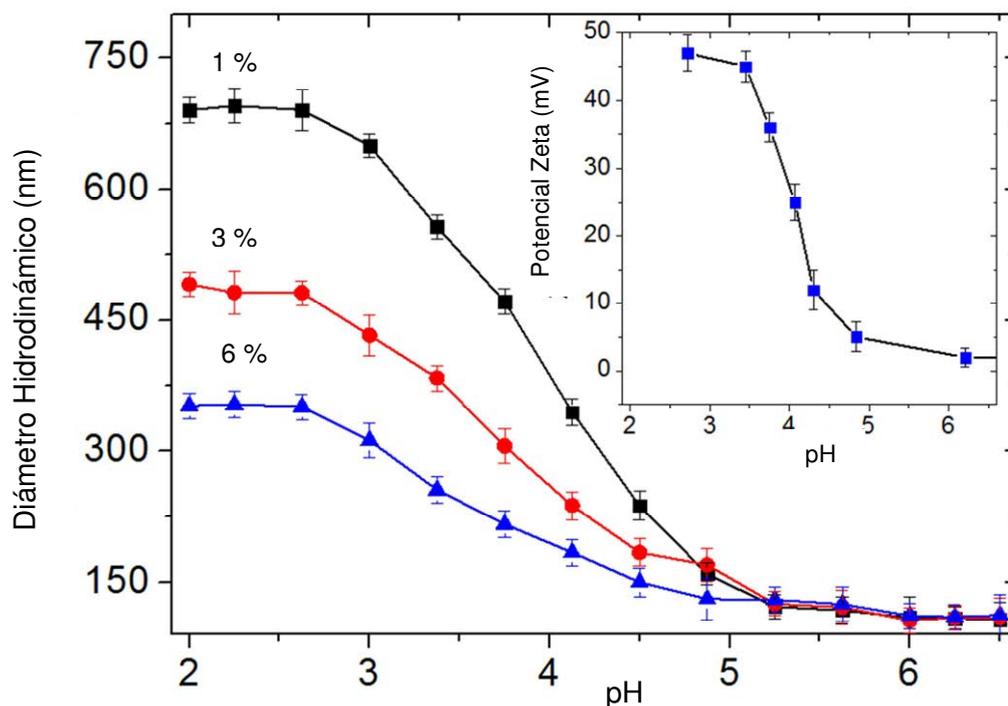


Figura 22. D_h de NPs p4VP@Au en función del pH: línea azul 6% de BA (p4VP@Au-2), línea roja 3% (p4VP@Au-4) y línea negra 1% (p4VP@Au-5).

Como se puede observar en la figura 22, el diámetro hidrodinámico de las partículas de p4VP@Au está muy influenciado por dos parámetros, el pH del medio y la concentración de agente entrecruzante durante la síntesis. En todos los casos, la transición de fase se produjo alrededor de un pH de 4.8, aumentando la pendiente de la curva a medida que disminuye el contenido de agente entrecruzante. A un pH alto (básico), cuando el recubrimiento de p4VP está completamente colapsado debido a la ausencia de carga interna, el

diámetro hidrodinámico de los tres sistemas corteza@núcleo es muy parecido en todos los casos (aproximadamente 110 nm). Cuando se reduce el pH dentro de la dispersión coloidal, la red polimérica se encuentra más protonada y el microgel de p4VP aumenta su volumen debido a la repulsión electrostática. Cuando se utiliza una cantidad menor de entrecruzante durante la preparación del sistema p4VP@Au se obtiene un diámetro hidrodinámico mayor, como se observa en la figura 22.

Estas variaciones se pueden entender en términos de las teorías de Flory-Huggins y Donnan^{116,117} que indican que la presión osmótica de un microgel puede expresarse como la suma de tres contribuciones osmóticas diferentes $\pi_{\text{total}} = \pi_{\text{mezcla}} + \pi_{\text{iónico}} + \pi_{\text{elástico}}$. El término elástico ($\pi_{\text{elástico}}$) está relacionado con la elasticidad del microgel, que depende principalmente del número de moléculas de entrecruzante, y está fuertemente relacionada con la fracción de volumen reducido $\varphi_r = \varphi/\varphi_0$, donde φ es la fracción de volumen real y φ_0 es la fracción de volumen en el estado colapsado. Para la componente iónica ($\pi_{\text{iónico}}$), la carga del polímero introduce una presión osmótica dentro de la red polimérica mediante repulsiones electrostáticas, que obligan al microgel a hincharse. Esta contribución se reduce mediante el apantallamiento iónico a concentraciones moderadas, $\pi_{\text{iónico}} = (f \cdot N_c \cdot k \cdot T / V_0)(\varphi/\varphi_0)$, donde f es el número de contraiones, N_c el número de cadenas efectivas, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura del sistema y V_0 es el volumen molar de la unidad monomérica del polímero. Por último, la componente π_{mezcla} se refiere a la contribución de la presión osmótica de la mezcla polímero / disolvente. Para el cálculo de la componente π_{mezcla} se emplea la expresión que viene dada en función de la fracción en volumen de polímero φ_2 , $\pi_{\text{mezcla}} = RT/V (\ln (1 - \varphi_2) + \varphi_2$

+ $\chi \phi_2^2$) donde R es la constante de los gases, T la temperatura y χ el parámetro de interacción de Flory-Huggins que caracteriza la energía de interacción polímero / disolvente.

Como se ha mencionado, los sistemas de partículas p4VP@Au-2, p4VP@Au-4 y p4VP@Au-5 exhiben un diámetro hidrodinámico de 110 nm en el estado colapsado, y este valor es muy parecido al diámetro de partícula medido por TEM, que es de 90 nm (Tabla 1). Las mediciones de TEM requieren una deposición de la dispersión coloidal en una rejilla de cobre, por lo que durante el secado, e incluso bajo la condición de estado de alto vacío dentro de la cámara de TEM, las moléculas de agua se evaporan totalmente de la red de polímero y, en consecuencia, el tamaño de partícula observado es ligeramente menor que en el caso de la red no ionizada en agua. Por el contrario, en las mediciones de DLS, hay moléculas de agua dentro de la red del polímero, incluso en estado colapsado.¹¹⁸ Se observa que la relación entre el diámetro de TEM y el diámetro hidrodinámico en dicho estado colapsado es de $D_{\text{TEM}} / D_h = 0.82$. Tal relación se encuentra en nanosistemas caracterizados por un núcleo denso y una capa más liviana.

En el recuadro de la figura 22 se muestra medidas de Potencial Zeta del sistema p4VP@Au-2 en función del pH. Como puede observarse, cuando el polímero está en estado colapsado (pH superior a 4.8) la carga superficial de la partícula es de alrededor de 2 mV. A medida que disminuye el pH, la carga superficial aumenta de manera continuada hasta que alcanza un valor de 48 mV, cuando el microgel está totalmente hinchado. En el caso del diámetro hidrodinámico del sistema p4VP@Au-2, éste comienza a incrementar por debajo de pH 4.8, ligeramente inferior al pH con el que comienza a cargarse la

red de polímero (un poco por debajo de pH 6, como se observa en la curva pH-Potencial Zeta de la figura 22). Por encima de pH 5.25, las partículas están en estado colapsado debido a la ausencia de carga interna. En ausencia de carga dentro de la red del polímero, la contribución de la presión osmótica de mezcla expande la red polimérica, lo que confirma las medidas de D_h . Por lo tanto, el tamaño de partícula (en ausencia de carga) depende del término de mezcla y, por lo tanto, del parámetro de solvencia.¹¹⁶ Cuando la carga aumenta abruptamente debido a la protonación de los grupos p4VP, el polímero se hincha. Por debajo de este pH, la red polimérica se protona en mayor medida, y el microgel de p4VP aumenta su volumen debido a la repulsión electrostática.⁹⁶ Por lo tanto, a un pH bajo, la matriz del polímero se ioniza, y como resultado, el volumen de la partícula aumenta. En el rango de pH comprendido entre 3 y 4.5, el hinchamiento es muy fuerte porque el término iónico controla el proceso de hinchamiento a valores ϕ grandes (tamaño de partícula pequeño). Sin embargo, a pH todavía más bajos, la contribución elástica es dominante (tamaño de partícula grande), a pesar del alto valor de la red de carga, f . Esto implica que el incremento de tamaño se vuelve menos pronunciado, ya que aumenta el grado de entrecruzamiento, lo que está de acuerdo con la evolución del tamaño del pH que se resuelve en dicha figura.¹¹⁹

Con el objetivo de completar los resultados anteriores, se han realizado experimentos SAXS para comprender mejor las propiedades estructurales de las partículas de p4VP@Au por encima y por debajo de su transición de fase. Se ha considerado la muestra p4VP@Au-2 y se ha estudiado su perfil SAXS a pH = 2 y pH = 7. En la figura 23 se representa la intensidad SAXS $I(q)$, como una función del vector de dispersión q , frente a dicho vector que se define por

la ecuación $q = 4\pi \cdot \text{sen}(\Theta) / \lambda$. Esta ecuación describe la relación de la longitud del vector de dispersión q y el ángulo de dispersión 2Θ .

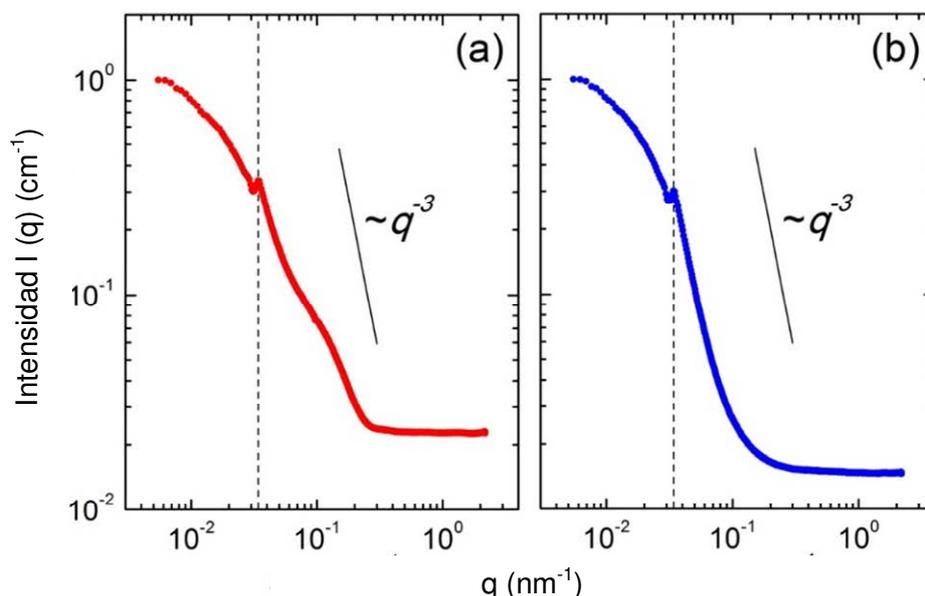


Figura 23. Perfil SAXS de NPs p4VP@Au a) pH = 2 y b) pH = 7.

Se debe tener en cuenta que como la concentración de la muestra es baja, el perfil SAXS sólo es debido al factor de forma de partícula y que las contribuciones estructurales, debido a las correlaciones posicionales de partículas, no están presentes. Como se muestra en la figura 23, ambos perfiles exhiben características comunes, la más destacada de todas es una decadencia inicial seguida de un pequeño pico. Después de ese pico, ambos perfiles decaen de una forma distinta. A pH = 2, el segundo decaimiento estructural se caracteriza por un bache, mientras que a pH = 7, hay un decaimiento recto.

Como puede observarse, el primer decaimiento y el primer pico es una marca común para cualquier perfil SAXS. Por lo tanto, como tal característica es independiente del pH, no se puede relacionar con la capa del polímero y debe

pertenecer al núcleo de oro. En este caso, a cualquiera de los dos valores de pH, la posición q de dicho pico, q_{peak} , se encuentra a una distancia característica $1/q_{\text{peak}} \sim 31\text{nm}$, que está en el rango del diámetro del núcleo de oro. En vista de este resultado, este primer análisis de SAXS revela que antes del primer pico de factor de forma, la intensidad de SAXS está dominada por las contribuciones de dispersión del núcleo de oro, ya que hasta el máximo del factor de forma, los perfiles de SAXS son independientes del pH. Hay que tener en cuenta que el núcleo de Au tiene una densidad electrónica mayor que el recubrimiento de polímero debido a su naturaleza metálica, y por lo tanto, su señal de dispersión de rayos X es más fuerte. Además, como se ha mencionado anteriormente, después de este pico, los perfiles de SAXS son notablemente diferentes en función del pH. Por lo tanto, dicho rango del factor de forma de partícula se atribuye a la capa de polímero. De esta forma, el perfil del factor de forma SAXS en posiciones del vector q mayores que q_{peak} , se caracteriza por una descomposición lineal cuando el disolvente se encuentra a $\text{pH} = 7$ (en azul, figura 23), mientras que a $\text{pH} = 2$ (en rojo, figura 23) se observa un decaimiento donde aparece un hombro. Por tanto, analizando en primer lugar el perfil SAXS a $\text{pH} = 7$ se observa que dicho perfil se parece mucho a factores de forma de los sistemas corteza@núcleo en estados colapsados, donde la partícula global se comporta como una esfera blanda.¹²⁰ Además, el decaimiento posterior al pico sigue una ley de potencia de $\sim q^{-3}$, como puede concluirse del análisis de la figura. Tal comportamiento está en contraste con la dependencia $\sim q^{-4}$ que generalmente se encuentra en los factores de forma de los nanosistemas corteza@núcleo, donde la potencia de -4 representa la dispersión de superficies duras y, por tanto, este valor se

asocia e ellos.¹²¹ Por el contrario, una potencia de - 3 se puede asociar a partículas que no son completamente simétricas, es decir, el núcleo de la partícula no está centrado. Tal comportamiento se observa también cuando el disolvente de la muestra tiene un pH = 2. Sin embargo, aquí la descomposición que sigue al pico de intensidad SAXS está truncada por un perfil con forma de hombro, que es el que generalmente se encuentra en los sistemas corteza@núcleo en una fase hinchada. Además, ese perfil distintivo se encuentra en capas de polímero muy abiertas que se configuran en estructuras de polímero tipo estrella.¹²² Por lo tanto, en esta caracterización SAXS del nanosistema p4VP@Au se deduce un núcleo de esfera dura, rodeado por un recubrimiento de polímero sensible al pH, en el que a pH alto se configura como una esfera suave, mientras que a un pH ácido, se hincha y se estructura como un polímero tipo estrella.

Como se ha publicado anteriormente, una variación en un estímulo externo (como la temperatura) en un nanocompuesto de tipo corteza@núcleo (pNIPAM@Au) modifica el índice de refracción alrededor del núcleo metálico debido a la distinta cantidad de moléculas de agua dentro de la red polimérica entre ambos estados (hinchado y colapsado).¹²³ Como establece la teoría de Mie, esta circunstancia produce un cambio en la posición del plasmón superficial localizado (LSPB), el cual se puede medir mediante espectroscopía UV-Vis. Para estos sistemas p4VP@Au, el desplazamiento del LSPB puede determinarse midiendo los espectros de UV-Vis en función del pH, como se muestra en la figura 24.

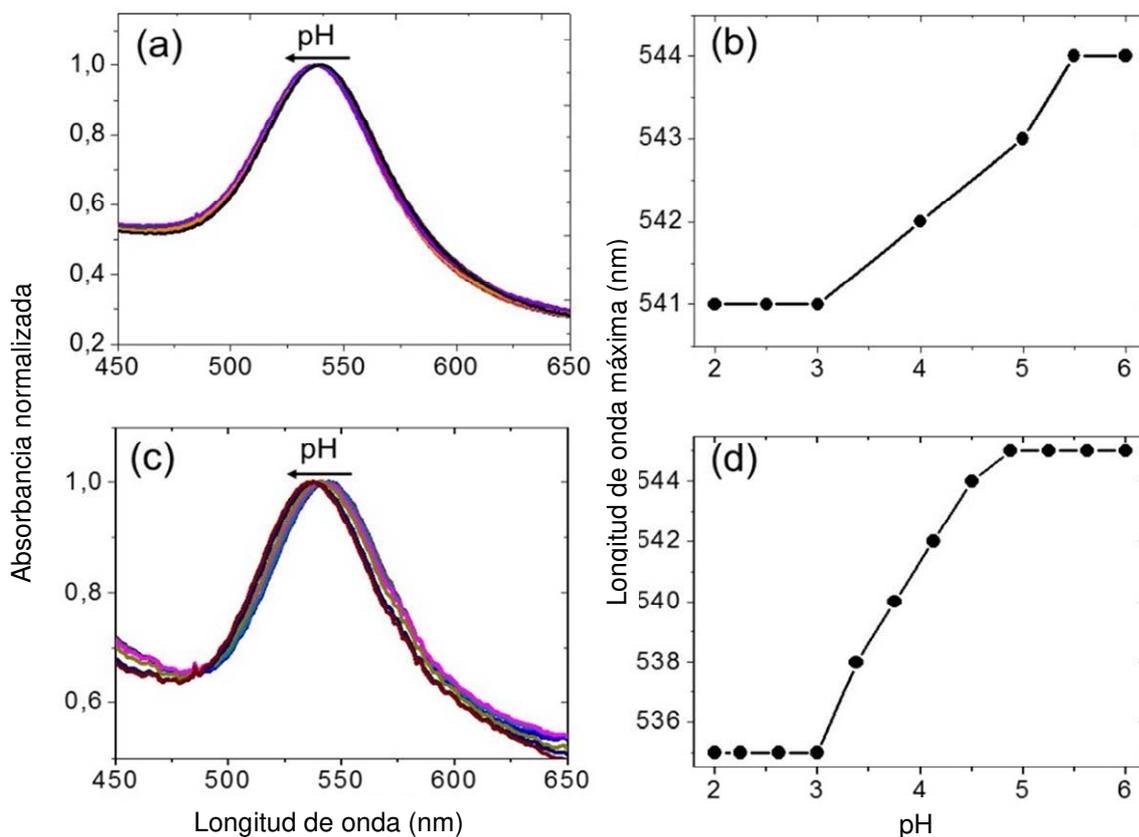


Figura 24. Espectros normalizados de UV-Vis de dispersiones acuosas de partículas de p4VP@Au a distintos valores de pH para a) 6 % BA(p4VP@Au-2) and c) 1 % (p4VP@Au-4); b) y d) muestran la longitud de onda máxima en función del pH para cada muestra.

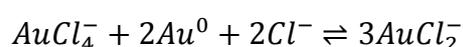
Para llevar a cabo este análisis, se ha preparado una dispersión coloidal del sistema p4VP@Au a pH 6, sobre la que se añade, después de medir su espectro UV-Vis, pequeñas alícuotas de HCl 0.1M. En este estudio se ha medido el desplazamiento de LSPB en función del pH para las partículas p4VP@Au-2 (100 mM 4VP, 6 % BA). Las figuras 24 a y 24 b muestran los espectros UV-Vis normalizados y la posición del plasmón a varios valores de pH. Como se observa, cuando el microgel de p4VP está en el estado colapsado, el espectro UV-Vis muestra un máximo a 544 nm. A medida que disminuye el pH, la posición del plasmón se desplaza de manera continua hasta alcanzar una posición de 541 nm. Este desplazamiento sugiere un ligero

cambio en el índice de refracción dentro de la red polimérica¹¹² lo que indica la incorporación de moléculas de agua dentro del microgel.

Con el objetivo de estudiar la influencia de la densidad de agente entrecruzante en el desplazamiento de plasmón, también se analizan los espectros de UV-Vis cuando el pH varía de 6 a 2 para un sistema p4VP@Au con una menor cantidad de entrecruzante, el sistema p4VP@Au-5 (100 mM 4VP, 1 % BA). Las figuras 24 c y 24 d muestran los espectros UV-Vis normalizados y la posición del plasmón a distintos valores de pH. En este caso, la posición del plasmón varía de 545 nm a pH 6 a 535 nm a pH 2. Este cambio se debe a una mayor variación en el índice de refracción en el microgel de p4VP, lo que indica que una mayor cantidad de moléculas de agua ha entrado en la red polimérica al hincharse el microgel. Estos resultados son consistentes con los datos previamente publicados para los sistemas pNIPAM@Au, donde el desplazamiento de plasmón producido por encima y por debajo de la temperatura de transición de fase depende de la densidad de entrecruzamiento dentro del polímero. Esto es debido a que la elasticidad de un microgel está directamente relacionada con el número de moléculas de entrecruzante dentro de la red polimérica.¹¹⁶ Un microgel con baja densidad de entrecruzante experimenta una transición de fase abrupta y, por tanto, puede introducirse una mayor cantidad de moléculas de agua en el polímero. De esta forma el desplazamiento del plasmón es mayor en comparación con un microgel con una mayor cantidad de entrecruzante, y este desplazamiento es proporcional al volumen del recubrimiento de p4VP.

4.1.3 Nanopartículas de p4VP huecas (p4VP@HU).

El hecho de disponer de nanopartículas metálicas de oro recubierto de polímero, p4VP@Au, permite afrontar la preparación de nanopartículas huecas por oxidación del núcleo metálico (proceso descrito en el apartado 3.2.4). La oxidación se realiza por tratamiento con una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Au (III)) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), según la siguiente reacción.⁸⁹



De esta forma se eliminan los núcleos metálicos, que pasan a la disolución en forma de Au (I), dando como resultado sistemas huecos de p4VP. La morfología de estas NPs huecas se obtiene mediante imágenes TEM (figura 25), donde se ha medido un diámetro interno de 40 nm y un diámetro externo entre 130 y 150 nm.

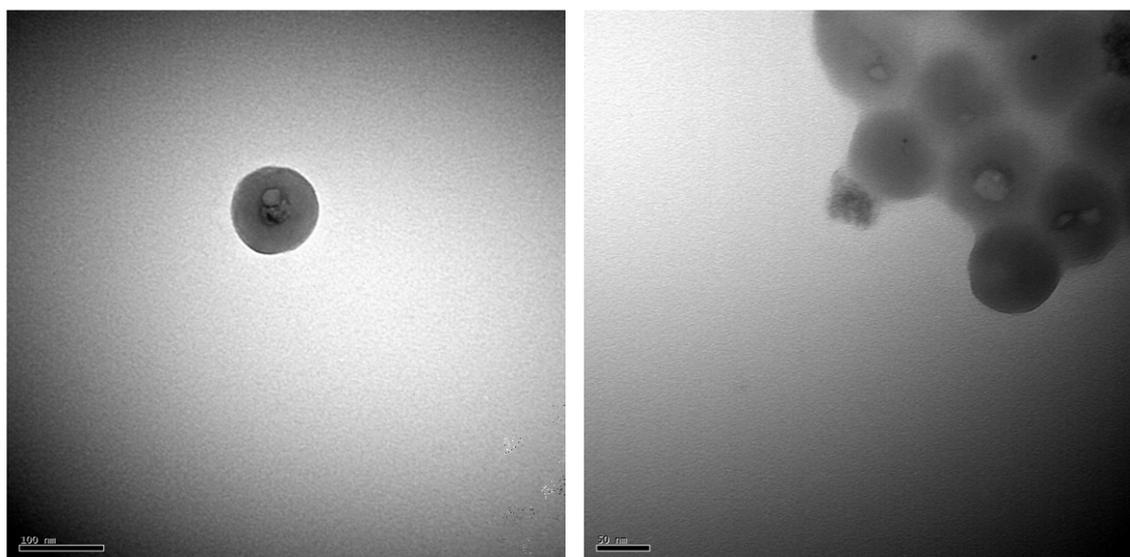


Figura 25. Imágenes TEM de NPs huecas (p4VP@HU).

Por otro lado, para demostrar el comportamiento dependiente de pH de estas NPs huecas, se han realizado distintos ensayos para determinar el diámetro hidrodinámico en función del pH mediante técnicas DLS y la determinación de la carga superficial.⁵ Como puede observarse en la figura 26, a medida que aumenta el pH disminuye el valor del diámetro del polímero hasta unos 100 nm a un pH en torno a 7.5.

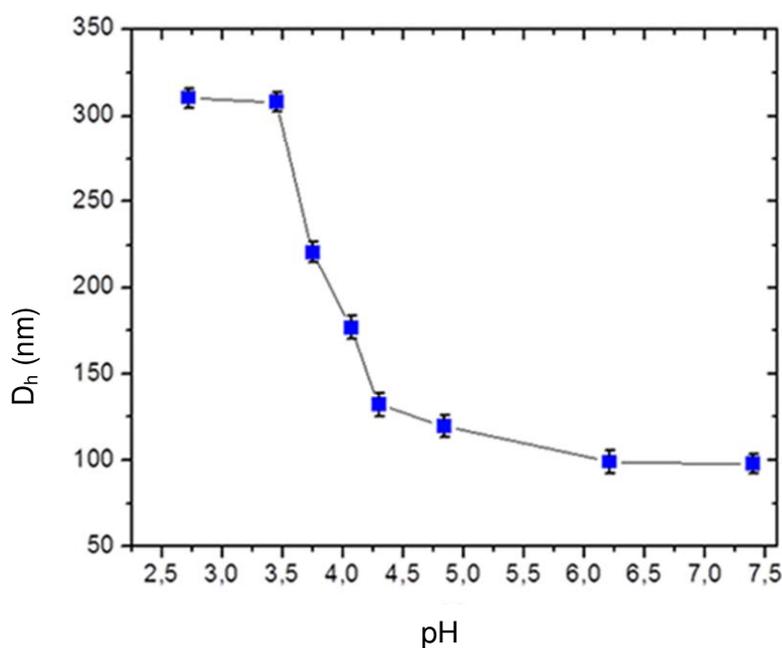


Figura 26. Variación del diámetro hidrodinámico de p4VP@HU en función del pH.

En cuanto a la carga superficial de p4VP@HU, a pH 2.75 se obtiene un valor de + 47 mV, y al aumentar el pH hasta 7.5 la carga superficial disminuye acercándose a la neutralidad (2 mV). En este caso también el proceso contrario da lugar a resultados similares (figura 27).

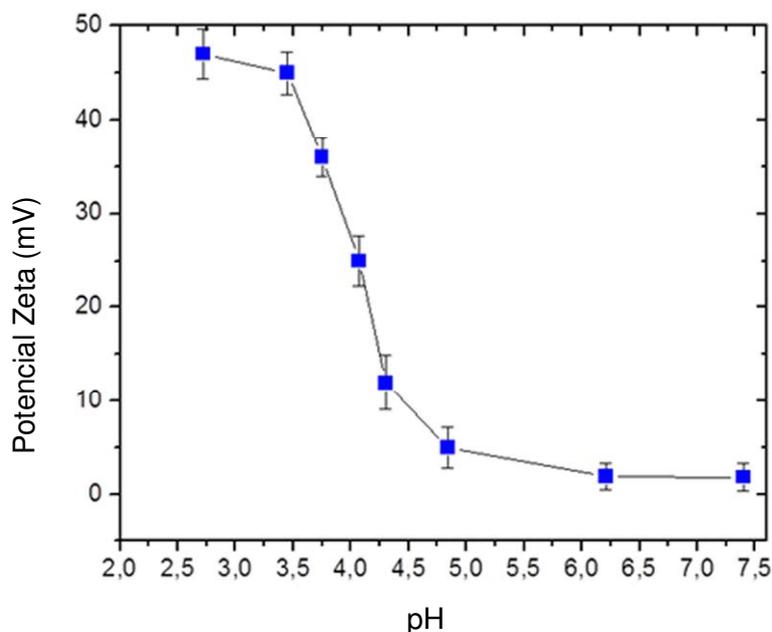


Figura 27. Variación de la carga superficial de p4VP@HU en función del pH.

Estos resultados confirman el comportamiento dependiente del pH de las p4VP@HU y la expansión del gel en presencia de un medio ácido.

4.1.4 Nanopartículas de p4VP macizas (p4VP@MZ).

En el apartado anterior se ha analizado el sistema de nanogel híbrido formado por un núcleo metálico recubierto por una capa de polímero (p4VP). A continuación, se detalla la preparación de un nanogel del mismo monómero pero sin núcleo metálico.

La preparación de partículas p4VP@MZ se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.5. El proceso consiste en la polimerización radicalaria de una disolución acuosa de 4-vinilpiridina en presencia de un agente entrecruzante (*N,N*-metilenbisacrilamida). La morfología de las muestras obtenidas ha sido analizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la figura 28 se incluye imágenes de las muestras preparadas con concentraciones de 0.15 y 0.20 M de monómero. En

las imágenes obtenidas de p4VP@MZ se observa, por una parte, una dispersión pequeña de tamaño y que, prácticamente no hay agregación entre las partículas. Del análisis dimensional de las imágenes se determina el tamaño de las NPs. Las preparadas con una concentración de 0.15 M de 4VP presentan un diámetro medio de 200 ± 4.2 nm mientras que las preparadas con una concentración de 0.20 M el diámetro es de 335 ± 3.9 nm. Este resultado era el esperado ya que, como ocurría en los apartados anteriores, hay una relación directa entre la cantidad de monómero y el tamaño de las NPs.

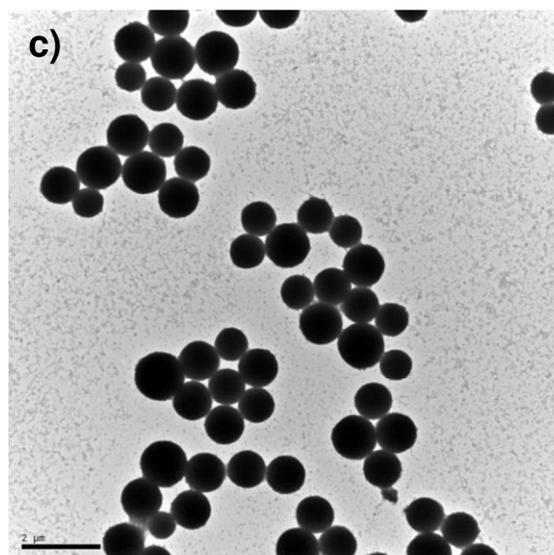
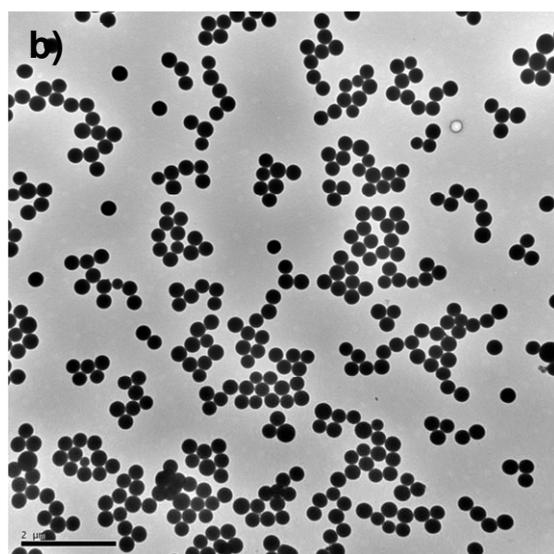
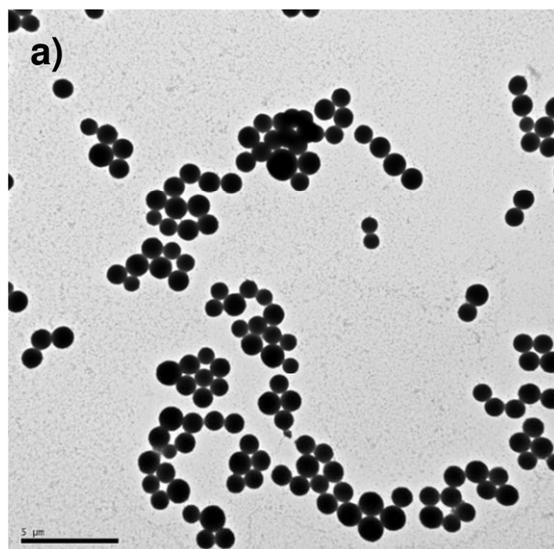


Figura 28. Imágenes TEM de p4VP@MZ a) 0.15 M; b) y c) 0.20 M

4.1.5 Encapsulación y actividad de Paclitaxel en nanopartículas de p4VP huecas (p4VP@HU) y macizas (p4VP@MZ).

La incorporación de compuestos activos anticancerígenos a formulaciones de micelas poliméricas sensibles al pH ha sido analizado desde el momento en el que se desarrollaron este tipo de polímeros, estudiándose en especial la liberación del fármaco y la influencia del pH en la misma, su toxicidad y biocompatibilidad, y en algunos casos, la inclusión de agentes gelificantes como la goma guar, peptina o quitosano.^{124,125} En el caso de paclitaxel, se ha estudiado su incorporación a nanopartículas de polímeros mixtos preparadas a partir de 4VP y un derivado de poli(ϵ -caprolactona), observándose que los conjugados con ácido fólico pueden internalizar el agente activo en la célula de forma más eficiente.¹²⁶ Recientemente, también se ha analizado la inclusión de PTX en microesferas preparadas a partir de acrilatos del ácido maleico utilizando 2-vinilpiridina como agente entrecruzante, ampliándose el estudio a sistemas cuaternarios de polímeros, en concreto, derivados de 2-vinilpiridina, ácido acrílico, isopropil acrilamida y poliestireno.^{127,128} En cuanto al empleo de sistemas híbridos formados por un núcleo metálico funcionalizado con polímeros, se ha descrito el empleo del sistema formado por nanopartícula de oro y un polímero mixto de 2-vinilpiridina y etilenglicol, estudiándose la liberación de PTX en función del pH en sistemas de 200 nm de diámetro.¹²⁹ En nuestro laboratorio hemos desarrollado recientemente sistemas híbridos p4VP@Au para la encapsulación y mejora de las propiedades de PTX,⁵ sin embargo, no hay descritos en la bibliografía sistemas huecos o macizos de p4VP que se hayan analizado para el transporte de PTX.

Como ya se ha indicado, p4VP es un polímero sensible a los cambios de pH y se utiliza esta característica para llevar a cabo con efectividad el atrapado del compuesto activo. En el caso de p4VP@HU, Paclitaxel se ha encapsulado en concentraciones desde 0.4 mg/mL hasta 1.8 mg/mL. El proceso experimental se detalla en el apartado 3.2.6. En medio ácido (pH = 2), obtenido por tratamiento con una disolución diluida de HCl, se consigue la protonación de los grupos piridínicos de p4VP y se produce una repulsión electrostática dentro de la estructura de red del polímero que hace que aumente de tamaño, permitiendo la incorporación de PTX. Sin embargo, cuando el medio es básico, obtenido por la adición de una disolución diluida de NaOH, se produce la desprotonación de los átomos de nitrógeno, colapsando el polímero y atrapando PTX en su interior.

La presencia de PTX en el interior de las NPs huecas se analiza mediante espectroscopia Raman, comparando el espectro Raman de PTX (línea roja, figura 29, el de las partículas huecas de referencia (p4VP@HU, línea azul, figura 29) y el de la muestra de NPs huecas con Paclitaxel (p4VP@HU-PTX, línea verde, figura 29). En el espectro de p4VP@HU-PTX (línea verde) se observan los picos 180, 255, 421, 490, 618, 818, 1003, 1663 y 1717 cm^{-1} , todos ellos marcados con un asterisco en la figura. Estos picos son característicos de la molécula de PTX, confirmando de esta forma su presencia en las NPs. De forma paralela, mediante HPLC se cuantificó la presencia de PTX en las partículas huecas centrifugadas, descartando la presencia del agente activo en el sobrenadante y confirmando, por tanto, una eficiencia de encapsulación que se puede considerar del 100 % del fármaco en estos sistemas.⁵ La incorporación cuantitativa del agente activo a las partículas puede ser explicada

por el bajo porcentaje del mismo frente a partículas, siendo este valor cercano al 1 % de las p4VP@NPs, lo que garantiza la completa incorporación. Este valor es cercano al encontrado en la bibliografía.³

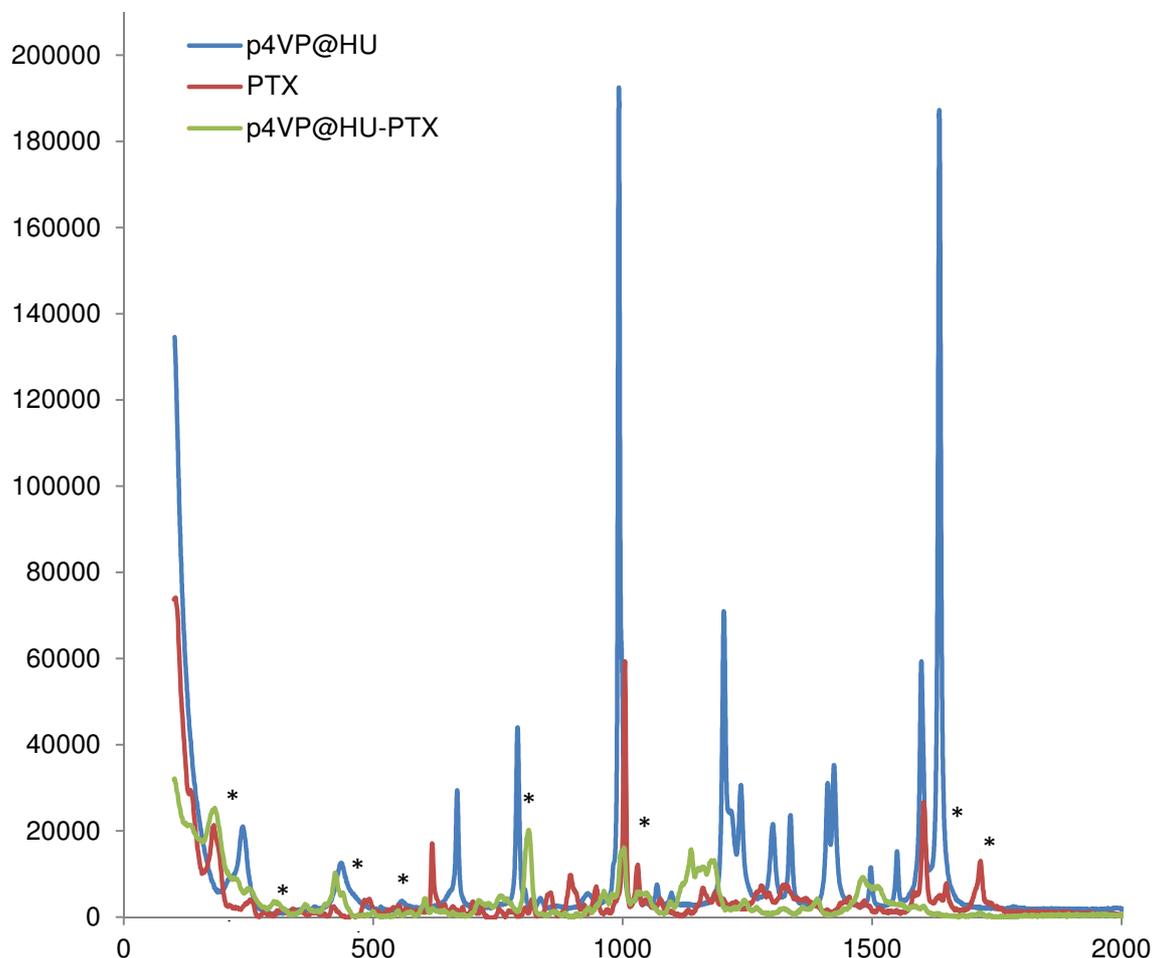


Figura 29. Análisis Raman de p4VP@HU (línea azul), PTX (línea roja) y p4VP@HU-PTX (línea verde).

Además, se ha analizado la liberación del fármaco *in vitro* tanto en ambientes ácidos como en básicos, mostrando una liberación más rápida en medios ácidos y una liberación más sostenida en los básicos (figura 30). De acuerdo a los resultados obtenidos a un pH de 7.6 se libera un 15 % del fármaco el primer día llegando al 70 % al décimo. Mientras que para el caso de un pH ácido en torno al 3.5 se libera el 70 % de PTX el primer día, llegando al 100 % en los

cuatro siguientes. Esto demuestra que la liberación del fármaco es dependiente del pH del medio, aumentando la velocidad de liberación a pH ácido.

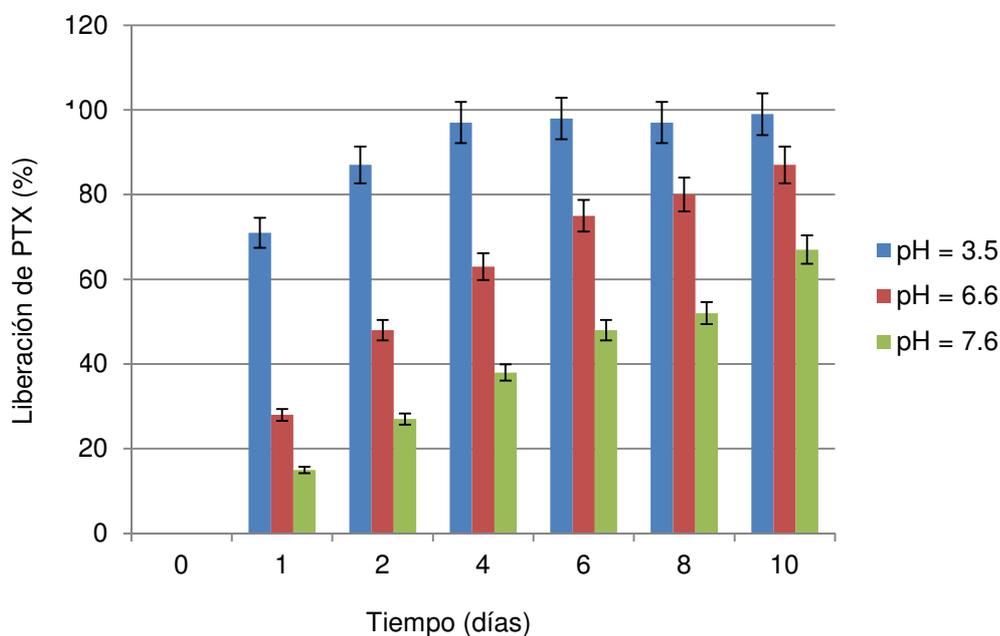


Figura 30. Liberación *in vitro* de PTX desde p4VP@HU-PTX a pH básico (pH = 7.6) y a pH ácido (pH = 3.5).

Por otro lado, y con el fin de comparar los resultados de la liberación de PTX en sistemas de p4VP huecas y macizas, se ha encapsulado PTX en sistemas p4VP@MZ. La preparación de estas NPs se detalla en el apartado 3.2.5 y la encapsulación del compuesto activo se ha llevado a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para las NPs huecas. En la figura 31 se incluye una imagen TEM representativa de las nanopartículas preparadas con una concentración de monómero 0.2 M. Como se puede observar, la inclusión de PTX no afecta a su morfología, manteniéndose esférica. Además, se observa poca dispersión de tamaño y poca agregación. Del análisis dimensional se determina el tamaño. Éste aumenta ligeramente respecto a las muestras sin PTX, pasando de 335 ± 3.9 nm a un tamaño medio de 375 ± 4.2 nm. Este aumento de tamaño

puede ser debido a un menor empaquetamiento del polímero en estado colapsado debido a la presencia de PTX.

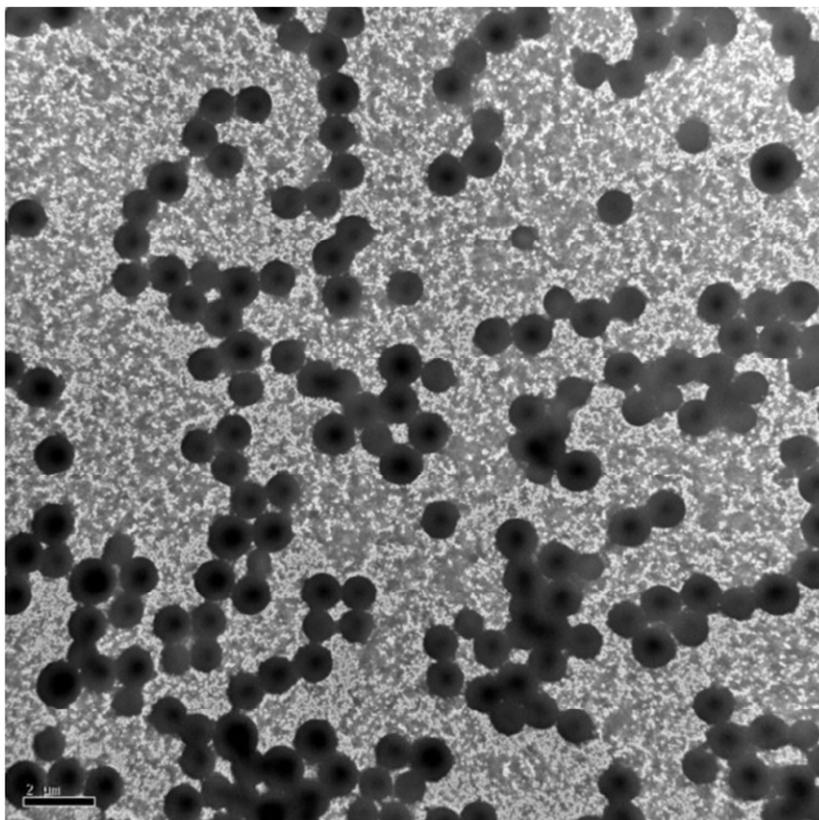


Figura 31. Imagen TEM de p4VP@MZ-PTX 0.2 M

Estudio de la citotoxicidad de sistemas p4VP@HU-PTX y p4VP@MZ-PTX.

Para determinar la actividad de los sistemas de partículas p4VP@HU-PTX se han llevado a cabo ensayos sobre células sanguíneas humanas y líneas celulares humanas tumorales y no tumorales de mama y pulmón. Estos análisis han sido realizados por el Grupo de Investigación dirigido por el Dr. José Carlos Prados Salazar, en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Los estudios en muestras de sangre han permitido determinar el grado de hemólisis originado por las NPs y, por tanto, su hemocompatibilidad. Como se

observa en la figura 32, este sistema de partículas no ha provocado hemólisis incluso a concentraciones altas como 1.8 mg/mL y una hora de exposición, y no se ha observado un porcentaje de hemólisis superior al 0.8 % en ninguna de las concentraciones testadas.

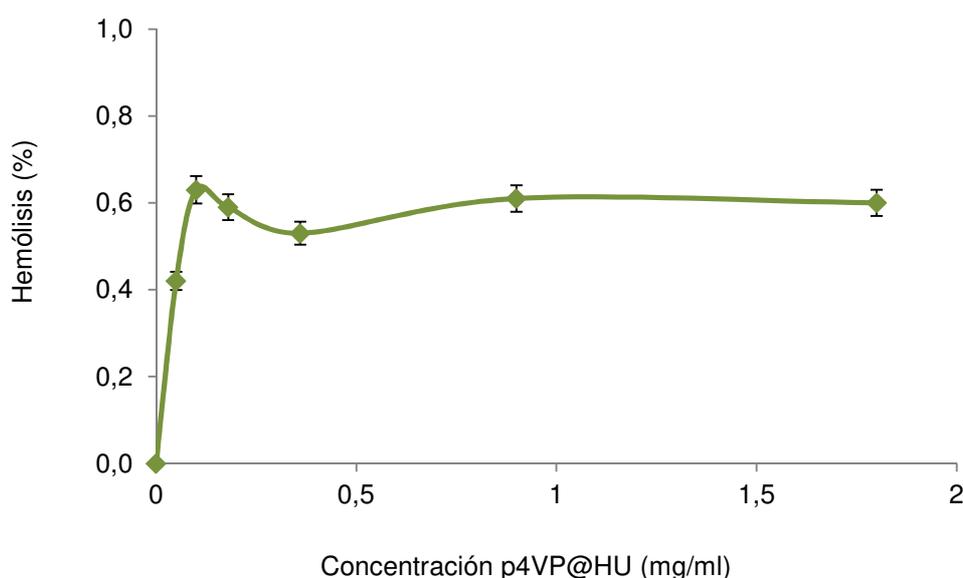


Figura 32. Hemocompatibilidad de los sistemas de NPs huecas de p4VP.

Los estudios de toxicidad en las líneas celulares humanas se han realizado sobre las líneas A549 (cáncer de pulmón), MCF7 (cáncer de mama), L132 (cáncer de pulmón) y MCF10A (células epiteliales de mama) en la Universidad de Granada. Los análisis realizados con las muestras de nanopartículas p4VP@HU muestran la no existencia de inhibición del crecimiento celular a las concentraciones utilizadas, lo que indica que las muestras de NPs son biocompatibles. En todos los ensayos se encontraron valores de viabilidad cercanos al 100 % con concentraciones de nanopartículas entre 0.1 y 30 nM (figura 33).

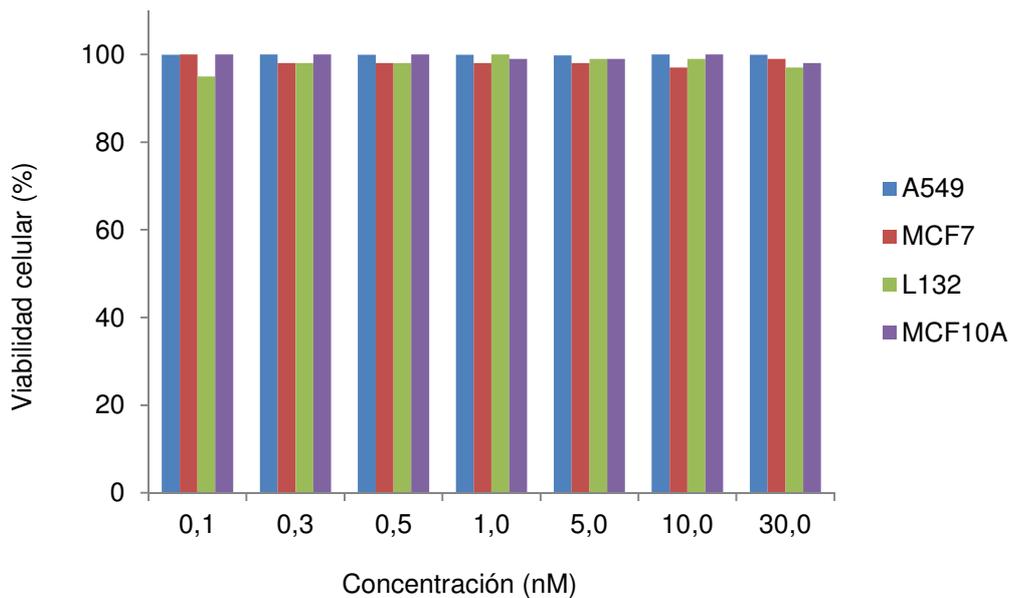


Figura 33. Estudio de viabilidad celular (%) de líneas celulares humanas tumorales y normales derivadas de mama y pulmón expuestas a sistemas p4VP@HU.

Una vez comprobada la biocompatibilidad de estos sistemas se realizaron ensayos con dosis crecientes de PTX (blanco) y p4VP@HU-PTX de 0.1 a 30 nM comparando así la actividad debida al compuesto activo libre y al encapsulado. La viabilidad celular de las líneas tumorales de mama y pulmón, resultado de los ensayos, se muestra en la figura 34.

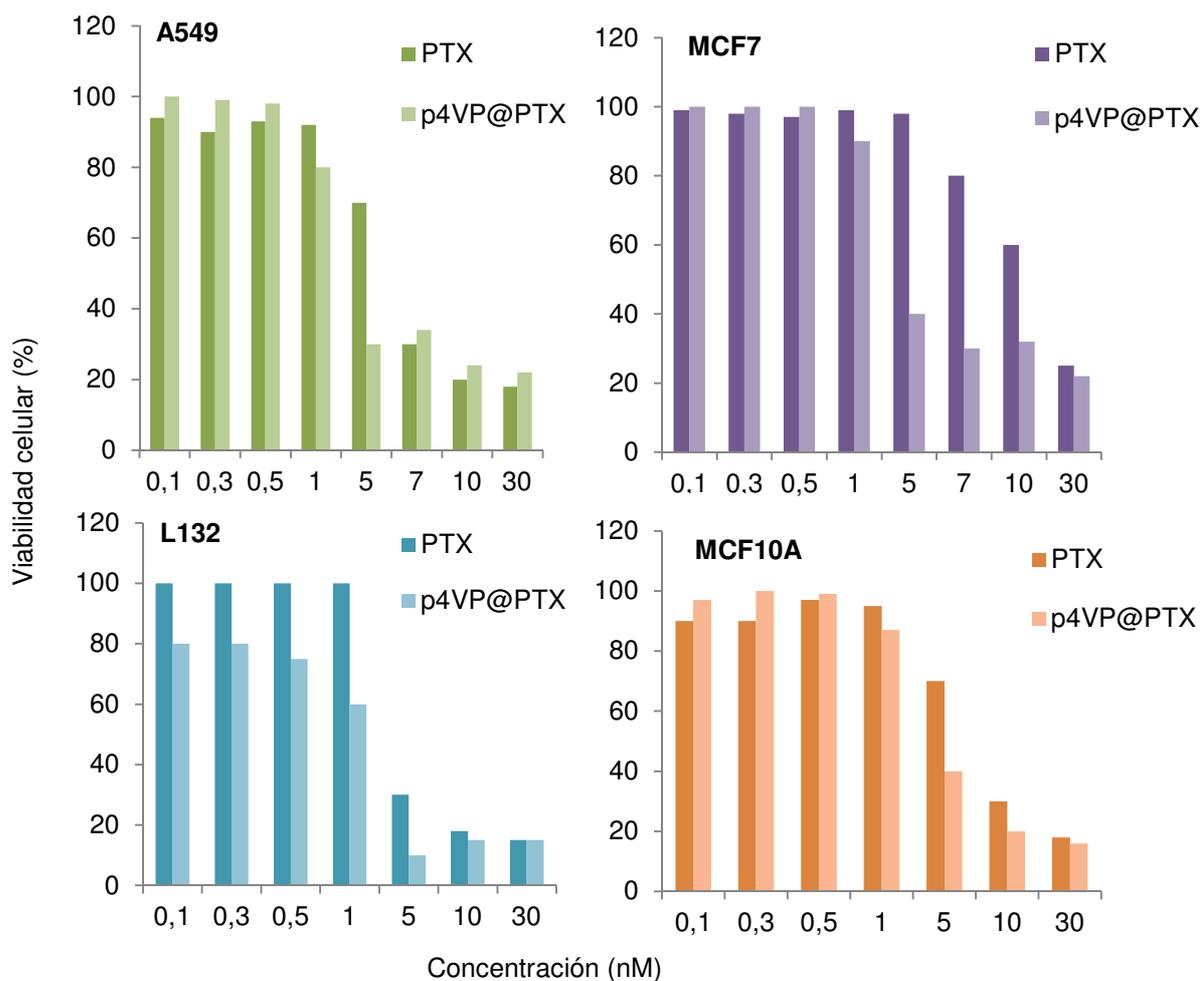


Figura 34. Estudio de la citotoxicidad de PTX y de p4VP@HU-PTX en células de pulmón y mama, tumorales y no tumorales.

Como se observa en las gráficas de la figura 34, la incorporación de PTX en estas NPs mejora su citotoxicidad sobre modelos *in vitro* de células tumorales humanas, tanto de mama como de pulmón, disminuyendo significativamente la concentración de PTX necesaria para reducir al 50 % la población tumoral (IC₅₀).

Por otro lado, la actividad de PTX incluido en muestras de nanopartículas macizas de p4VP se ha ensayado sobre la línea celular tumoral MCF7 de cáncer de mama, en concentraciones 0.5, 1.0 y 1.8 mM en PTX. Los resultados se muestran en la figura 35. Los ensayos de las nanopartículas sin PTX

muestran la no toxicidad de las mismas (blanco en figura 35) en un rango de concentraciones de 0.1 a 30 nM. Sin embargo, ningún sistema consigue alcanzar el efecto citotóxico del PTX libre.

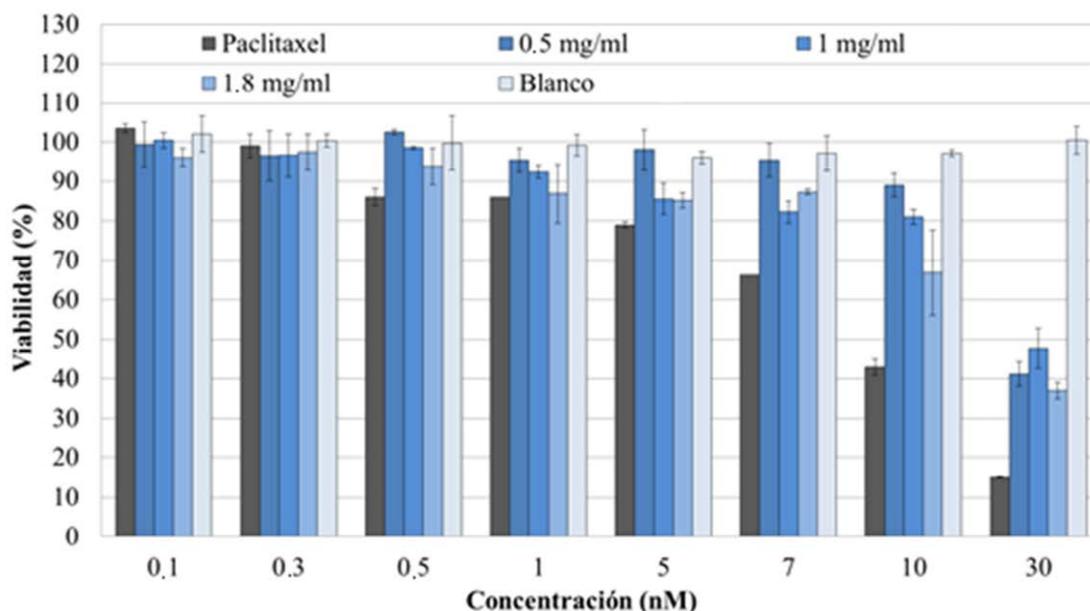


Figura 35. Estudio de la citotoxicidad de PTX y p4VP@MZ-PTX sobre la línea celular tumoral de cáncer de mama MCF7 a distintas concentraciones de PTX.

4.1.6 Encapsulación y actividad de Doxorrubicina en nanopartículas corteza@núcleo de p4VP (p4VP@Au).

Doxorrubicina (DOX) es una molécula utilizada en quimioterapia contra el cáncer. En esta Tesis DOX se ha encapsulado en sistemas híbridos p4VP@Au tal como se ha explicado en el apartado 3.2.6. Se ha estudiado la influencia del pH en la incorporación del agente activo en la red polimérica realizándose un estudio a pH = 2 y pH = 6, y se ha comprobado que un aumento del pH supone un mejor atrapamiento de DOX. Así, mediante espectroscopía SERS se ha observado que al aumentar el pH, la intensidad de la señal Raman (línea naranja en la figura 36) se incrementa hasta tres veces cuando se compara con

el mismo experimento llevado a cabo a un pH ácido (línea rosa en la figura 36). Este resultado podría explicarse si tenemos en cuenta que la molécula de DOX tiene una solubilidad en agua que depende del pH y exhibe un carácter hidrofóbico que se incrementa a pH neutro. Como resultado, en presencia de partículas de p4VP@Au, la molécula de DOX se acomodaría dentro de las cadenas poliméricas parcialmente hidrófobas. En esta situación dicha molécula se acercaría o incluso estaría en contacto con la superficie de Au mejorando así la señal SERS.¹³⁰

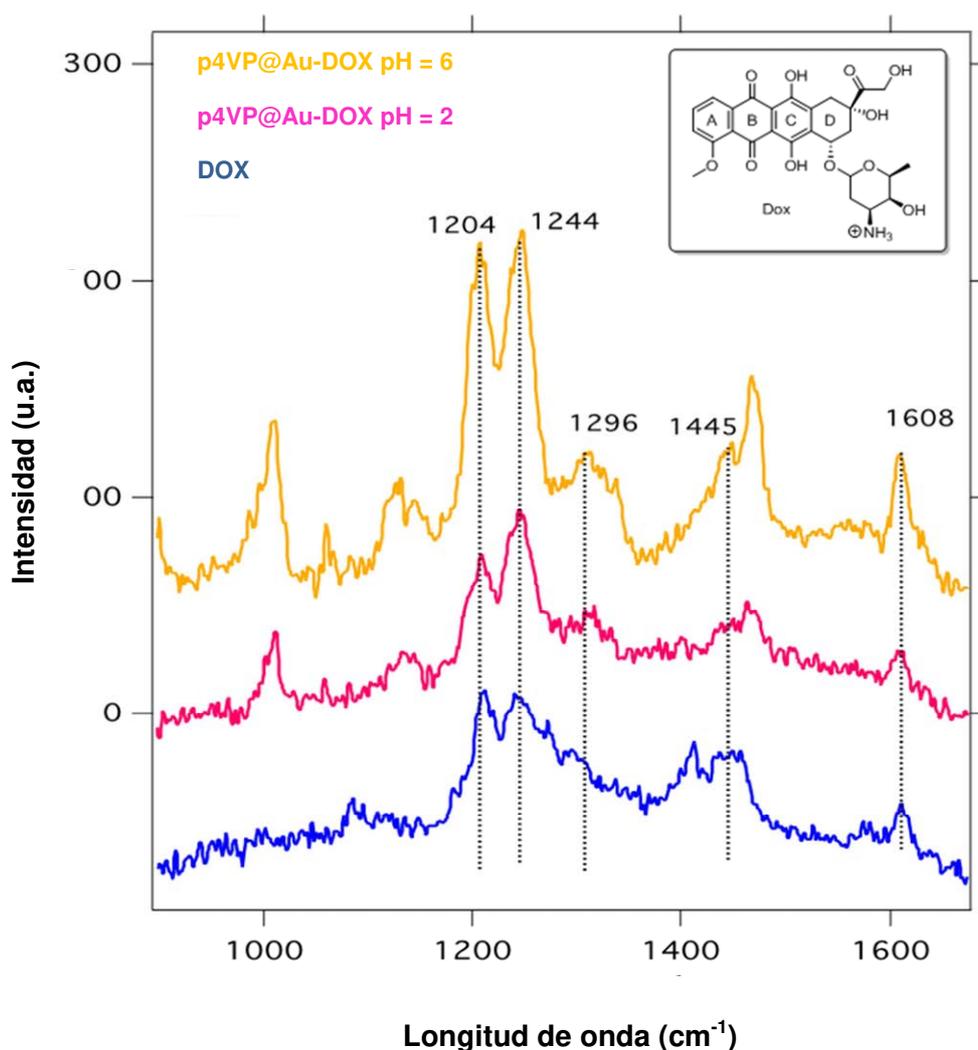


Figura 36. Análisis SERS de DOX en p4VP@Au a pH = 2 (línea rosa), pH = 6 (línea naranja) y espectro de DOX (línea azul).

Además, se observa que las bandas más intensas para DOX están en la región entre 1000 y 1700 cm^{-1} (figura 36). En esta región, la aparición de bandas espectrales se debe a la presencia de anillos aromáticos conjugados en la estructura molecular (A, B y C en la molécula) que proporcionan diferentes modos de vibración.¹³¹ Estas bandas contienen contribuciones adicionales como resultado de su acoplamiento con otros grupos funcionales como OH o C=O, entre otros. Así, por ejemplo, las bandas ubicadas a 1608 cm^{-1} pueden atribuirse a la vibración de estiramiento de los grupos C=O acoplados al anillo aromático, mientras que la banda que aparece a 1445 cm^{-1} podría ser el resultado de la vibración de estiramiento del anillo aromático junto con la curvatura CC-O-CH. La banda a 1296 cm^{-1} se atribuye al movimiento de flexión de CO acoplado a la vibración de estiramiento de los anillos aromáticos.¹³² En el espectro se observan dos bandas características en 1244 y 1204 cm^{-1} , como resultado de los movimientos de flexión en el plano del grupo C-O con la vibración de estiramiento de los anillos aromáticos.

En la figura 37 se muestra la estructura de la molécula de DOX y su interacción con la molécula de polímero p4VP. La correcta interacción entre las moléculas de DOX y p4VP es muy importante para proporcionar un sistema que sea capaz de incorporar dicha molécula y que además sea sensible al pH. Así, por debajo de $\text{pH} = 4.8$ se producen interacciones por puentes de hidrógeno entre moléculas de DOX y la red polimérica de p4VP. Estas interacciones pueden producirse entre los grupos de oxígeno del fármaco y el hidrógeno de la molécula de piridina del polímero, como se indica en la figura 37 b. Por el contrario, por encima de un pH de 4.8, cuando el átomo de nitrógeno del polímero se encuentra en estado desprotonado, las interacciones por puentes

de hidrógeno pueden producirse entre el par de electrones del nitrógeno del microgel de p4VP y los átomos de hidrógeno de la molécula de DOX (figura 37 c).¹³³

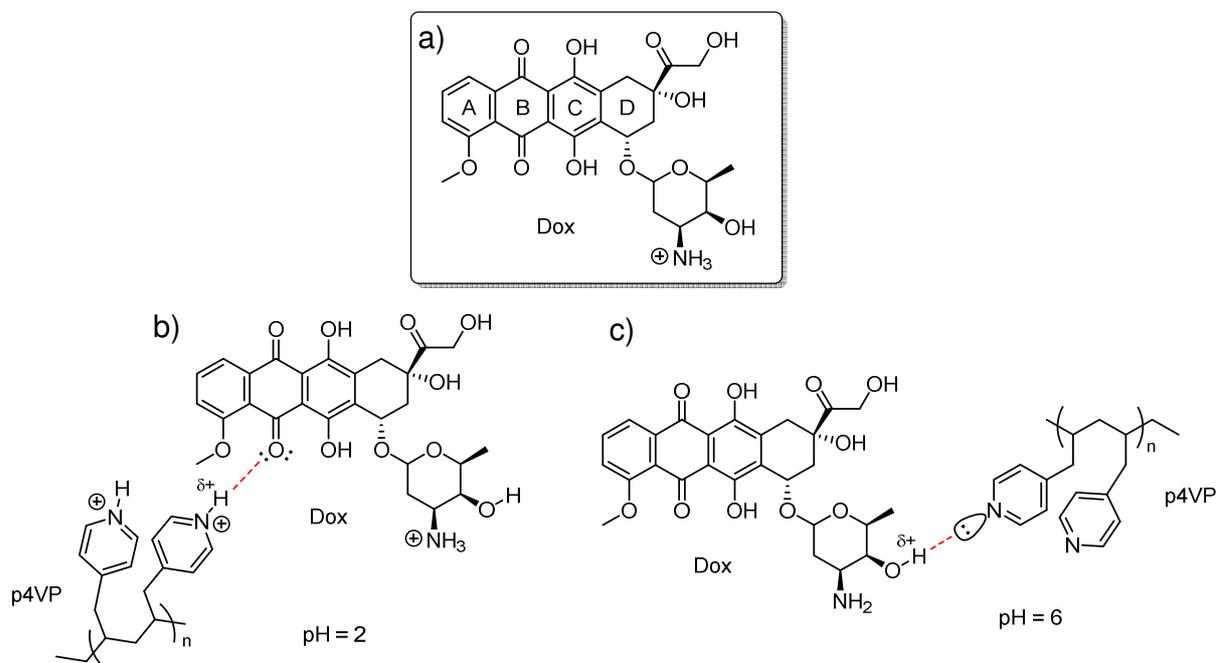


Figura 37. a) Estructura química de DOX. Representación esquemática de la interacción entre DOX y p4VP a b) pH = 2 y c) pH = 6.

También se ha evaluado la capacidad de atrapamiento de DOX en sistemas p4VP@Au mediante un análisis de RMN. En el espectro de RMN ¹H (figura 38, en agua deuterada, D₂O) se observan las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos de DOX (δ_H 7.47 y 7.22 ppm). En este análisis Se utiliza TSP (ácido trimetil-silil-propanoico) como patrón interno de concentración conocida.

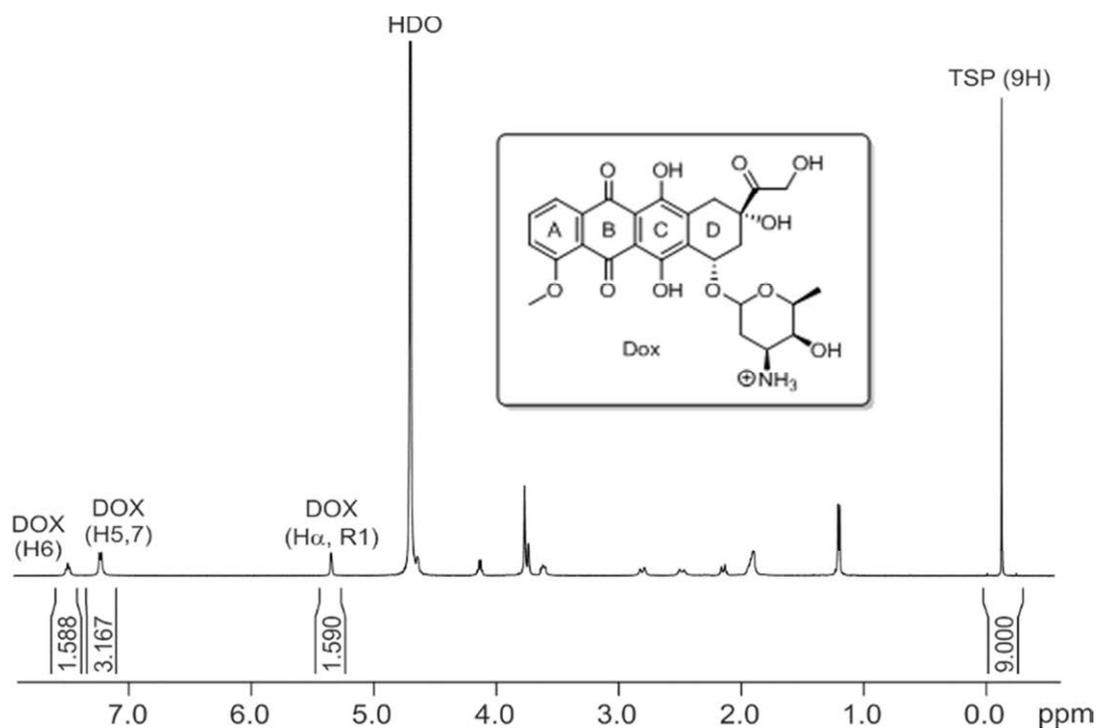


Figura 38. Espectro ^1H RMN (500.13 MHz).

La Tabla 2 resume la eficiencia de atrapamiento (encapsulation efficiency, EE) de la molécula de DOX, y la capacidad de carga (drug loading, DL), ambas expresadas como porcentaje, que se han calculado según las fórmulas (1) y (2):

$$(1) \text{EE}(\%) = \left(\frac{W_0 - W_s}{W_0} \right) \times 100$$

$$(2) \text{DL}(\%) = \left(\frac{W_t}{W_N} \right) \times 100$$

donde W_0 es la masa de fármaco añadido al comienzo del experimento, W_s la masa del fármaco encontrado en el sobrenadante, y W_N (905.1 μg) la masa de las nanopartículas empleada en los ensayos a dos valores diferentes de pH. W_t ($W_0 - W_s$) es la cantidad de compuesto activo atrapado en el sistema p4VP@Au.

Tabla 2: Datos referidos a la encapsulación de Doxorrubicina (DOX) en sistemas p4VP@Au como la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga.

Entrada	pH	t ₁ (h)	DOX atrapado (µg)	EE (%)	DL (%)
1	pH= 2	0.5	34.5 ± 0.02	1.8 ± 0.7	3.8 ± 0.1
2	pH= 2	12	133.5 ± 0.03	6.5 ± 1.0	14.7 ± 0.1
3	pH= 6	12	33.9 ± 0.02	1.6 ± 0.6	3.7 ± 0.1
4	pH= 2 → 6	0.5	40.5 ± 0.02	2.1 ± 0.7	4.5 ± 0.1
5	pH= 2 → 6	12	115.1 ± 0.03	6.0 ± 1.1	12.7 ± 0.1

De los resultados indicados en la Tabla 2 se deduce que cuando el recubrimiento de p4VP permanece hinchado (pH = 2), la cantidad de DOX atrapada aumenta con el tiempo, obteniéndose cargas de fármaco desde 3.8 ± 0.1 a 14.7 ± 0.1 %, en 0.5 y 12 h, respectivamente (entradas 1 y 2 de la Tabla 2). Es importante mencionar en este punto que la mayoría de las técnicas de fabricación de NPs están limitadas a cargas de fármacos en torno al 20 %, por lo tanto, un valor de DL de 14.7 % tiene un potencial significativo de atrapamiento. Por otro lado, cuando el sistema p4VP@Au se encuentra en el estado colapsado a pH = 6 (entrada 3, Tabla 2) la cantidad de DOX acumulada es mucho menor si se compara con el caso anterior, con una diferencia de eficiencia de atrapamiento de 4.9 % después de 12 h de exposición a las partículas. Finalmente, cuando se trata de encapsular el fármaco pasando del estado hinchado (pH = 2) al estado colapsado (pH = 6, entradas 4 y 5, Tabla 2), se observan resultados muy similares si se compara con tratamiento a pH = 2

pasados 30 min, pero con una disminución significativa de la cantidad de fármaco cargado, Wt de 133.5 a 115.1 μg , después de 12 h de exposición. Esta ligera diferencia tanto en EE como en DL se puede explicar considerando la filtración de algunas moléculas de DOX después de la contracción del microgel.^{134,135,136}

Ambos estudios han demostrado que la estructura híbrida sintetizada permite acumular moléculas, lo que podría ser de interés en aplicaciones biomédicas tales como administración de fármacos, captación celular o citometría de flujo.

4.2 NANOPARTÍCULAS MACIZAS DE pNIPAM.

4.2.1 Antecedentes.

PNIPAM es un microgel sensible a la temperatura, y se ha utilizado como recubrimiento para numerosos núcleos de tamaño nanométrico, como nanopartículas metálicas y magnéticas¹³⁷ así como puntos cuánticos y de carbono.^{138,139} Este material híbrido ha proporcionado numerosas aplicaciones en detección y catálisis.¹²⁹

El proceso de obtención de este tipo de nanogel de pNIPAM se lleva a cabo mediante polimerización radicalaria en presencia de un agente entrecruzante (*N,N'*-metilénbisacrilamida) y un iniciador (dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida)) (figura 39).

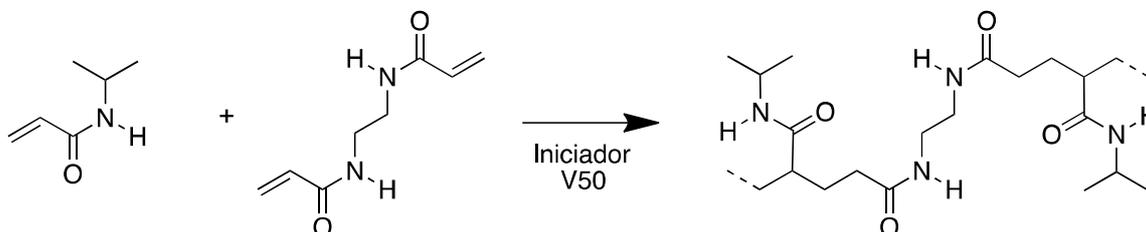


Figura 39. Proceso de polimerización a partir de NIPAM, el agente entrecruzante BA y el iniciador radicalario V50

La respuesta a las variaciones de temperatura por parte de este polímero se entiende teniendo en cuenta las interacciones intermoleculares entre las moléculas del disolvente y las del propio polímero. Así, a bajas temperaturas el pNIPAM es soluble en agua, ya que la red polimérica forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, siendo la interacción disolvente-polímero mayor que las interacciones polímero-polímero. A temperaturas mayores los

enlaces de hidrógeno se rompen, por lo que es mayor la interacción polímero-polímero provocando la contracción del polímero y que éste disminuya de tamaño. La temperatura crítica de solubilidad (LCST) a la que ocurre este fenómeno es de 32 °C para pNIPAM en agua.¹⁴⁰

En esta memoria se describen los resultados de obtención de nanogeles de pNIPAM aprovechando su respuesta a las variaciones de temperatura y su aplicación en la encapsulación de agentes activos. A continuación, se detallan estos resultados.

4.2.2 Síntesis y caracterización de pNIPAM@MZ.

La preparación de partículas macizas de pNIPAM (pNIPAM@MZ) se ha realizado de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.3.2 de este documento, el cual se basa en la polimerización radicalaria de *N*-isopropilacrilamida en disolución acuosa en presencia de un agente entrecruzante, llevándose a cabo la reacción a 70 °C. Las muestras así preparadas se analizan mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar su morfología y tamaño, y por resonancia magnética nuclear (RMN) se determina su composición.

En la figura 40 se incluyen dos imágenes TEM representativas, obtenidas de las muestras de pNIPAM@MZ. Del análisis dimensional de las imágenes se concluye que presentan una distribución de tamaño comprendido entre 490 ± 3.0 nm y 530 ± 5.5 nm (figura 40).

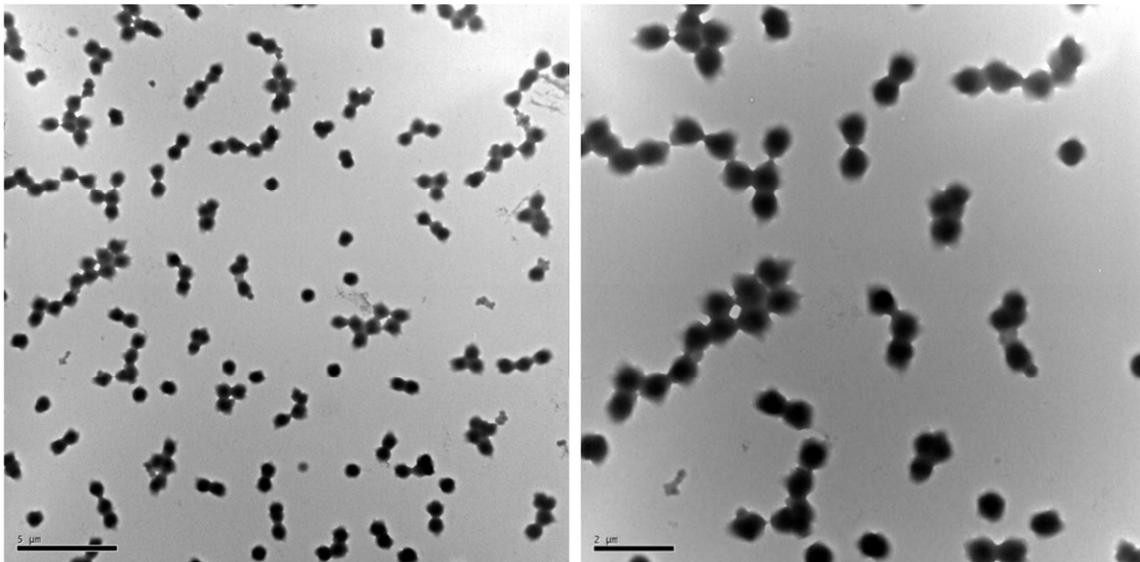


Figura 40. Imágenes TEM de pNIPAM@MZ.

La carga superficial de pNIPAM@MZ ha sido estudiada mediante el análisis del Potencial Zeta (figura 41) en dispersiones acuosas de las muestras. Como se observa en la imagen, el potencial medido es de 11.4 mV, lo que indica que la superficie se encuentra dentro del rango de carga óptimo para uso biomédico.¹⁴¹

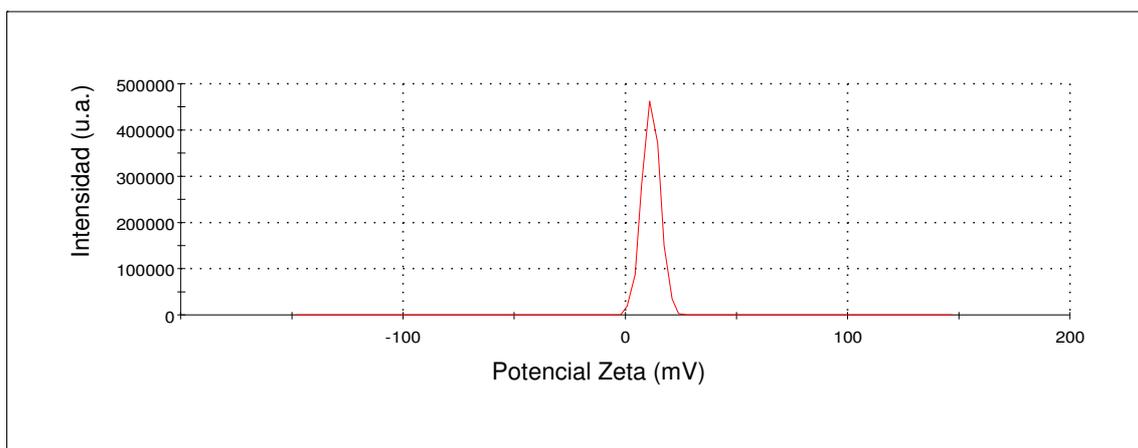


Figura 41. Gráfica de Potencial Zeta de nanopartículas pNIPAM@MZ.

La composición química de las muestras pNIPAM@MZ se analiza mediante espectroscopia μ Raman (figura 42). El espectro obtenido coincide con el de una muestra de pNIPAM puro, observándose como bandas más intensas y características las de 442, 845, 1162 y 1456 cm^{-1} . Este espectro se utiliza como referencia para las muestras de NPs modificadas de pNIPAM.

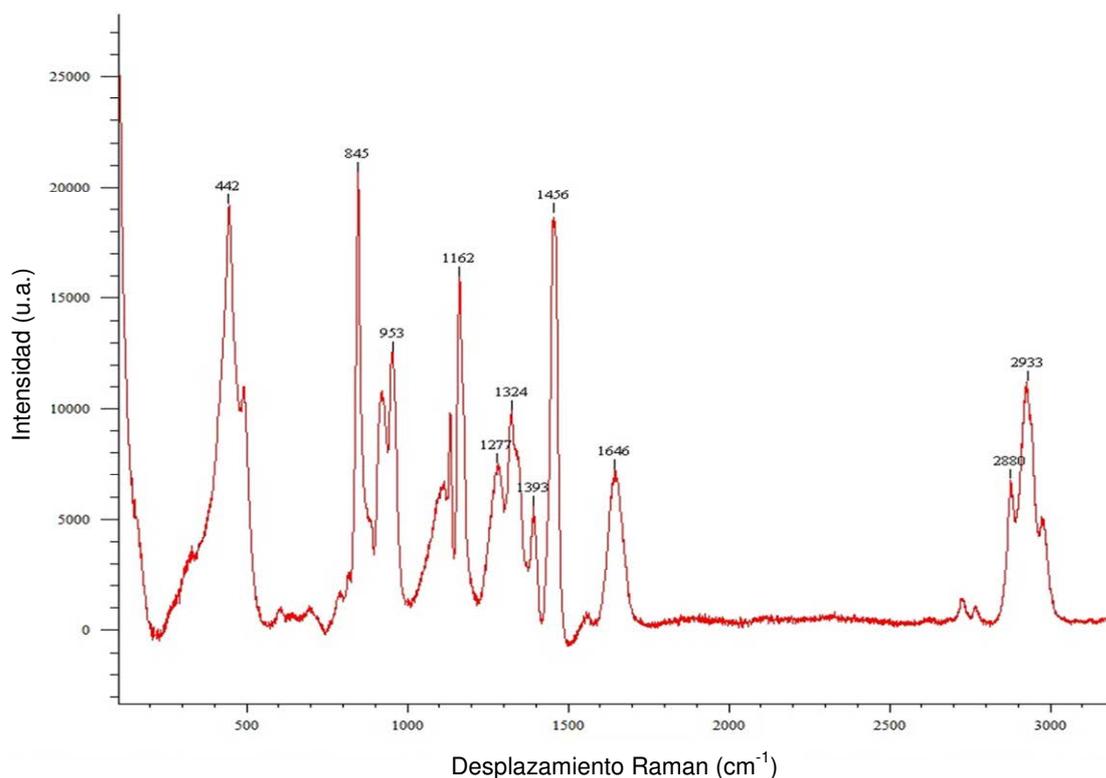


Figura 42. Espectro μ Raman de pNIPAM@MZ.

4.2.3 Funcionalización de pNIPAM@MZ con ácido 3-butenoico.

Como se ha comentado, la funcionalización superficial de NPs permite modular sus características para aumentar su efectividad y, por ejemplo, reducir los efectos secundarios. Además, permite utilizar los grupos funcionales que se incorporan a la superficie de anclaje para otras moléculas logrando, por ejemplo, una mayor afinidad con el medio o facilitando la purificación de los sistemas de NPs. Por tanto, el revestimiento de la superficie es crucial para

determinar sus propiedades, ya que, además, mejora la estabilidad, la solubilidad y el direccionamiento activo. Existen varias estrategias para el recubrimiento y funcionalización de nanopartículas que se pueden clasificar de acuerdo al tipo de compuesto utilizado. Éstos pueden ser recubrimientos que contienen silicio, compuestos de bajo peso molecular con grupos capaces de unirse a la superficie por afinidad o bien recubrimientos poliméricos.¹⁴²

En esta Tesis Doctoral, en la que se ha preparado sistemas poliméricos sobre núcleos metálicos, se han funcionalizado los microgeles con ácido 3-butenoico (3BA) durante el proceso de polimerización. El doble enlace polimeriza con el monómero de NIPAM, quedando la parte externa a la superficie funcionalizada con grupos COOH. Estos grupos funcionales carboxílicos sirven como punto de anclaje de moléculas orgánicas mediante reacción de amidación.

En este apartado se describen los resultados obtenidos en la funcionalización de la superficie de nanopartículas pNIPAM@MZ con 3BA obteniéndose sistemas pNIPAM@MZ-3BA. El proceso de obtención de estas NPs se lleva a cabo por adición de 3BA, *N,N'*-metilenbisacrilamida y dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) a la mezcla de polimerización, a una temperatura de 70 °C. De esta forma se consigue la incorporación de la molécula de 3BA al proceso de polimerización radicalaria (figura 43).

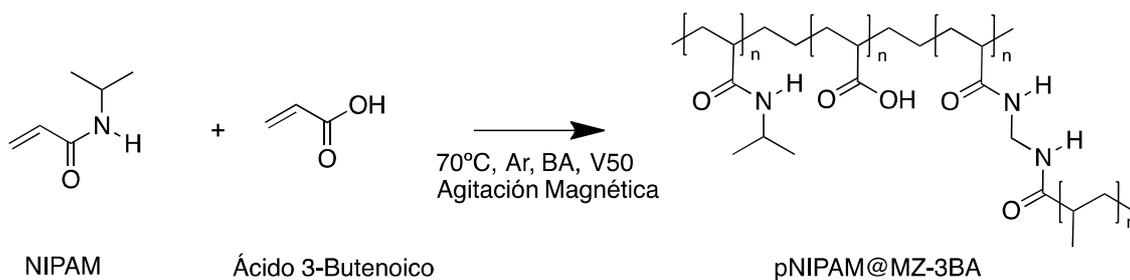


Figura 43. Funcionalización de pNIPAM con ácido 3-butenoico.

La caracterización morfológica de las muestras pNIPAM@MZ-3BA se llevó a cabo mediante microscopia TEM. En la figura 44 se incluyen imágenes de una muestra representativa. Del análisis dimensional de las imágenes se concluye que presenta una distribución de tamaño comprendido entre 519 ± 3.0 nm y 540 ± 5.5 nm (figura 44). Se puede observar que, aunque hay un ligero aumento de tamaño respecto a las NPs sin funcionalizar con 3BA, éste prácticamente no varía, con lo que, como era de esperar, la derivatización ácido 3-butenoico no produce aumento de tamaño de partícula ni agregación en las mismas.

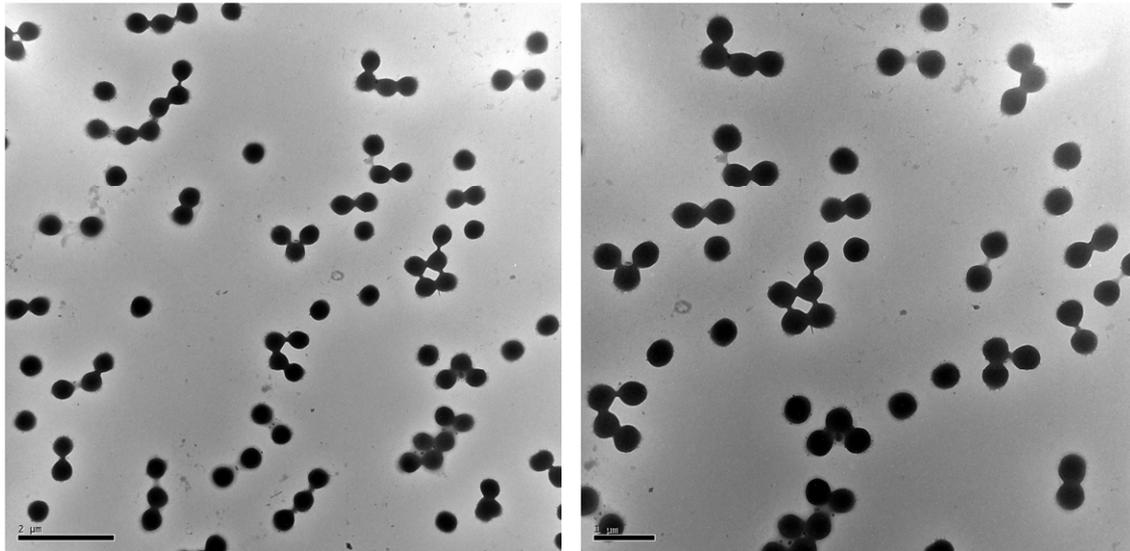


Figura 44. Imágenes TEM de nanopartículas pNIPAM@MZ-3BA.

La carga superficial de pNIPAM@MZ-3BA ha sido estudiada mediante el análisis del Potencial Zeta (figura 45) en dispersiones acuosas de las muestras. Como se observa en la imagen, el potencial medido es cercano a 0 mV, lo que indica que la superficie de la partícula es neutra y, por tanto, los grupos carboxilos presentes se encuentran protonados.

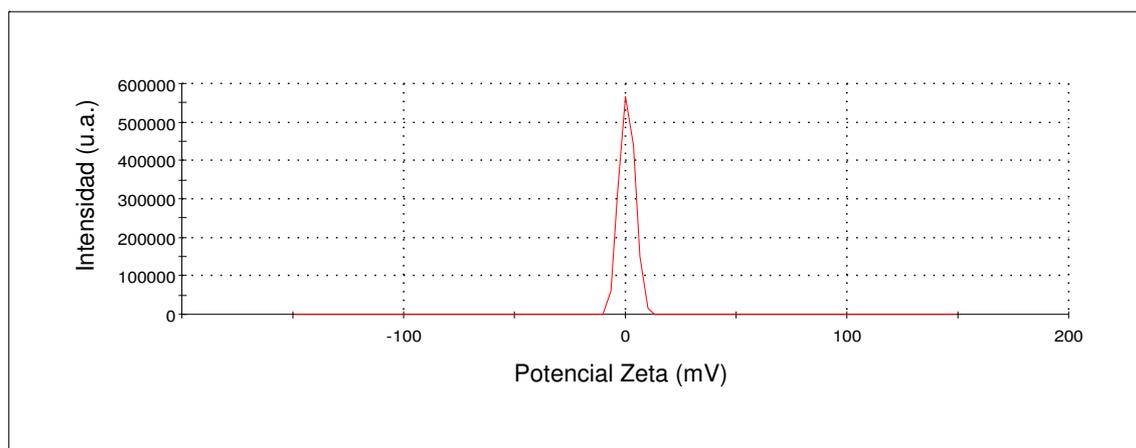


Figura 45. Gráfica de Potencial Zeta de nanopartículas pNIPAM@MZ-3BA.

La composición química de las muestras pNIPAM@MZ-3BA se analiza mediante espectroscopia μ Raman (figura 46). El espectro obtenido corresponde con el de una muestra formada en mayor medida por pNIPAM y ácido 3-butenoico (3BA) como compuesto minoritario. Se observan las bandas más intensas de pNIPAM (441, 845, 1162 y 1457 cm^{-1}) junto con las correspondientes no solapadas de 3BA (153, 603 y 790 cm^{-1}).

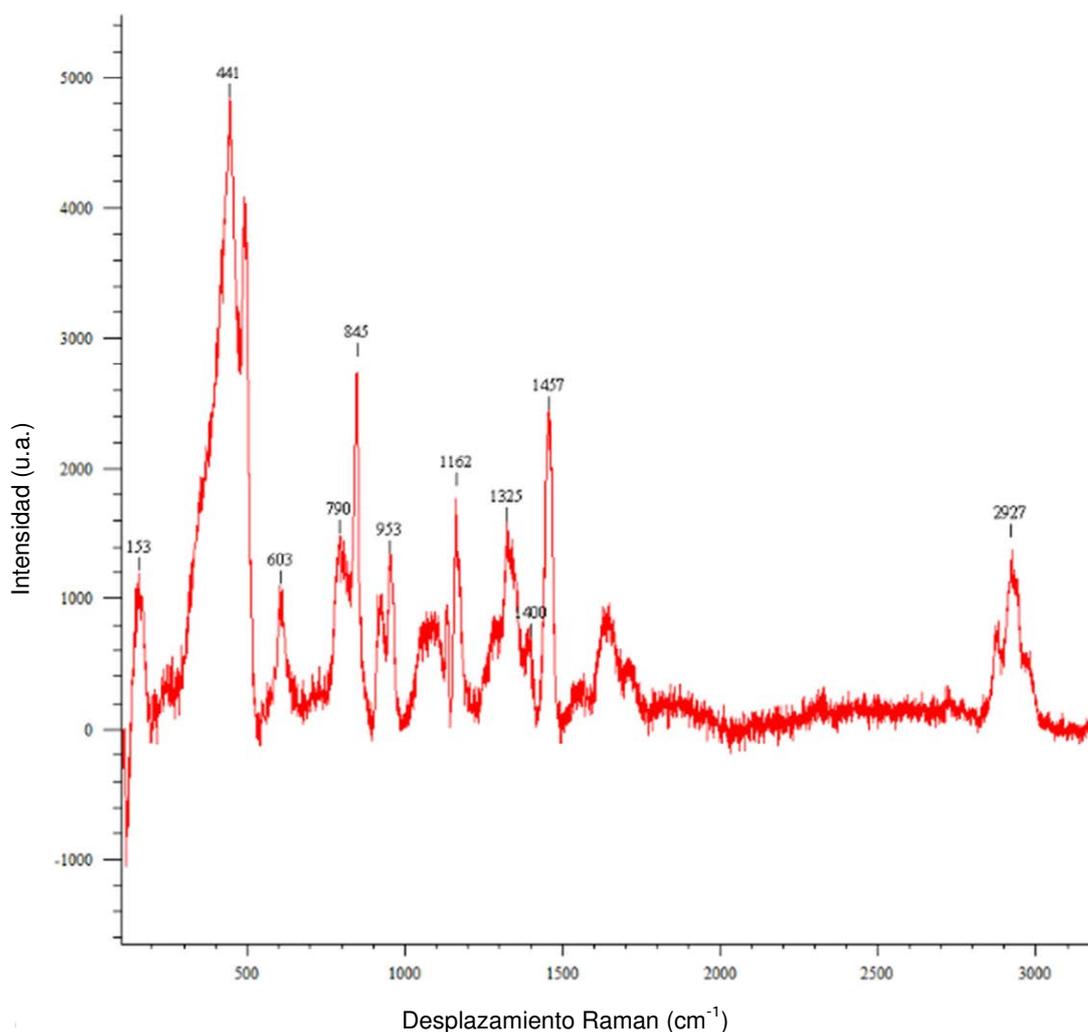


Figura 46. Espectro μ Raman de pNIPAM@MZ-3BA.

4.2.4 Funcionalización de pNIPAM@MZ-3BA con ácido fólico.

Las estrategias adoptadas para conseguir la orientación y acumulación de fármacos en las células tumorales se basan en dos métodos: el denominado *targeting (vectorización) pasivo* y el *targeting activo*.¹³

El *targeting pasivo* consiste en el transporte de nanopartículas debido al gradiente de concentración o al de carga eléctrica a través de espacios intracelulares hacia el intersticio tumoral y su posterior acumulación en estos tejidos. Este fenómeno se explica a partir del llamado efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) ya que se fundamenta en la fisiología característica de los capilares del tumor, cuyas células se encuentran frecuentemente separadas por espacios de entre 200 y 600 nm, permitiendo así el paso de nanoestructuras a través de ellas.¹⁴³ Además, la acumulación de las mismas en el tejido tumoral se ve favorecido por la pobre circulación linfática en este ambiente y la capacidad que tienen las células de tomar material del exterior.¹⁴⁴ Se han identificado una serie de parámetros que influyen en el acceso de las nanopartículas al tejido tumoral, como el tamaño, la carga superficial, la composición química y la hidrofilia de la superficie. De esta forma, las NPs deben presentar un tamaño inferior a 400 nm y la carga superficial debe ser neutra o catiónica para evitar la interacción con las células sanguíneas. En cuanto a los otros factores, las partículas hidrofílicas presentan mayor tiempo de circulación en el organismo ya que no resultan eliminadas tan fácilmente por lo que aumentan las probabilidades de que puedan acceder al tejido tumoral.¹⁴⁵

Por otro lado, el *targeting activo* hace referencia a la orientación forzada del fármaco, que en muchos casos se encuentra encapsulado en NPs, a través de

su funcionalización y no sólo por una simple acumulación en los tejidos tumorales. Varias son las técnicas empleadas en el desarrollo de sistemas de nanopartículas dotados de una orientación específica. Todas ellas se encuentran relacionadas con características bioquímicas y fisiológicas particulares del tumor y con la sobreexpresión de receptores, condiciones del medio tumoral, etc. Estas estrategias permiten la liberación selectiva del fármaco en la región tumoral, minimizando las reacciones adversas asociadas.¹⁴⁶ La unión específica se logra mediante mecanismos de reconocimiento molecular, de ahí la importancia de encontrar los ligandos adecuados para funcionalizar la superficie polimérica. Entre las estrategias utilizadas para conseguir una orientación adecuada de los agentes activos, en esta Tesis Doctoral se ha optado por realizar la funcionalización y vectorización con ácido fólico (FOL). Éste es una vitamina hidrosoluble (vitamina B₉) necesaria para la replicación del ADN. Su deficiencia dificulta la síntesis y la división celular, afectando sobre todo a las células de división rápida como las de la médula ósea. Una dieta baja en ácido fólico aumenta el riesgo de padecer alguna enfermedad tumoral sobre todo cáncer de colon y de mama¹⁴⁷ (figura 47).

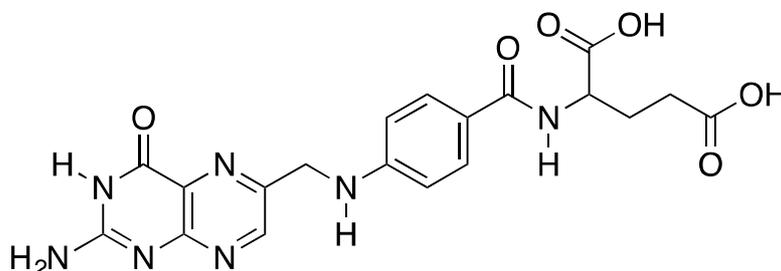


Figura 47. Ácido fólico.

El uso de FOL para direccionar fármacos se basa en que las células cancerosas presentan abundantes receptores folatos,¹⁴⁸ ya que necesitan este ácido para la síntesis de ADN.¹⁴⁹ Por tanto, la interacción de ácido fólico con estos receptores conduce a un proceso de endocitosis por parte de las células tumorales y, por consiguiente, una acumulación de los compuestos activos en el interior.

El uso combinado de ácido fólico con polímeros sensibles a diferentes estímulos, como 4-vinilpiridina (pH) y *N*-isopropilacrilamida (T), es una alternativa atractiva para mejorar la actividad de los fármacos encapsulados.^{150,151}

La encapsulación de fármacos en sistemas de NPs funcionalizadas con ácido fólico tiene como ventaja la de minimizar la toxicidad e incrementar el tiempo de vida media del fármaco en el organismo, como ha sido demostrado para 5FU.¹⁵²

La incorporación de FOL a la superficie de las partículas pNIPAM@MZ-3BA se realiza por activación con EDC y NHS de los grupos carbonilos presentes como resultado de la polimerización cruzada, y posterior adición de la diamina 2,2'-(etilendioxi) bis (etilamina) (EDBE). Por otro lado, el ácido fólico también se funcionaliza con EDC y NHS mediante una reacción de amidación que se lleva a cabo en las mismas condiciones anteriores. Visualmente se comprueba la presencia de FOL en las NPs por la coloración amarilla en las mismas después de purificarlas (figura 48).

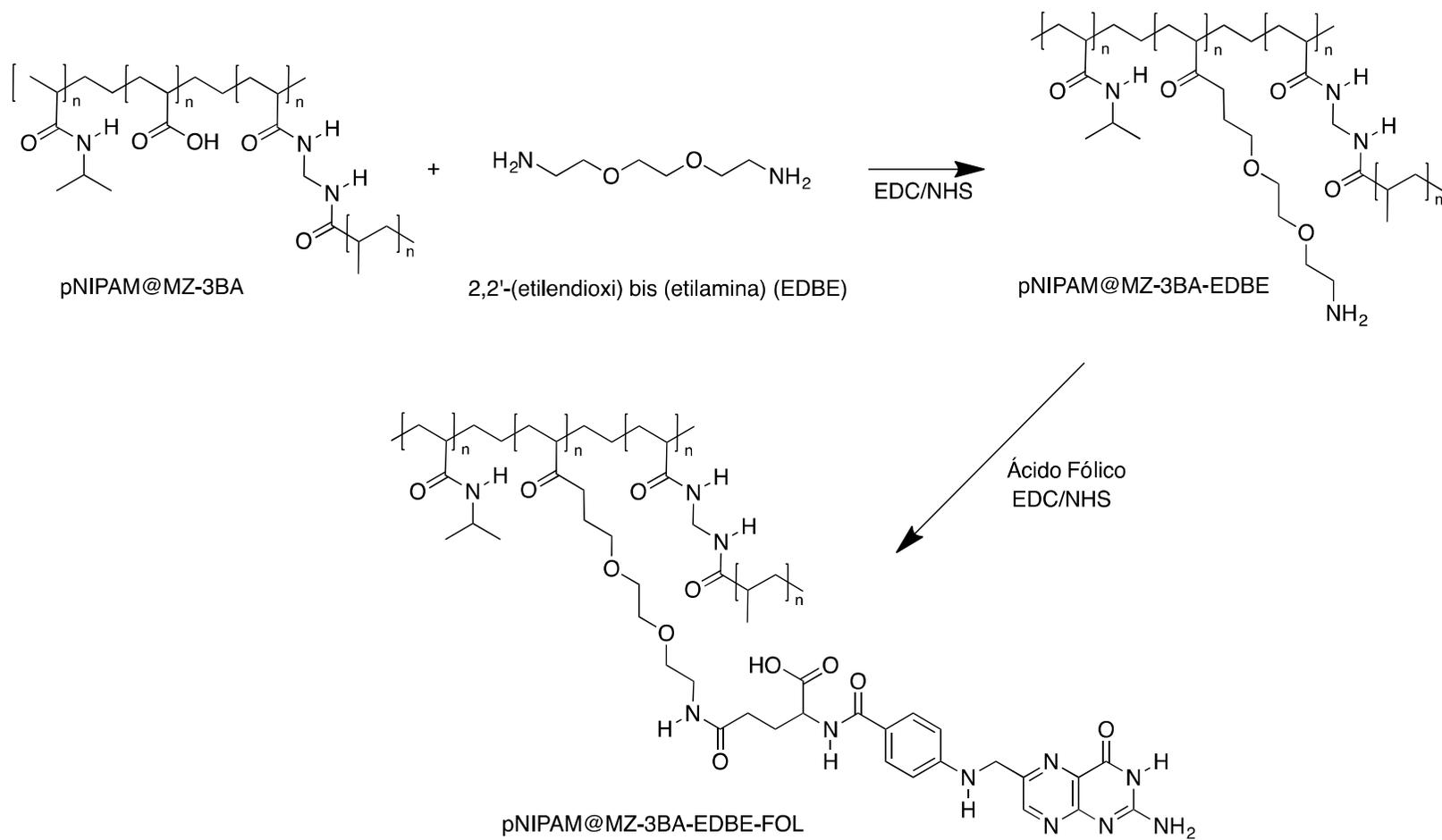


Figura 48. Funcionalización de pNIPAM@MZ-3BA con ácido fólico.

En la figura 49 se incluyen imágenes de las muestras de pNIPAM@MZ-3BA-FOL obtenidas por microscopia TEM que han servido para la caracterización de su morfología. Del análisis dimensional de las imágenes se concluye que presentan un diámetro de aproximadamente 519 ± 3.0 nm.

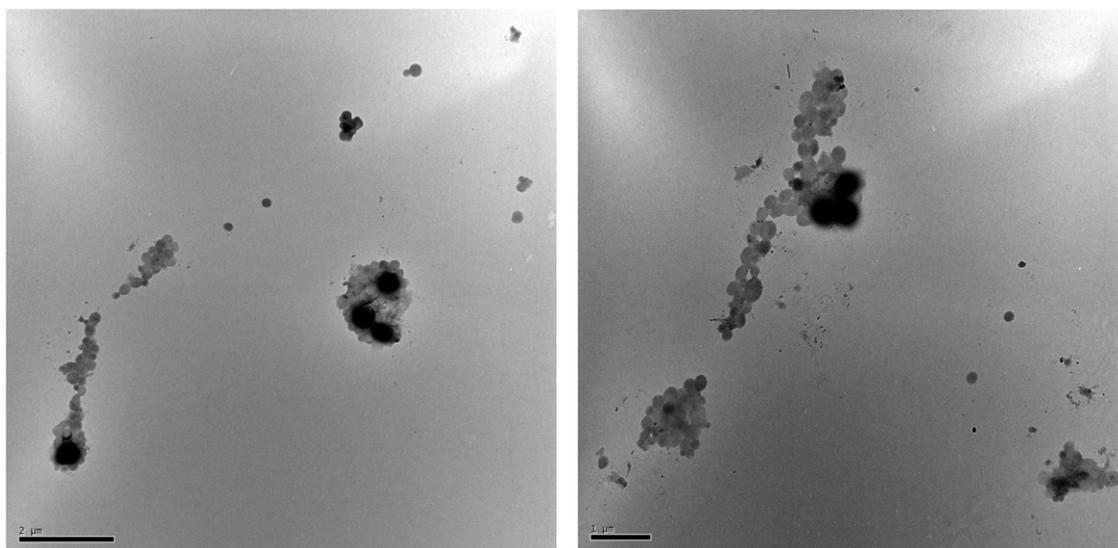


Figura 49. Imágenes TEM de nanopartículas pNIPAM@MZ-3BA-FOL.

La carga superficial de pNIPAM@MZ-3BA-FOL ha sido estudiada mediante el análisis del Potencial Zeta (figura 50) en dispersiones acuosas de las muestras. Como se observa en la imagen, el potencial medido es -0.57 mV, lo que indica que la superficie de la partícula presenta una carga neta negativa y, por tanto, el grupo carboxilo libre de la molécula de ácido se encuentra parcialmente desprotonado.

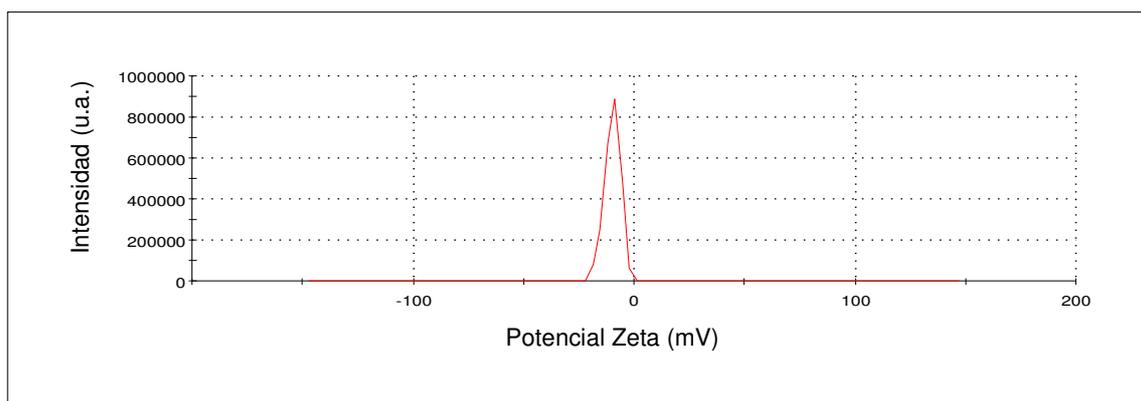


Figura 50. Análisis del Potencial Zeta de nanopartículas pNIPAM@MZ-3BA-FOL.

La composición química de las muestras sólidas de pNIPAM@MZ-3BA-FOL se analiza mediante espectroscopia μ Raman (figura 51). El espectro obtenido muestra dos bandas intensas a 1195 y 1609 cm^{-1} correspondientes al ácido fólico así como dos bandas pertenecientes al 3BA. Esto se explica, por una parte, en base a la concentración elevada de FOL respecto a la de pNIPAM@MZ-3BA utilizada en la preparación de las mismas, uniéndose a este hecho la alta absorción de la molécula de FOL en μ Raman y, por otra, a que la totalidad de moléculas de ácido fólico se fija en la superficie de las partículas, quedando expuestas a la irradiación con la luz láser.

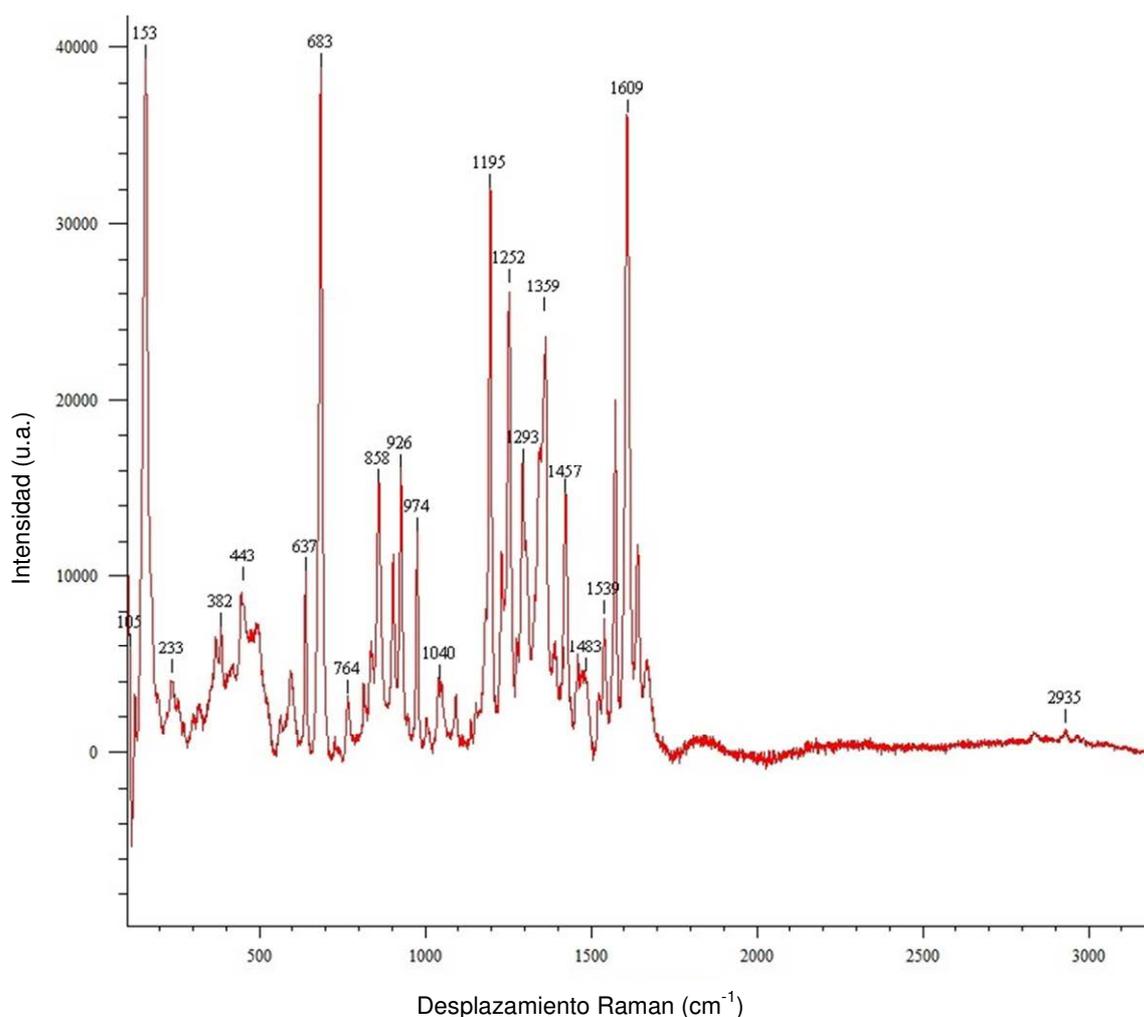


Figura 51. Espectro μ Raman de pNIPAM@MZ-3BA-FOL.

4.2.5 Encapsulación y actividad de sistemas pNIPAM con 5FU.

5-Fluorouracilo es un fármaco que ha sido estudiado en profundidad, tanto en lo que respecta a su actividad, como en lo referente a la vehiculización en sistemas de diverso tipo. Uno de los primeros estudios se refiere a su inclusión en sistemas poliméricos mixtos que incluyen ácido láctico-*N*-isopropilacrilamida y metacrilato, en un sistema que es dependiente del pH y de la temperatura.¹⁵³

A partir de este momento hay diversos estudios que implican el uso de polímeros mixtos derivados de *N*-isopropilacrilamida, en concreto, polimerizados con β -ciclodextrina,¹⁵⁴ con derivados de clorofilas,¹⁵⁵ con

quitosan¹⁵⁶ o, por ejemplo, con glicidil¹⁵⁷ o hidroximetacrilatos.¹⁵⁸ El uso de núcleos metálicos en la preparación de nanopartículas para el transporte de 5-Fluorouracilo también ha sido estudiado. En este sentido se han preparado partículas derivadas de oro, aprovechando la presencia de este núcleo metálico para, mediante luz infrarroja inducir y controlar la liberación del agente activo.¹⁵⁹ Un campo de reciente desarrollo es el de uso de micelas magnéticas termosensibles, las cuales se preparan con polímeros mixtos de NIPAM que incluyen una capa magnética de dextrano¹⁶⁰ o polimerizando el sistema de NIPAM simultáneamente a la incorporación del compuesto activo y preparando microesferas.¹⁶¹ En este último caso se ha analizado por métodos computacionales la interacción entre el polímero y el agente activo. El empleo de polielectrolitos en la preparación de micelas derivadas de NIPAM con alginatos y ácido acrílico también ha sido abordada.¹⁶²¹⁶³

En esta Tesis se avanza en la encapsulación de 5FU en sistemas macizos de pNIPAM. La encapsulación de 5FU se realizó por calentamiento a 40 °C de muestras de nanogel de pNIPAM (pNIPAM@MZ) con 5FU en concentraciones de 0.4 a 1.8 mg/mL. Para conseguir una mayor efectividad en el proceso, la mezcla se homogeneizó mediante ultrasonidos. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas.

La morfología de las partículas pNIPAM@MZ-5FU ha sido analizada por microscopía TEM (figura 52). Se observan nanopartículas esféricas de tamaños comprendidos entre 500 ± 3.0 nm y 510 ± 5.5 nm.^{164,165,166}

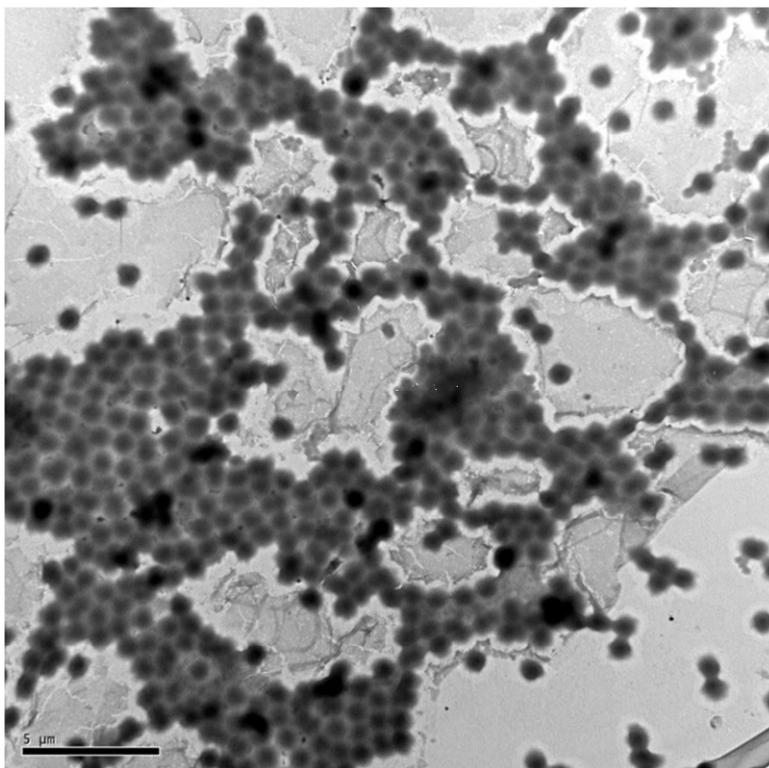


Figura 52. Imagen TEM de pNIPAM@MZ-5FU.

La presencia y la cantidad de 5FU en las muestras preparadas, pNIPAM@MZ-5FU, ha sido determinada por técnicas de RMN. Para ello, la muestra analizada liofilizada se reconstituye en MeOD- d_4 conteniendo la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-propionico-2,2,3,3- d_4 (0.15 %, w/v, TSP) como referencia interna para la calibración y cuantificación de los ensayos.

En el espectro de RMN ^1H realizado en $\text{MeOD-}d_4$ de una de estas muestras se observa un doblete bien definido debido a la molécula de 5FU (δ_{H} 7.57 ppm), y por ello fue seleccionado para la integración y comparación con la integral obtenida para el patrón interno TSP (figura 53).

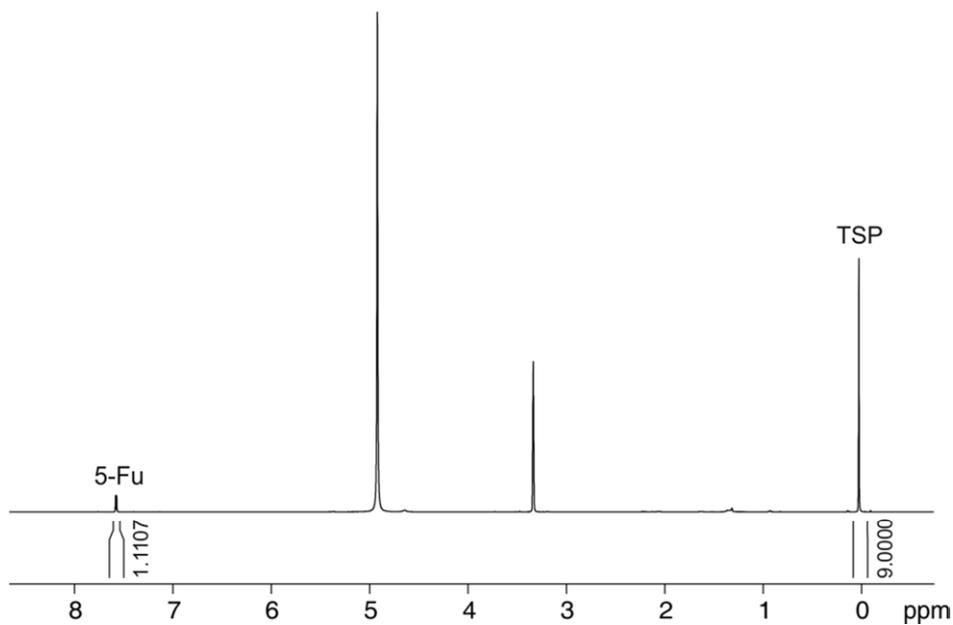


Figura 53. Espectro RMN ^1H (500.13 MHz) de pNIPAM@MZ-5FU en $\text{MeOD-}d_4$.

En la Tabla 3 se resume la eficiencia de atrapado (EE) de 5FU por parte de las partículas pNIPAM@MZ, así como el resultado de carga de fármaco en ellas (DL), ambos expresados en porcentaje. Tanto EE como DL han sido calculados según las fórmulas (1) y (2) incluidas en el estudio por RMN de encapsulación de Doxorubicina en nanopartículas corteza@núcleo de p4VP. Todas las muestras se analizan por duplicado.

Tabla 3: Cantidad de 5FU atrapado, eficiencia de atrapado y carga de compuesto activo obtenidos para pNIPAM@MZ-5FU.

5FU atrapado (μg)	EE (%)	DL (%)
47.4	5.9	11.9
48.3	6.0	12.1

Los valores bajos encontrados en EE y DL obtenidos puede ser atribuida a la buena solubilidad de 5FU en disoluciones acuosas e hidroalcohólicas, que compite con el atrapado por parte del polímero.

Por otro lado, la presencia de 5FU en los sistemas de NPs funcionalizadas pNIPAM@MZ-3BA-FOL-5FU, se ha analizado mediante espectroscopía μRaman comparando el espectro de 5FU (figura 54 a) y el de las muestras con el agente activo incorporado (figura 54 b). Los picos obtenidos a 769, 1228 y 1352 cm^{-1} son característicos de la molécula de 5 FU. La señal procedente de las NPs de pNIPAM@MZ-3BA-FOL es más débil, pero se observan picos a 684 y 154 cm^{-1} .

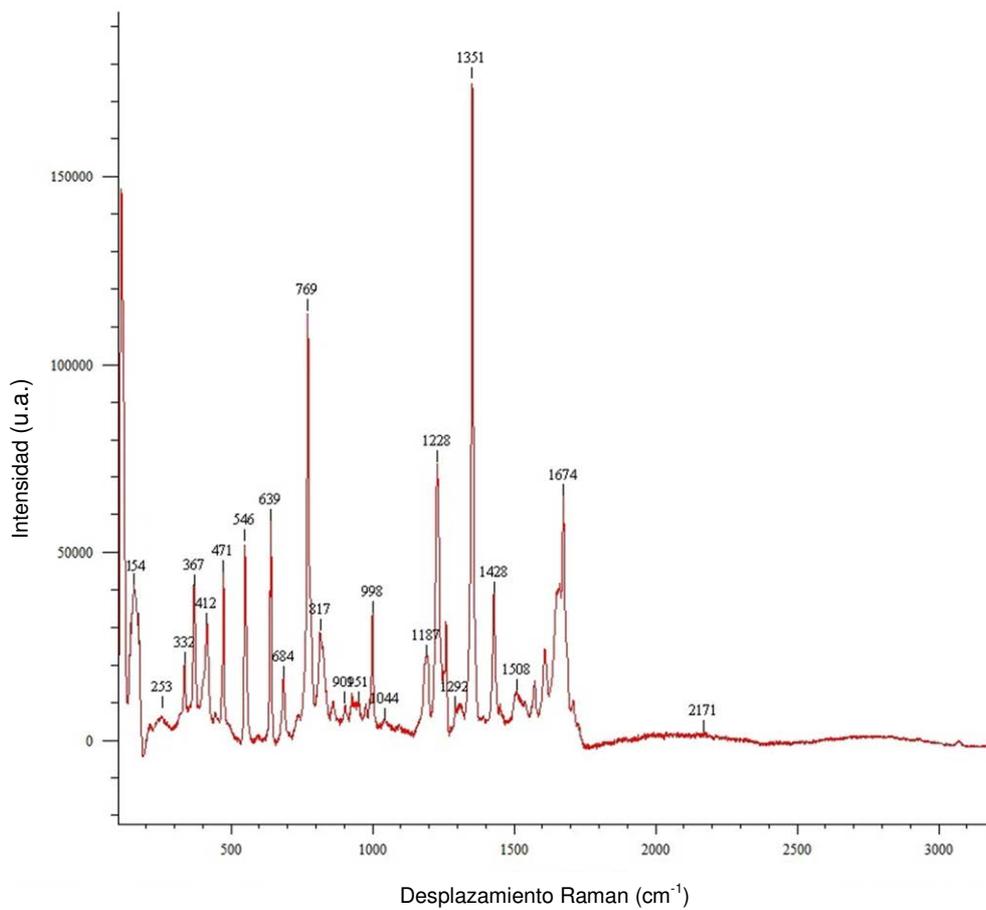
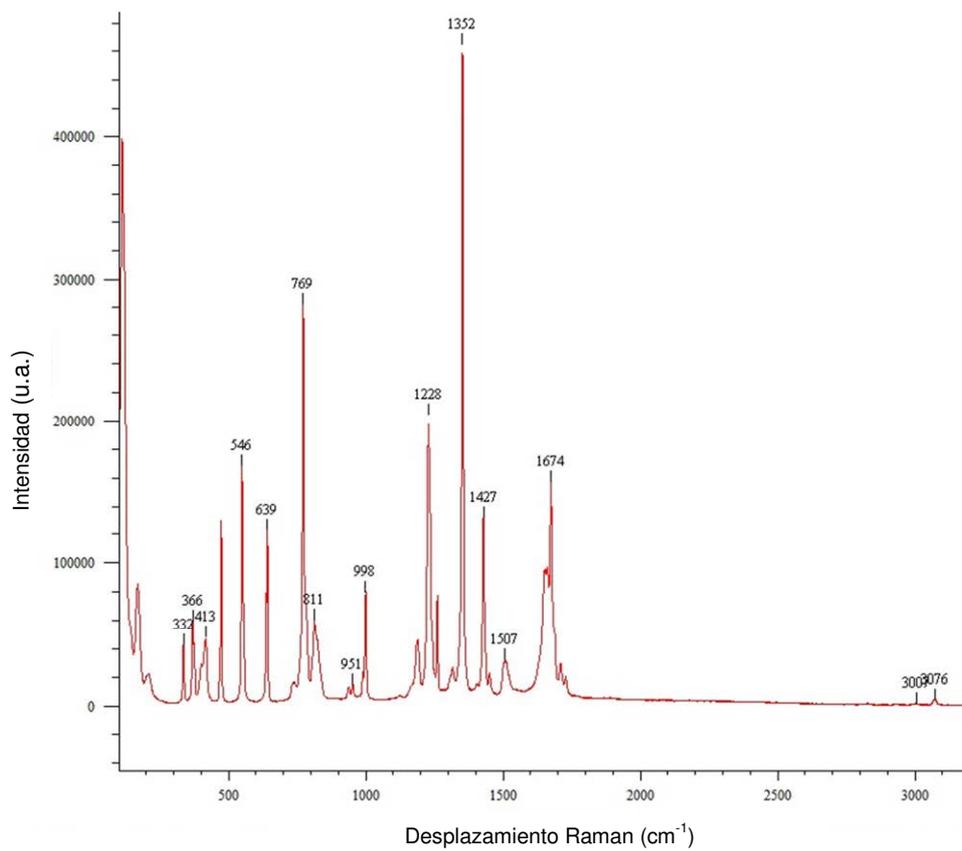


Figura 54. Análisis μ Raman de a) 5FU y b) pNIPAM@MZ-3BA-FOL-5FU.

El estudio de la toxicidad de los sistemas de pNIPAM ha sido realizado en la línea tumoral de colon T84. Este tipo de tumor es especialmente sensible a este fármaco. En cuanto a la toxicidad de los sistemas formados con pNIPAM (pNIPAM@MZ, pNIPAM@MZ-3BA y pNIPAM@MZ-3BA-FOL), ninguno de ellos ha mostrado ser tóxico para la línea celular T84 después de 72 h de tratamiento y en concentraciones desde 0.05 hasta 10 μM .

La proliferación celular en la línea T84 bajo tratamiento con pNIPAM@MZ-5FU y el fármaco libre es similar. Esto indica que no hay mejora del efecto de 5FU por inclusión en este tipo de nanopartículas (figura 55), aunque sí lo igualan.

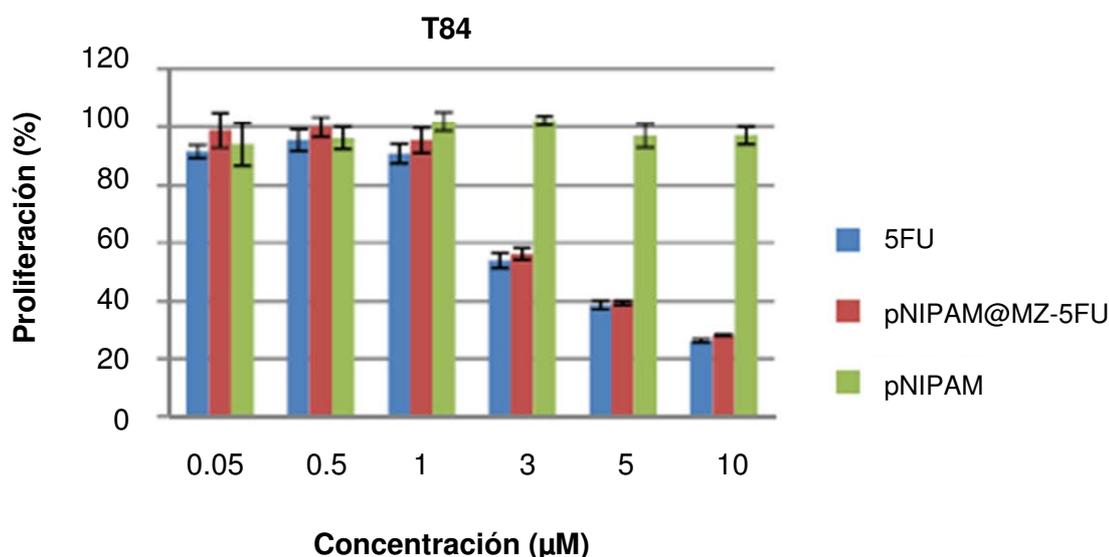


Figura 55. Estudio de la citotoxicidad de 5FU y pNIPAM@MZ-5FU en células tumorales de colon (T84).

Los ensayos con sistemas pNIPAM funcionalizados con ácido fólico y/o ácido 3-butenoico han sido similares a las muestras anteriores: 72 h de tratamiento con concentraciones en el intervalo desde 0.05 hasta 10 μM de 5FU.

La proliferación celular en la línea T84 bajo tratamiento con sistemas funcionalizados con ácido 3-butenoico es similar al obtenido por tratamiento con el fármaco. No obstante, las muestras vectorizadas con ácido fólico

(pNIPAM@MZ-3BA-FOL-5FU) logran una menor proliferación celular cuando las concentraciones son cercanas a 3 μM de 5FU (figura 56). Este hecho puede ser atribuido a la presencia de FOL en la superficie de las partículas, no obstante, es necesario avanzar en este estudio para confirmar este hecho.

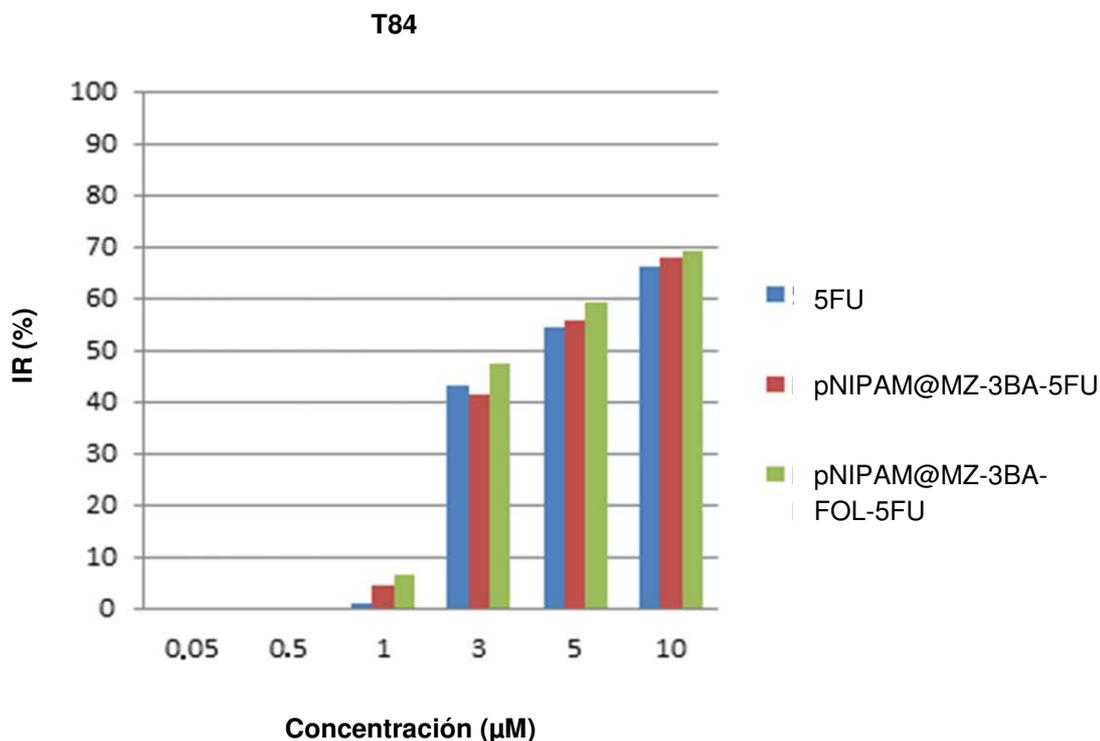


Figura 56. Estudio de la actividad de 5FU, pNIPAM@MZ-3BA-5FU y pNIPAM@MZ-3BA-FOL-5FU en células tumorales de colon (T84).

Además de 5FU se ha llevado a cabo el atrapado de PTX para muestras de pNIPAM siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.5. El resultado en este caso ha sido la precipitación del fármaco y, por tanto, la no encapsulación del mismo.

4.3 NANOPARTÍCULAS CON NÚCLEO MAGNÉTICO: p4VP@Fe₃O₄ Y pNIPAM@Fe₃O₄

4.3.1 Antecedentes.

Las nanopartículas de óxido de hierro, principalmente de magnetita (Fe₃O₄) y maghemita (γ -Fe₂O₃), se utilizan desde hace años en aplicaciones como el almacenamiento de datos, la catálisis o la biomedicina.¹⁶⁷ En este último campo, este tipo de NPs se emplean en la purificación de biomoléculas, para el diagnóstico mediante imagen por resonancia magnética o para la liberación de fármacos. Todo esto es posible gracias al carácter superparamagnético que presentan, en parte debido a su tamaño nanométrico. Este comportamiento se define por poseer una alta susceptibilidad magnética propia de los materiales ferro y ferrimagnéticos, pero con la característica de variar el sentido de los spines magnéticos bajo la influencia de la temperatura como ocurre en el paramagnetismo. Una consecuencia derivada de este comportamiento es que una vez fuera de la influencia de un campo magnético estas NPs no presentan ninguna magnetización. Este hecho es fundamental ya que implica la utilización de las mismas *in vivo* sin que tengan ninguna actividad magnética.¹⁶⁸

Por otro lado, como ocurre en otros tipos de nanopartículas, debido a la elevada relación superficie-tamaño que presentan, tienden a agregarse para minimizar la energía superficial. Por ello, es determinante la presencia de agentes estabilizadores que recubran la superficie de las mismas. Entre las estrategias utilizadas se encuentra la unión de moléculas orgánicas como polímeros o biomoléculas, o bien el recubrimiento con diversos materiales inorgánicos como SiO₂. En muchos casos estos materiales surfactantes no sólo

estabilizan las NPs sino que permiten su posterior funcionalización para su aplicación en los campos mencionados (figura 57).

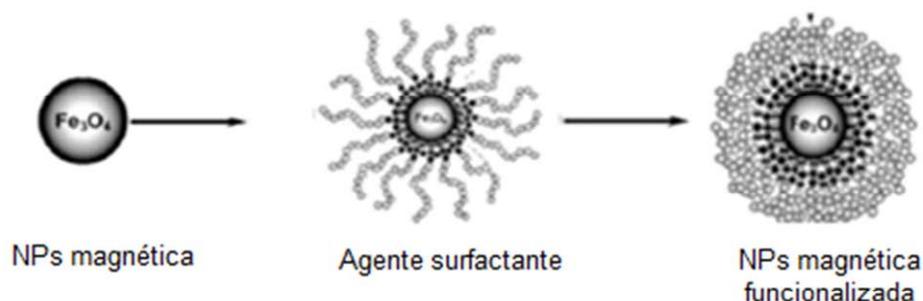


Figura 57. Esquema de la funcionalización de NPs magnéticas con el uso de agentes surfactantes.

Entre los métodos de preparación de Fe_3O_4 @NPs desarrollados en los últimos años con aplicaciones en medicina, destacan el de coprecipitación y el de descomposición térmica,¹⁶⁹ aunque existen otras técnicas como la pirolisis láser, la síntesis hidrotermal, la microemulsión y la síntesis sonoquímica. De forma breve se describen, a continuación, los dos métodos principales:

Coprecipitación: Este método consiste en la mezcla de iones férrico y ferroso en una proporción molar 1:2 en disoluciones. El tamaño y forma de las NPs obtenidas dependen del tipo de sal empleada (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la proporción de iones férrico y ferroso, la temperatura de reacción, los valores de pH, la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y la velocidad de adición de la disolución básica. La principal ventaja de esta aproximación es que las muestras obtenidas son directamente hidrofílicas y, por lo tanto, estables en medios acuosos. Sin embargo, una desventaja importante es que el número de grupos funcionales presentes en la superficie para una posterior biofuncionalización es reducido, el tamaño de partícula también es bajo (≤ 4

nm) con lo que la componente magnética también es reducida, complicando la obtención de muestras biológicamente activas.¹⁷⁰

Descomposición térmica: Este tipo de reacción está basada en procesos de descomposición de compuestos de hierro en disolventes orgánicos a altas temperaturas. Este método permite un gran control sobre el tamaño de las partículas pudiendo obtenerse tamaños desde los 4 nm a los 20 nm en función de las condiciones. Las NPs así generadas muestran una muy buena cristalinidad y homogeneidad de tamaños y formas. Para obtener NPs de mayor tamaño se pueden utilizar disolventes de mayor punto de ebullición. En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de Fe₃O₄@NPs usando el método de descomposición térmica a partir de acetilacetonato de hierro (III) con ácido undecilénico en éter dibencílico.⁹²

El interés en las nanopartículas magnéticas deriva de las propiedades físicas de su núcleo y en la capacidad que poseen para unir moléculas en su superficie. Los sistemas corteza@núcleo de Fe₃O₄ más sencillas están formados por un núcleo magnético y una envoltura polimérica. Su pequeño tamaño posibilita su interacción con estructuras celulares por lo que poseen un amplio espectro de aplicaciones tanto en el campo del diagnóstico como en el tratamiento de patologías como cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.¹⁷¹ La envoltura polimérica proporciona a las NPs magnéticas una estabilidad fisiológica y además suministra los grupos funcionales necesarios para que se puedan unir distintas moléculas biológicas como anticuerpos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos dotando así a las NPs de una alta especificidad hacia los tejidos tumorales.¹⁷² La utilidad de usar Fe₃O₄ como núcleo viene dada por su alta biocompatibilidad y fácil degradación

en el organismo, así como su vectorización mediante un campo magnético externo. Después de ser metabolizadas, los iones de hierro de estas partículas son añadidos a los depósitos de hierro del organismo y finalmente incorporados por los eritrocitos como parte de la hemoglobina.¹⁷³

En ausencia de un recubrimiento polimérico las Fe_3O_4 @NPs muestran superficies hidrofóbicas que facilitan la formación de aglomerados entre ellas dando lugar a agregados de gran tamaño. Estos agregados son incompatibles con su utilización en aplicaciones biomédicas debido a la alta posibilidad de producirse obstrucciones en los pequeños capilares. Por tanto, la cubierta polimérica previene la aglomeración de las partículas y facilita el atrapado de moléculas y su posterior liberación controlada.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado los polímeros derivados de 4-vinilpiridina y *N*-isopropilacrilamida para recubrir Fe_3O_4 @NPs.^{174,175,176,177}

A continuación, se describen los resultados de preparación de estos sistemas poliméricos con núcleos magnéticos.

4.3.2 Síntesis y caracterización de sistemas p4VP@ Fe_3O_4 y pNIPAM@ Fe_3O_4

La preparación del núcleo magnético (Fe_3O_4 @NPs) se ha llevado a cabo siguiendo el método de descomposición térmica con ácido undecilénico,⁹² empleando acetil acetato de hierro (III) como precursor del núcleo metálico y calentando la muestra desde 200 °C hasta alrededor de 500 °C, bajo una corriente de argón y agitación. Finalmente, la muestra de Fe_3O_4 @NPs se dispersa en etanol.⁹²

La preparación de NPs magnéticas con núcleo polimérico se ha llevado a cabo utilizando ácido 3-butenoico (3BA) con el objetivo de incorporar el grupo vinílico necesario para la formación del microgel sobre el núcleo de óxido de hierro.²⁵

La preparación de sistemas de partículas del tipo p4VP@Fe₃O₄ y pNIPAM@Fe₃O₄ se ha realizado de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4.2 de este documento. El proceso se inicia a partir de una disolución de Fe₃O₄@NPs, 350 μL (3.7% en peso) en 10 mL de agua, preparada a partir del método de descomposición térmica. Una vez funcionalizada la partícula magnética con ácido 3-butenoico, se lleva a cabo el proceso de polimerización tanto en el caso de 4-vinilpiridina (p4VP@Fe₃O₄) como para *N*-isopropilacrilamida (pNIPAM@Fe₃O₄).

4.3.2.1 Sistemas p4VP@Fe₃O₄.

Los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran imágenes de NPs con una distribución de tamaño en el intervalo de 295 ± 4.0 nm a 315 ± 4.0 nm de diámetro. En la figura 58 se incluyen dos imágenes de una muestra p4VP@Fe₃O₄. Como los sistemas p4VP@Fe₃O₄ están compuestos por varios núcleos magnéticos, no se observa una estructura tipo corteza@núcleo similar a la del polímero crecido sobre nanopartículas de metales nobles, como oro o plata. En su lugar se observa la estructura de nanopartícula formada por polímero (zona en gris más claro en la imagen de la figura 58) con núcleos de Fe₃O₄ (indicados por flechas rojas en la imagen de la figura 58).

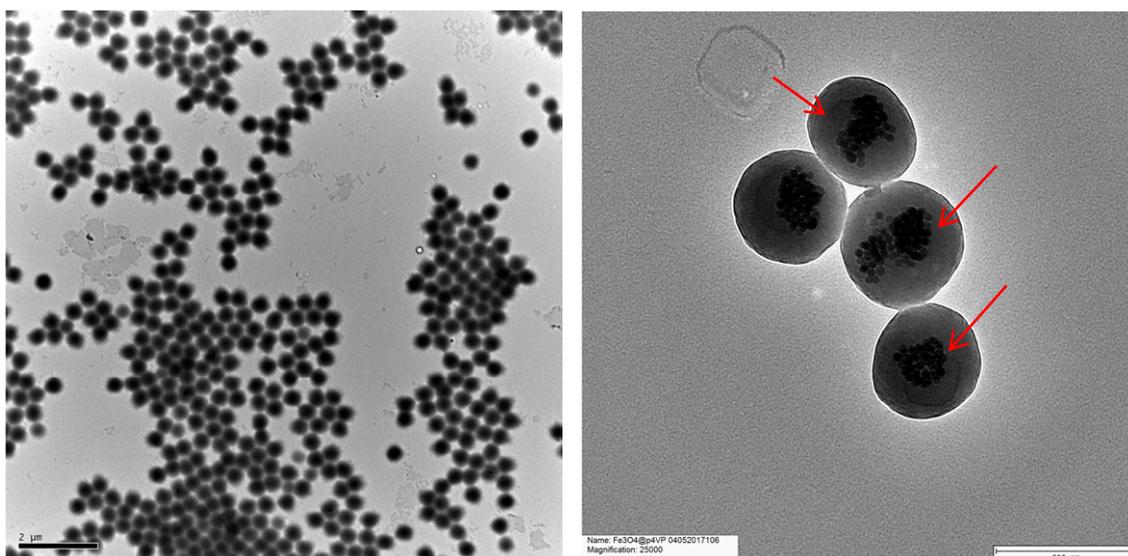


Figura 58. Imágenes TEM de nanopartículas de p4VP@Fe₃O₄.

Por otra parte, en el análisis de la carga superficial aparente en dispersiones acuosas de las muestras, se observa un valor positivo, lo que sugiere una protonación parcial del anillo de piridina presente en p4VP@Fe₃O₄ (figura 59).

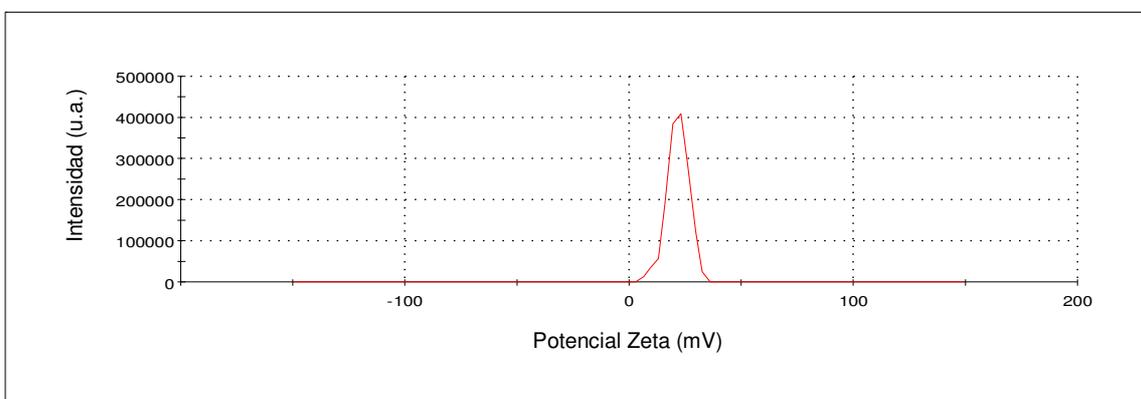


Figura 59. Gráfica de Potencial Zeta de muestras de p4VP@Fe₃O₄.

4.3.2.2 Sistemas pNIPAM@Fe₃O₄.

La morfología y tamaño de las muestras de pNIPAM@Fe₃O₄ se ha analizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la figura 60 se muestran dos imágenes representativas de las mismas. Del análisis dimensional se deduce una distribución de tamaño medio de 250 ± 1.0 nm de diámetro. Este tamaño es coincidente con el observado en bibliografía para nanogeles de pNIPAM, donde el nanogel está formado por pequeñas subunidades del mismo lo que sugiere que la inclusión de núcleos de magnetita no afecta de forma significativa el tamaño de la partícula de pNIPAM.¹⁷⁸

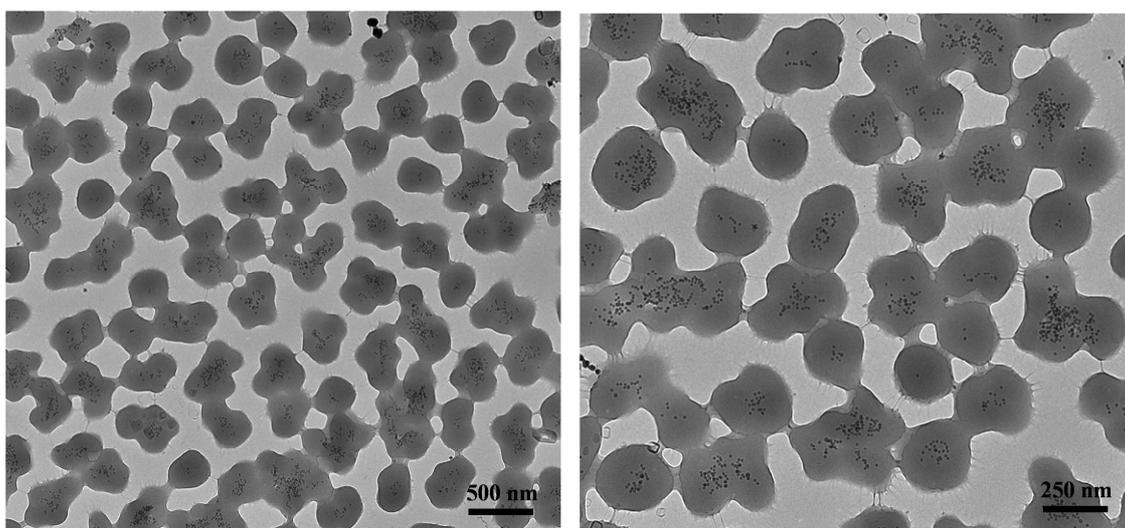


Figura 60. Imágenes TEM de nanopartículas de pNIPAM@Fe₃O₄.

Asimismo, se observa en la imagen de la figura 60 una menor opacidad de pNIPAM@Fe₃O₄ respecto a las formadas por p4VP@Fe₃O₄. Este hecho era de esperar ya que el nanogel formado por pNIPAM es menos compacto que el formado por p4VP.

Las nanopartículas de pNIPAM@Fe₃O₄ obtenidas se han funcionalizado con ácido 3-butenoico y ácido fólico con objeto de comparar su citotoxicidad una

vez incorporan 5FU. La preparación de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA (que no se aísla), se ha realizado por tratamiento de ácido 3-butenoico durante 3 h, a 70 °C. Una vez las partículas han sido tratadas, una disolución de las mismas se activa con EDC y NHS, para añadir, en primer lugar, la diamina EDBE y, en segundo, ácido fólico, obteniéndose las partículas pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL (apartado 3.4.4).¹⁷⁹

En la figura siguiente (figura 61) se muestran dos imágenes representativas de partículas pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL. El análisis de tamaños indica valores medios cercanos a 250 ± 1.0 nm de diámetro. Este tamaño es similar al de las muestras no tratadas con 3BA y FOL, lo que parece indicar que la modificación es sólo superficial en las mismas. Asimismo, las NPs muestran poca agregación, lo que confirma de nuevo que 3BA es un buen agente para evitarla.

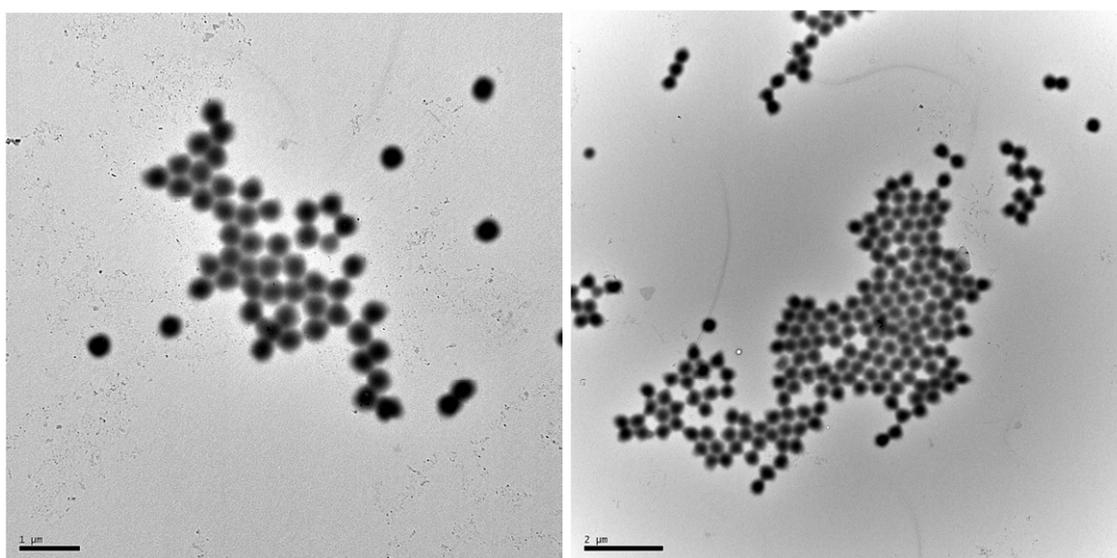


Figura 61. Imágenes TEM de nanopartículas pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL.

Por último, hay que indicar que se observa en todas las muestras una mayor opacidad respecto a las no tratadas con 3BA y FOL, lo que puede indicar, de forma indirecta, la incorporación de ambas moléculas a las muestras de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL ya que el polímero se encuentra formado ahora también por unidades de 3BA. La presencia de grupos ácidos en la superficie de las partículas se confirma mediante el análisis de la carga superficial (figura 62). Se observa un valor del potencial cercano a 0 mV lo que indica la presencia de grupos carboxilos protonados en la superficie.

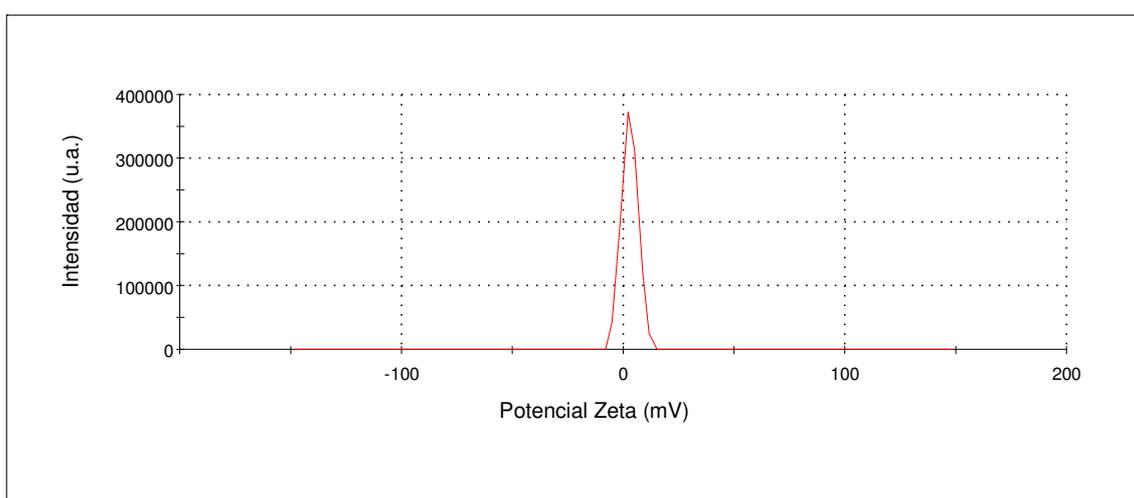


Figura 62. Potencial Zeta de pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL.

4.3.3 Encapsulación de fármacos: 5-Fluorouracilo.

El estudio preliminar de citotoxicidad de los sistemas magnéticos de p4VP y pNIPAM ha sido realizado en las líneas celulares tumorales de colon T84 y HT29, respectivamente.

Se ha analizado los sistemas p4VP@Fe₃O₄-5FU, pNIPAM@Fe₃O₄-5FU y pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL-5FU, y sus respectivos blancos p4VP@Fe₃O₄, pNIPAM@Fe₃O₄ y pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL con objeto de comparar la

actividad de 5FU libre, encapsulado en p4VP y encapsulado en pNIPAM activado con ácido fólico.^{180,181}

En cuanto a la toxicidad de estos sistemas, ninguno de ellos ha mostrado ser tóxico para las líneas celulares T84 y HT29, empleando concentraciones de agente activo desde 0.05 hasta 10 μM , y a lo largo de 72 h de tratamiento.

En cuanto a la citotoxicidad encontrada para 5FU en estos sistemas, la proliferación celular tanto en línea T84 como en la HT29 son similares cuando se tratan con el fármaco libre y con el fármaco encapsulado, es decir, las nanopartículas no mejoran pero sí igualan el efecto del fármaco libre (figuras 63 y 64).

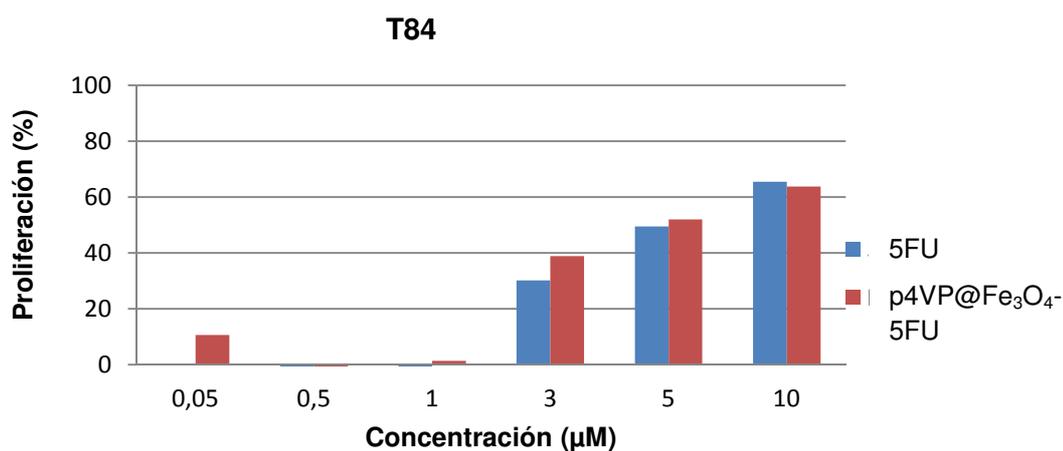


Figura 63. Proliferación celular de la línea T84 bajo tratamiento con el sistema p4VP@Fe₃O₄-5FU.

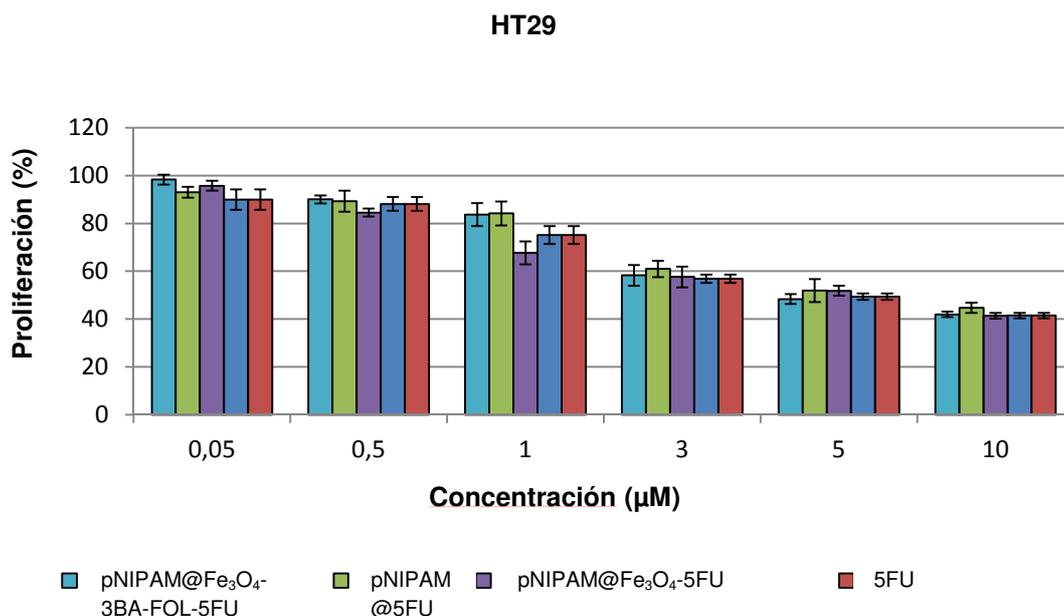


Figura 64. Proliferación celular de la línea HT29 bajo tratamiento con los sistemas pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL-5FU, pNIPAM@5FU y pNIPAM@Fe₃O₄-5FU.

No obstante, aunque no se aprecia una gran diferencia entre la citotoxicidad encontrada para 5FU libre y las nanopartículas magnéticas con 5FU se observa que la proliferación celular es inexistente para concentraciones inferiores a 1µM en la línea T84 para sistemas p4VP@Fe₃O₄-5FU. Para esa misma concentración en la línea HT29 para sistemas pNIPAM@Fe₃O₄-5FU, se observa como disminuye la proliferación celular cuando el compuesto activo se añade encapsulado en NPs magnéticas.

4.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag@NPs) SOBRE MEMBRANAS DE CELULOSA.

La plata ha sido utilizada ampliamente a lo largo de la historia en aplicaciones como la joyería, la fabricación de utensilios, la fotografía, etc. Además sus propiedades antimicrobianas ya se tenían en cuenta en la medicina tradicional.¹⁸² En los últimos años la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, su estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Debido a estas propiedades, las Ag@NPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología. En el ámbito médico existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con Ag@NPs evitando así el crecimiento bacteriano.¹⁸³ Además, se está evaluando el uso de este tipo de nanopartículas contra el tratamiento de enfermedades que requieran una concentración mantenida de fármaco en sangre o un direccionamiento específico a células u órganos.¹⁸⁴ Las aplicaciones de este tipo de nanopartículas se extienden, por tanto, a muy diversas áreas incluyendo la industria textil, el sector alimentario, la agricultura y en sistemas de purificación de agua. En este último sector una de las aplicaciones de las Ag@NPs es la modificación de membranas celulósicas de alto grado de absorción de agua con el fin de mejorar el rendimiento de las mismas, sus propiedades químicas y mecánicas así como su estabilidad.¹⁸⁵

Por todo ello, en este capítulo de la Tesis se hace un análisis de los cambios en las propiedades fisicoquímicas, en particular, la resistencia a la oxidación y

el transporte difusivo a través de la membrana de celulosa regenerada, asociados a la presencia en su estructura de nanopartículas de plata.

4.4.1 Antecedentes.

Los polímeros hidrofílicos como la celulosa son materiales de gran importancia en la fabricación de membranas debido a su capacidad para retrasar el crecimiento bacteriano en su superficie y además, presentan muy poca tendencia al intercambio catiónico. Esta última característica se debe a la carga negativa que presentan en su superficie,¹⁸⁶ lo que es determinante cuando se encuentran involucradas disoluciones de electrolitos y su transporte a través de la membrana.¹⁸⁷ Además, la celulosa es el polímero natural más abundante en la naturaleza, constituyendo, como es conocido, el material básico de la pared celular de la mayoría de las células vegetales. Debido a su abundancia, y a que su precio es muy competitivo, es considerada como la fuente de polímeros más prometedora.¹⁸⁸

Por otro lado, la celulosa regenerada (RC) se utiliza de forma habitual en la fabricación de membranas, pero sin embargo, presenta una cierta inestabilidad química y mecánica bajo ciertas condiciones. Por ello, sus propiedades deben ser mejoradas, en especial cuando se utilizan en medios oxidantes (disoluciones), vendaje de heridas o en procesos de filtración a alta presión.¹⁸⁹

El polímero de celulosa está compuesto de cadenas lineales bien organizadas y por ello es cristalino y muy hidrofílico, pero no es soluble en agua debido a los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre dichas cadenas. Por otra parte, el alto grado de absorción de agua de estas membranas RC permite la modificación de su estructura por inclusión de nanopartículas lipídicas, dendrímeros y quantum dots mediante el método de inmersión (*dip-coating*) en

disoluciones acuosas de los agentes modificantes.^{190,191} De esta forma, la inclusión de nanopartículas sólidas es, entre otras modificaciones de la membrana, uno de los métodos más utilizados para mejorar el rendimiento de la misma en aplicaciones específicas.

Como se ha comentado anteriormente, las nanopartículas de plata se han utilizado como agentes bactericidas en materiales para dispositivos médicos, en ingeniería de tejidos, en sistemas de purificación de agua y en otras muchas aplicaciones.¹⁹² En este contexto, la modificación de membranas celulósicas de alto grado de absorción de agua por incorporación, mediante inmersión, de nanopartículas de plata en su estructura puede mejorar sus propiedades mecánicas y químicas, así como su estabilidad, y por ello, puede ser una alternativa muy interesante para ser aplicada en cualquier dispositivo que necesite la eliminación de placas bacterianas utilizados en sistemas de purificación de agua.¹⁵⁴ La necesidad creciente de agua potable y la reducción de agentes contaminantes en reservas naturales lleva consigo el desarrollo de dispositivos nuevos y eficientes que empleen nuevas membranas para la purificación de agua.¹⁹³

Teniendo en cuenta todo esto, en esta Tesis Doctoral se realiza un análisis de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de membranas de celulosa regeneradas con Ag@NPs. Estas partículas son incluidas siguiendo el procedimiento de inmersión o *dip-coating*. Se realiza además un estudio comparativo entre membranas no modificadas (RC/6) y las modificadas con Ag@NPs (RC/6-Ag@NPs). Las diferencias encontradas en los parámetros electroquímicos como la carga fija efectiva y la permeabilidad iónica, son determinadas midiendo el potencial de membrana generado en disoluciones

acuosas de cloruro de potasio con diferentes concentraciones. Asimismo, el efecto antibacteriano que presenta las membranas modificadas se analiza en el modelo celular Gram negativo de *Escherichia coli*, ya que este tipo de bacteria permite definir aplicaciones del sistema en el tratamiento de aguas residuales.

4.4.2 Preparación y caracterización de Ag@NPs.

Las nanopartículas de plata (Ag@NPs) se han preparado según el método descrito en el apartado 3.5.2 de este documento. Se ha seguido el método que utiliza citrato sódico como agente reductor a partir de una disolución de nitrato de plata (50 mL, 0.5 M) a pH = 5.5.⁸⁸

La morfología de las Ag@NPs se ha caracterizado mediante microscopía SEM/TEM. En la figura 65 se incluyen imágenes representativas de las nanopartículas obtenidas. El tamaño de las partículas se ha determinado en un diámetro medio de 20 ± 2 nm, siendo un tamaño uniforme en toda la muestra. En la imagen se comprueba la monodispersidad.

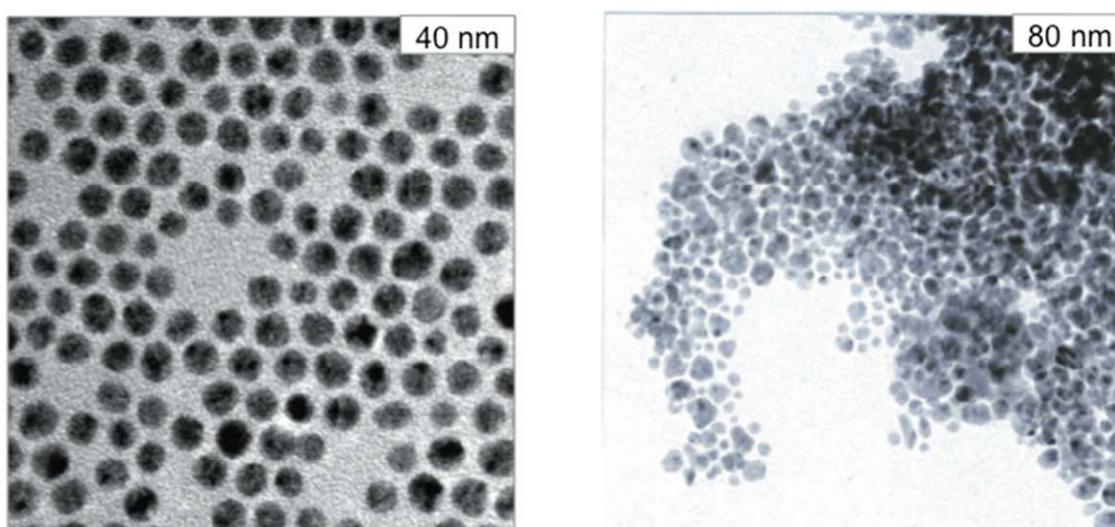


Figura 65. Imágenes (a) SEM y (b) TEM de Ag@NPs.

4.4.3 Preparación y caracterización del sistema RC/6-Ag@NPs.

La inclusión de Ag@NPs en la membrana de celulosa se ha realizado siguiendo el procedimiento *dip-coating* descrito en el apartado 3.5.2. Las muestras preparadas de esta forma se han caracterizado por difracción de Rayos-X, microscopía SEM y ensayos de elongación.

En primer lugar, se ha determinado la presencia de plata en el sistema RC/6-Ag@NPs. Esto se ha llevado a cabo por difracción de Rayos-X y por comparación de los espectros obtenidos para la membrana no modificada RC/6 y la modificada RC/6-Ag@NPs. Dos espectros representativos de ambas muestras se incluyen en la figura 67. El patrón de difracción para la membrana RC/6 seca (figura 66 a) muestra picos a 13° , 22° y 38° , los cuales corresponden, respectivamente, a los planos (1 1 0), (1 1 0) y (2 0 0) de celulosa cristal II.¹⁹⁴ Este difractograma es similar al publicado para una membrana microporosa de celulosa regenerada.¹⁹⁵ En el caso de la muestra RC/6-Ag@NPs, el espectro muestra el patrón de difracción de celulosa (figura 66 b), a la que corresponden los picos a 13° , 17° , así como el hombro que se observa alrededor de 29° . También muestra dos picos a alrededor de 38° y 44° , los cuales corresponden, respectivamente, a los planos (1 1 1) y (2 0 0) del cristal de las partículas de plata. Estos picos confirman la presencia de plata en la membrana modificada. Estos resultados son similares a los obtenidos para la inclusión de Ag@NPs en la membrana de celulosa de algunas bacterias.¹⁹⁶ Además, la amplitud que se observa en los espectros y la baja intensidad de los picos en los patrones de difracción de Rayos-X en las membranas de celulosa se atribuye a la pérdida de la cristalinidad del material, lo cual es indicativo de la presencia de zonas amorfas en las membranas.¹⁶⁴ Los picos de

difracción de Rayos-X de la celulosa en las muestras RC/6-Ag@NPs (figura 66 b) son más anchos y de menor intensidad, si se comparan con los de la muestra de RC/6. Por tanto, este hecho parece indicar que la membrana seca RC/6-Ag@NPs no recupera completamente la cristalinidad original, lo cual puede ser atribuido a la inclusión de Ag@NPs en el interior y la superficie de la membrana de celulosa.

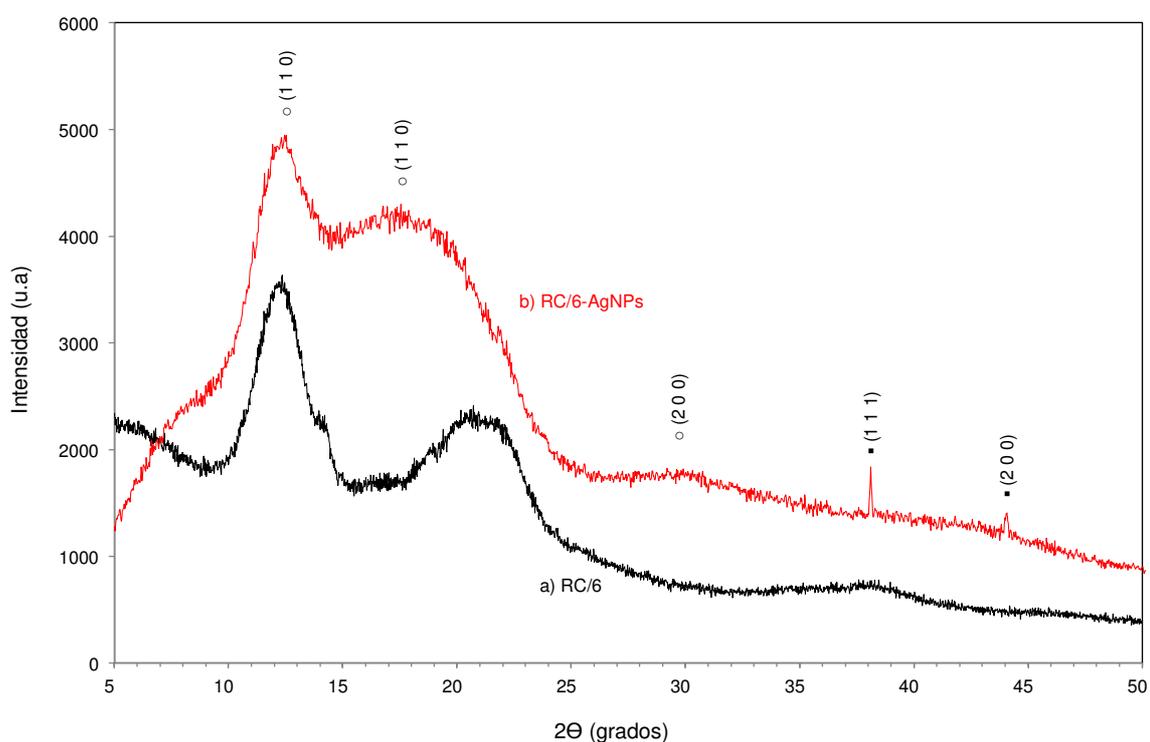


Figura 66. Difractogramas de Rayos-X para las membranas (a) RC/6 y (b) RC/6-Ag@NPs: (■) Ag@NPs y (o) celulosa.

En la figura 67 se incluyen dos imágenes representativas obtenidas por microscopía SEM para el material híbrido RC/6-Ag@NPs. Como se puede observar, las nanopartículas de plata parecen estar presentes en la superficie de la membrana (puntos blancos, indicados con flechas nº 1, figura 67 a) pero también incluidas en el interior de la estructura (puntos grises, indicados con flechas nº 2), aunque no de manera uniforme. Es importante mencionar que, a

escala nanométrica, las Ag@NPs tienden a agregarse y formar cúmulos, lo que afecta de forma adversa a las propiedades relacionadas con la escala. Este hecho puede ser controlado y minimizado depositando las partículas de plata sobre un material sólido que sirva de soporte.¹⁹⁷ Por ello, una vez que se han incluido las Ag@NPs en la membrana RC/6, para dar la muestra RC/6-Ag@NPs, solo se obtiene un pequeño porcentaje de agregación de nanopartículas de plata, como se puede observar en las micrografías SEM de la muestra RC6-Ag@NPs (Figura 67 a). En esta imagen representativa, sólo se observan unas pocas áreas con agregación elevada (indicadas con las flechas nº 3) que permanecen en la membrana modificada.

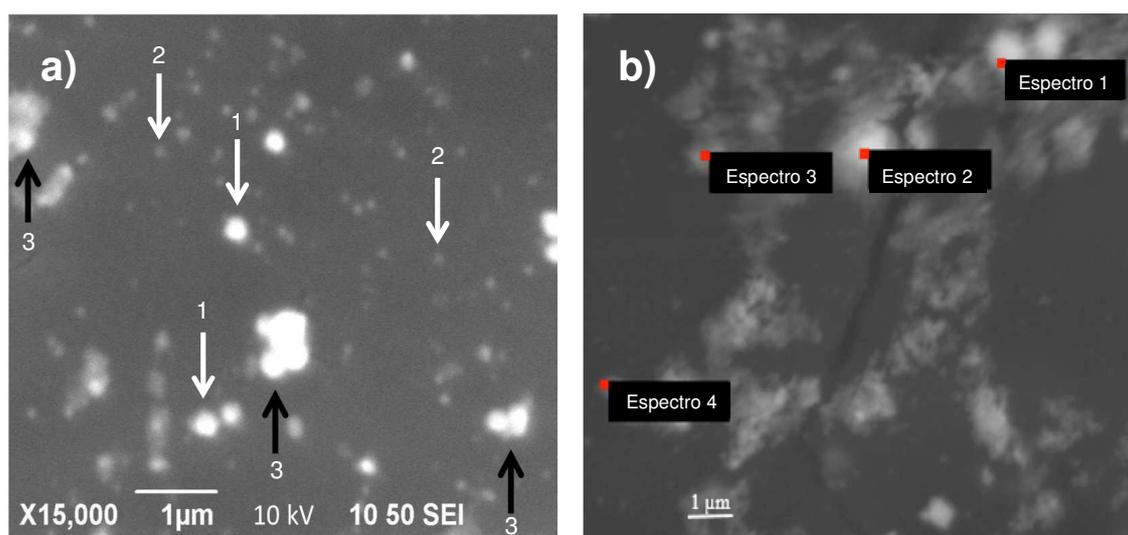


Figura 67. Imágenes SEM para las muestras RC/6-Ag@NPs.

Por otro lado, la figura 67 b muestra áreas seleccionadas del material RC/6-Ag@NPs sobre las que se ha llevado a cabo el análisis químico. La Tabla 4 incluye los porcentajes de cada uno de los átomos de los elementos que componen el material híbrido, siendo estos datos obtenidos mediante el análisis químico del espectro. Como era de esperar, los mayores porcentajes corresponden a los elementos característicos del material celulósico usado

como soporte, es decir, carbono y oxígeno. No obstante, el porcentaje de Ag es significativo en algunas de las áreas indicadas en la figura 67 b (espectros 1 y 2) y el porcentaje decrece en las áreas de baja intensidad de color blanco (espectro 4). En la Tabla 4 también se observa que existe una pequeña cantidad de cloro, el cual puede aparecer en la membrana debido al procedimiento de preparación de Ag@NPs.

Tabla 4: Composición química analizada por SEM: cada espectro corresponde al área indicada de la membrana en la figura 67 b. Los resultados se muestran en porcentaje (%) de concentración atómica.

Espectro	C (%)	O (%)	Cl (%)	Ag (%)
1	78.49	18.91	0.83	1.77
2	78.92	14.92	1.74	4.43
3	75.20	22.83	0.34	1.64
4	73.58	25.38	-	1.04
Media	76.55	20.51	0.72	2.22
	± 3.34	± 10.49	± 0.28	± 1.13

Por otra parte, las curvas obtenidas del análisis de la tensión de la membrana en función de la fuerza de elongación indican que la inclusión de Ag@NPs en la estructura de la membrana celulósica RC/6 modifica su comportamiento elástico, reduciendo de forma significativa la elongación en el momento de

rotura, aunque sólo reduce ligeramente el valor del módulo de Young. Como consecuencia estos resultados indican que el material híbrido RC/6-Ag@NPs presenta una mayor rigidez que la membrana no modificada.

Con estos datos, se puede concluir que la membrana está modificada con nanopartículas de plata, las cuales se encuentra tanto en la superficie como en el interior de la estructura y presentan una agregación muy reducida (figura 68). Las barras de corte en la estructura indican que el grosor de la membrana (82 μm) no es proporcional al tamaño de la partícula ($20 \pm 2 \text{ nm}$), indicando también que aunque las partículas se encuentran inmersas en la estructura de la membrana están localizadas, en su mayoría, cerca de la superficie.

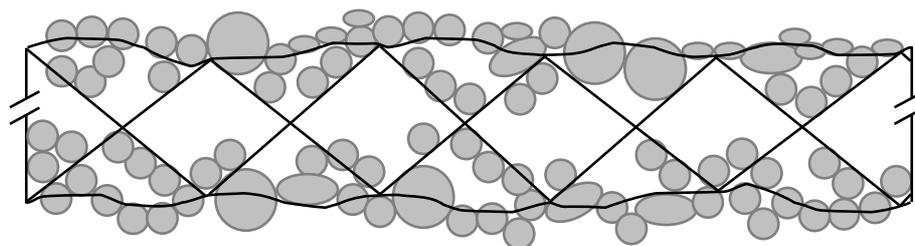


Figura 68. Esquema de la estructura híbrida RC/6-Ag@NPs.

Para estudiar la permanencia de las Ag@NPs en la estructura de la membrana RC/6 incluso en condiciones adversas, en especial medios acuosos, su estabilidad estructural, y conocer cómo influye la presencia de las nanopartículas de plata en los parámetros electroquímicos, se han medido los potenciales de membrana ($\Delta\Phi_{\text{mbr}}$). Así, se define el potencial de membrana como el potencial eléctrico existente entre ambas caras de una membrana que separa dos disoluciones del mismo electrolito pero de diferente concentración.¹⁹⁸ La carga efectiva fija de la membrana, X_{ef} , y el número de transporte iónico, t_i , que es el cociente entre la corriente total transportada por

un ion ($t_i = I_i / I_T$), son los dos parámetros principales que dan información sobre el transporte de disoluciones de electrolitos (y en general, cualquier especie cargada) a través de membranas con carga, y se obtienen de forma habitual a partir de los valores de potenciales de membrana. De acuerdo con el modelo Teorell-Meyer-Sievers,^{199,200} el potencial de membrana puede ser considerado como la suma de dos potenciales Donnan ($\Delta\Phi_{\text{Don}}$, uno de cada interfase entre la disolución y la membrana) asociados a la exclusión de co-iones (definidos como aquellos iones del mismo signo que el de la carga efectiva de la membrana), y un potencial de difusión asociado a la estructura de la membrana ($\Delta\Phi_{\text{dif}}$) debido a la movilidad diferente de aniones respecto a cationes en el interior de la membrana, es decir:

$$\Delta\Phi_{\text{mbr}} = \Delta\Phi_{\text{Don}}(\text{I}) + \Delta\Phi_{\text{dif}} + \Delta\Phi_{\text{Don}}(\text{II})$$

La figura 69 muestra la variación de los valores de los potenciales de membrana, $\Delta\Phi_{\text{mbr}}$, en relación a la concentración de las disoluciones de KCl (C_v/C_c) a ambos lados de la membrana. Para poder compararlos, también se representa en la misma figura los potenciales de membrana de un modelo ideal de intercambio de cationes (se indica con una línea sólida). Como se puede observar, los valores de $\Delta\Phi_{\text{mbr}}$ se bifurcan en dos trazos diferenciados: i) uno de ellos a bajos valores de concentraciones C_v ($C_v < 0.03$ M), donde los potenciales de membrana muestran la misma tendencia, pero con valores menores que los del modelo ideal: esto es indicativo del carácter de carga negativa de las membranas y se atribuye a la exclusión Donnan de los co-iones (en este caso, por tanto, aniones) por parte de la membrana; ii) para valores $C_v > 0.04$ M, donde $\Delta\Phi_{\text{mbr}}$ muestra la tendencia opuesta, y también un

decrecimiento más reducido conforme incrementa el valor de C_v , lo cual se asocia al potencial de difusión de los co-iones en la membrana, para concentraciones en las disoluciones mayores que la carga fija de la misma, y donde su efecto en el transporte de iones puede ser despreciado. Estos resultados también indican diferencias claras en el comportamiento de las muestras oxidadas con $C_v > 0.04$ M KCl (transporte difusivo de iones) cuando se comparan con las membranas sin tratar. Esta diferencia se puede atribuir a la presencia de Ag@NPs.

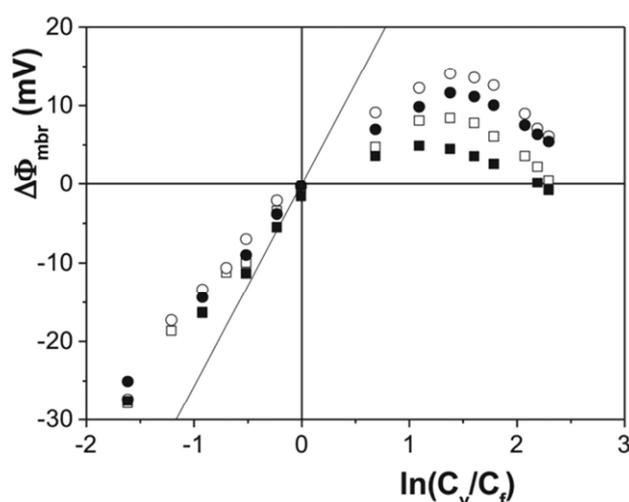


Figura 69. Potencial de membrana frente a relación de concentraciones para las membranas RC/6 (□), RC/6-KMnO₄ (■), RC/6-Ag@NPs (○) y RC/6-Ag@NPs-KMnO₄ (●).

El ajuste de los puntos del brazo derecho de $\Delta\Phi_{mbr}$ vs $\ln(C_v/C_c)$ de la gráfica permite la determinación del número de transporte de los co-iones (t_{Cl^-}) y los contra-iones (t_{Na^+}) en las membranas, siendo $t_+ + t_- = 1$ para sales formadas con iones de valencia uno, de acuerdo con la definición de t_i , mientras que el valor de la carga fija efectiva en las membranas fue determinada según la expresión siguiente:²⁰¹

$$X_{ef} = 2k_s UC_{max} / (1 - U^2)^{1/2}$$

donde C_{\max} representa el valor máximo de la curva, U es un parámetro relacionado con el número de transporte de los iones ($U = t_{\text{Na}^+} - t_{\text{Cl}^-}$) y k_s es el coeficiente de partición, al cual se le asigna el valor 1 debido al alto carácter hidrofílico de estas membranas.

La Tabla 5 muestra los valores de concentración de carga fija efectiva y los del número de transporte de los cationes para las muestras de membrana estudiadas. Estos coeficientes no muestran valores que varíen de forma significativa en muestras con y sin nanopartículas, aunque parecen reducir el efecto oxidante de la disolución de permanganato, como ya se ha comentado.

Tabla 5: Valores obtenidos para el coeficiente de difusión salino, D_s , y la concentración de carga efectiva fija, X_{ef} , en las membranas estudiadas.

Membrana	X_{ef} (M)	$\langle t_+ \rangle$	$\langle P_+ \rangle$ (%)
RC/6	0.0312	0.669	46.5
RC/6-Ag@NPs	0.0343	0.682	48.5
RC/6-KMnO ₄	0.0269	0.613	37.4
RC/6-Ag@NPs-KMnO ₄	0.0336	0.639	41.6

Otro parámetro de interés asociado al transporte por difusión de electrolitos a través de una membrana es la permselectividad iónica, que da información sobre el comportamiento de la membrana cuando se estudia en una disolución. La permselectividad catiónica, P_+ , se puede calcular según la ecuación¹⁷⁴

$$P_+ = (t_+ - t_+^0) / (1 - t_+^0)$$

donde t_+^0 representa número de transporte del catión en disolución ($t_{K^+}^0 = 0.49$)²⁰². Los valores de este parámetro también se indican en la Tabla 5, y muestran con claridad el aumento de estabilidad que se alcanza bajo condiciones oxidantes cuando las Ag@NPs se encuentran incluidas en la estructura de la membrana. En concreto, se observa una reducción de sólo el 14 % en los valores de P_+ para la muestra RC/6-Ag@NPs tratada con $KMnO_4$ en comparación con la muestra sin tratar, mientras que la reducción observada para el mismo parámetro en la muestra RC/6 tratada con la mezcla oxidante alcanza el 20 % respecto a la original.

4.4.4 Ensayo de la actividad antimicrobiana.

Como se ha indicado, la actividad antibacteriana de la plata se ha estudiado en profundidad y se utiliza en numerosas aplicaciones prácticas. El mecanismo por el cual la plata actúa como agente antibacteriano se basa en su capacidad de interaccionar con grupos funcionales presentes en las proteínas, y de forma específica con los grupos tiol (-SH) de la cisteína, lo que conduce a la desnaturalización de la misma.²⁰³ Además, el catión Ag^+ puede formar complejos con elementos dadores de electrones, como el azufre, el oxígeno o el nitrógeno, y por tanto, impide la actividad normal de la proteína.²⁰⁴ La plata puede afectar a los sitios activos de estas biomoléculas debido, también, a que pueden desplazar los cationes o metales que las forman.²⁰⁵ Otros mecanismos de acción de la plata sobre *Escherichia coli* están relacionados, o con la alteración o inhibición del intercambio de fosfato a través de membranas celulares, o con la inhibición de procesos de oxidación de glucosa, de glicerina y especies derivadas de fumaratos y succinatos.¹⁸⁰ Todo ello conduce a que se pierda la capacidad de replicación del ADN, a la desactivación de proteínas

celulares, a la pérdida de la estructura de la membrana bacteriana y su permeabilidad, y con ello la muerte celular.²⁰⁶ Sin embargo, el modelo de acción de las Ag@NPs no se ha definido aún en su totalidad, aunque investigaciones recientes muestran que pueden modificar la permeabilidad de la membrana externa y alterar la cadena respiratoria de deshidrogenasas, inhibiendo el crecimiento celular.

Por otra parte, una de las principales limitaciones en el uso de membranas de celulosa en dispositivos de tratamiento de agua es la formación de la placa bacteriana (*biofouling*).²⁰⁷ Para valorar este punto en las membranas preparadas, muestras de las mismas (RC/6 y RC/6-Ag@NPs) se han analizado utilizando como modelo las células de *Escherichia coli*, que constituyen un modelo de células Gram-negativas. Para ello, las muestras de membranas RC/6 y RC/6-Ag@NPs se han colocado en cultivos celulares de *E. coli*. Tras un periodo de incubación de 24 h, en el caso de la membrana RC/6 no se observa ningún área de inhibición, tal como se puede ver en la figura 70 a. Este resultado era el esperado. El mismo ensayo fue realizado con muestras de la membrana modificada RC/6-Ag@NPs. En todos estos casos se observó un área de inhibición, de alrededor de 2 mm de media, en la zona que rodea la membrana (figura 70 b).

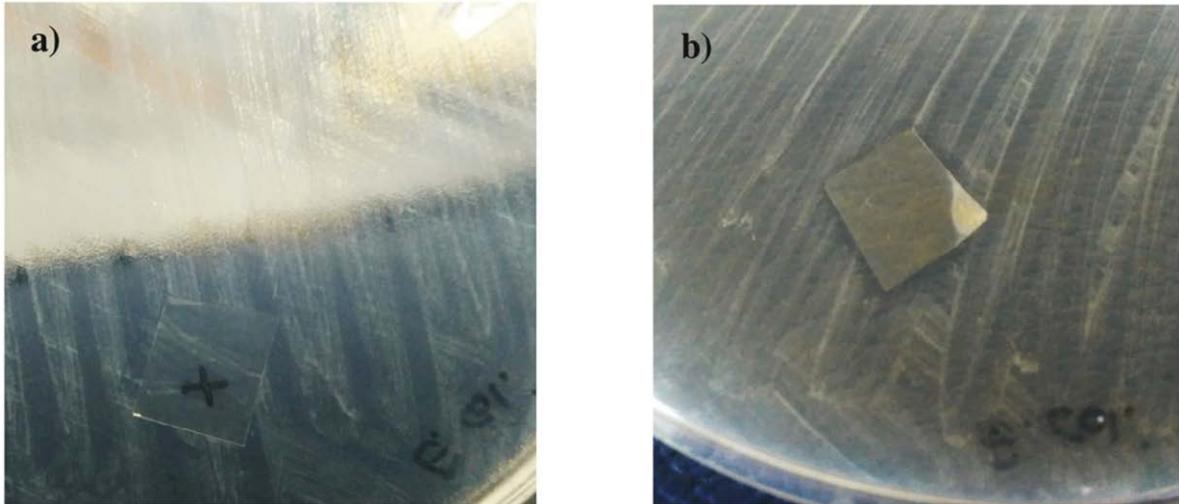


Figura 70. Imágenes representativas de los ensayos de actividad antimicrobiana de las muestras (a) RC/6 y (b) RC/6-AgNPs.

Se puede concluir que la membrana RC/6 no produce ninguna inhibición en el crecimiento *E. coli*, mientras que la membrana que presenta nanopartículas de plata (RC/6-Ag@NPs) sí inhibe el crecimiento de *E. coli*.

Teniendo en cuenta los resultados de inhibición de crecimiento bacteriano, podemos proponer esta membrana modificada con nanopartículas de plata RC/6-AgNPs como una alternativa a las membranas utilizadas en la actualidad en dispositivos de tratamiento de aguas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



5. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. CONCLUSIONES.

De esta Tesis Doctoral se extraen una serie de conclusiones:

- ✓ Se ha preparado sistemas de NPs utilizando dos polímeros: p4VP y pNIPAM.
- ✓ Se ha preparado sistemas híbridos p4VP@Au y se ha determinado un tamaño medio de 125.8 nm de diámetro para estas NPs, siendo el tamaño del núcleo metálico de 50 nm de diámetro. Se ha determinado, además, que existe una influencia del pH, de la concentración de monómero (4VP) y de agente entrecruzante (BA). Un aumento en la concentración de monómero (4VP) ha dado como resultado un incremento en el espesor de la capa de polímero pudiendo así controlar su tamaño. Éste se sitúa en valores de 51.5 nm (150 mM 4VP), 19.9 nm (100 mM) y 10 nm (75 mM). En cuanto al pH, se ha demostrado su influencia en la capacidad de hinchamiento del polímero. Así a pH = 7 las NPs muestran un tamaño de 160 nm de diámetro mientras que a pH = 2 el tamaño medido es de 380 nm. Por último, la concentración de agente entrecruzante influye también en el tamaño de las partículas a pH ácido. Así, a pH básico exhiben un tamaño de 110 nm mientras que a pH ácido se demuestra que el D_h es mayor a menor concentración de entrecruzante.
- ✓ Se ha observado que el núcleo de oro no se encuentra en el centro del sistema híbrido p4VP@Au sino que aparece cerca del borde de la capa de p4VP. Esto indica que la polimerización no se realiza de forma homogénea sobre la superficie del metal.
- ✓ Se ha preparado NPs huecas p4VP@HU por oxidación del núcleo metálico con un diámetro interno de 40 nm y un diámetro externo entre

130 y 150 nm. A medida que aumenta el pH disminuye el valor del diámetro del polímero hasta unos 100 nm a pH = 7.5.

- ✓ Se ha preparado nanogeles p4VP@MZ a dos concentraciones distintas de monómero obteniéndose tamaños de NPs de 200 nm (150 mM p4VP) y 335 nm (200 mM).
- ✓ Se ha preparado nanogeles pNIPAM@MZ cuyas NPs presentan una distribución de tamaño comprendido entre 490 y 530 nm de diámetro.
- ✓ Se ha funcionalizado nanogeles pNIPAM@MZ con ácido 3-butenoico obteniéndose NPs de tamaño comprendido entre 519 y 540 nm de diámetro. El 3BA no produce aumento de tamaño de partícula ni agregación en las mismas.
- ✓ Se ha funcionalizado nanogeles pNIPAM@MZ-3BA con ácido fólico obteniéndose sistemas de NPs de 519 nm de diámetro.
- ✓ Se ha preparado sistemas p4VP@ Fe₃O₄ y pNIPAM@Fe₃O₄ con una distribución de tamaño de NPs comprendida entre 295 y 315 nm de diámetro para el primer sistema y en 250 nm para el segundo. Se ha observado, en ambos casos, una estructura formada por varios núcleos magnéticos y no una estructura del tipo corteza@núcleo similar a los polímeros crecidos sobre Nps metálicas.
- ✓ Se ha observado una menor opacidad de pNIPAM@Fe₃O₄ con respecto a p4VP@ Fe₃O₄. El nanogel formado por pNIPAM es menos compacto que el formado por p4VP.
- ✓ Se ha funcionalizado nanogeles pNIPAM@Fe₃O₄ con 3BA y FOL obteniéndose NPs pNIPAM@Fe₃O₄-3BA-FOL de 250 nm de diámetro. Se

ha realizado una modificación superficial de las NPs ya que el tamaño no varía.

- ✓ Se ha conseguido una encapsulación de PTX en p4VP@HU del 100 % en concentraciones desde 0.4 mg/mL hasta 1.8 mg/mL.
- ✓ Se ha obtenido una liberación más rápida de PTX en medios ácidos y una liberación sostenida en medios básicos. A pH = 7.6 se libera un 15 % del fármaco el primer día llegando al 70 % al décimo. Para un pH ácido en torno al 3.5 se libera el 70 % el primer día, llegando al 100 % en los cuatro siguientes.
- ✓ Se ha encapsulado PTX en sistemas p4VP@MZ obteniéndose un tamaño medio de 375 nm de diámetro. El aumento de tamaño se debe al menor empaquetamiento del polímero en estado colapsado debido a la presencia de PTX.
- ✓ Se ha obtenido que los sistemas p4VP@HU-PTX y p4VP@MZ-PTX son biocompatibles y mejoran la citotoxicidad disminuyendo la concentración de PTX necesaria para reducir al 50 % la población tumoral (IC₅₀).
- ✓ Se ha obtenido que a pH ácido la molécula de DOX se encapsula en mayor medida en sistemas p4VP@Au que a pH básico. Así, se ha encontrado una diferencia de eficiencia de atrapamiento de 4.9 % después de 12 h de exposición a las partículas.
- ✓ Se ha encapsulado 5FU en muestras de nanogel pNIPAM@MZ obteniéndose NPs esféricas de tamaños comprendidos entre 500 y 510 nm. Se ha obtenido bajos valores de atrapado de 5 FU en torno al 5 %.
- ✓ Se ha obtenido que los sistemas pNIPAM@MZ, pNIPAM@MZ-3BA y pNIPAM@MZ-3BA-FOL no son tóxicos para la línea celular T84 después

de 72 h de tratamiento mostrando una menor proliferación celular para sistemas pNIPAM@MZ-3BA-FOL-5FU en concentraciones cercanas 3 μM de 5FU.

- ✓ Se ha obtenido que los sistemas p4VP@ Fe_3O_4 , pNIPAM@ Fe_3O_4 y pNIPAM@ Fe_3O_4 -3BA-FOL no son tóxicos para las líneas celulares T84 y HT29 empleando concentraciones de agente activo desde 0.05 hasta 10 μM .
- ✓ Se ha obtenido una menor proliferación celular para sistemas pNIPAM@ Fe_3O_4 -5FU en concentraciones 1 μM .
- ✓ Se ha preparado Ag@NPs con un tamaño medio de 20 nm de diámetro y se han incluido de forma satisfactoria a la estructura de membranas de celulosa obteniendo un porcentaje de Ag significativo de 4.43 % de concentración atómica.
- ✓ Se ha obtenido una mayor rigidez en las membranas modificadas mediante análisis de tensión reduciéndose de forma significativa la elongación en el momento de la rotura.
- ✓ Se ha obtenido una mayor resistencia a la oxidación en membranas modificadas con una reducción del 14 % en los valores de P_+ para la muestra RC/6-Ag@NPs tratada con KMnO_4 en comparación con la muestra sin tratar.
- ✓ Se ha obtenido que la membrana RC/6 no produce ninguna inhibición en el crecimiento de *Escherichia Coli* mientras que la membrana RC/6-Ag@NPs sí inhibe dicho crecimiento.



6. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253-265.
2. Weaver, B. A. How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Bio. Cell* **2014**, 25, 2677-2681.
3. Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K.; Sparreboom, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* **2001**, 37, 1590-1598.
4. Chen, Y.; Nan, J. Hollow poly (n-isopropylacrylamide)-co-poly (acrylic acid) microgels with high loading capacity for drugs. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, 124, 4678-4685.
5. Contreras-Cáceres, R.; Leiva, M.; Ortiz R.; Díaz, A.; López-Romero, J. M. Paclitaxel-loaded hollow-poly (4-vinylpyridine) nanoparticles enhance drug chemotherapeutic efficacy in lung and breast cancer cell lines. *Nano Res.* **2017**, 10, 856-875.
6. Tysoe, C. & Withers, S. G. Fluorinated mechanism-based inhibitors: common themes and recent developments. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 865-874.
7. Jhaveri, J. H.; Murthy, Z. A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. *Desalination* **2016**, 379, 137-154.
8. Bhushan, B. Springer Handbook of Nanotechnology. *Springer Verlag GmbH* **2003**.
9. a) Sahoo, S. K.; Parveen S. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* **2007**, 3, 20-31.
b) Saini, S.; Sharma, S. Nanotechnology: the future medicine. *J. Cutan. Aesthet Surg.* **2010**, 3, 32-33.

-
10. Jabir, N. R.; Tabrez, S. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int. Nanomedicine* **2012**, 7, 4391-4408.
 11. Beik, J.; Abed, Z. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: from fundamental principles to advanced applications. *J. Control. Release* **2016**, 235, 205-221.
 12. Brigger, I.; Dubernet, C. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 631-651.
 13. Wicki, A.; Witzigmann, D. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control Release* **2015**, 200, 138-157.
 14. Hobbs S. K.; Monsky, W. L. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *PNAS* **1998**, 95, 4607-4612.
 15. Williams, H. D.; Trevaskis, N. L. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 315-499.
 16. Kim, K. S.; Vincent, B. pH and temperature-sensitive behaviours of poly (4-vinyl pyridine-co-N-isopropyl acrylamide) microgels. *Polym. J.* **2005**, 37, 565-570.
 17. Feng, L.; Mumper, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. *Cancer Lett* **2013**, 334, 157-175.
 18. Auffan, M.; Rose, J. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 634-641.
 19. Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, 19, 409-503.
 20. Hutter, E.; Fendler, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1685-1706.

-
21. Huang, X. H.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*. **2007**, 2, 681-693.
 22. Huang, W. Y.; Qian, W.; El-Sayed, M. A.; Ding, Y.; Wang, Z. L. Effect of the lattice crystallinity on the electron–phonon relaxation rates in gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*. **2007**, 111, 10751-10757.
 23. Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*. **2007**, 2, 18-29.
 24. Jain, P. K.; Huang, X. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc Chem Res*. **2008**, 41, 1578-1586.
 25. Contreras-Cáceres, R; Pastoriza-Santos, I. Growing Au/Ag nanoparticles within microgel colloids for improved SERS detection. *Chem. Eur. J*. **2010**, 16, 9462-9467.
 26. Han G.; Martin C. T. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2006**, 67, 78-82.
 27. Leslie-Pelecky, D. L.; Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem. Mater.* **1996**, 8, 1770-1783.
 28. Sun, S. H.; Zeng, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8204-8205.
 29. Corot, C.; Robert, P.; Idee, M. J.; Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, 58, 1471-1504.
 30. Modo, M.; Bulté, J. W. Cellular MR imaging. *Mol. Imaging* **2005**, 4, 143-164.
 31. Tietze, R.; Zaloga, J. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 468, 463-470.

-
32. Gobbo, O. L.; Sjaastad, K. Magnetic nanoparticles in cancer theranostics. *Theranostics* **2015**, 5, 1249-1263.
 33. Tong, R.; Cheng, J. Anticancer polymeric nanomedicines. *Polym. Rev.* **2007**, 47, 345-381.
 34. Kwon, J.; Drumright, R. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 448-477.
 35. Tanaka, T.; Fillmore, D. J.; Sun, S. T.; Nishio, I.; Swislow, G.; Shah. A. Phase transitions in ionic gels. *Phys. Rev. Letter.* **1980**, 45 1636-1639.
 36. Liechty, W. B.; Kryscio, D. R. Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **2010**, 1, 149-173.
 37. Pelton, R. H.; Chibante. P. Preparation of aqueous latices with *N*-isopropylacrylamide. *Colloids Surf.* **1986**, 20, 247-256.
 38. Sawai, T.; Yamazaki, S.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. pH-responsive swelling of the ultrafine microsphere. *Macromolecules* **1991**, 24, 2117-2118.
 39. Singh, R.; Lillard, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, 86, 215-223.
 40. Contreras-Cáceres, R.; Schellkopf, L.; Fernández-López, C.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Stamm, M. Effect of the cross-linking density on the thermoresponsive behavior of hollow pNIPAM microgels. *Langmuir* **2015**, 31, 1142–1149.
 41. Kozlovskaya, V.; Kharlampieva, E. Poly (methacrylic acid) hydrogel films and capsules: response to pH and ionic strength, and encapsulation of macromolecules. *Chem. Mater.* **2006**, 18, 328-336.
 42. Pizzol, C. D.; Filippin-Monteiro, F. B. Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Int. J. Environ Res. Public Health* **2014**, 11, 8581-8596.

-
43. Silva, A. H.; Filippin-Monteiro, F. B. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Sci. Total Environ* **2012**, 432, 382-388.
 44. Cirri, M.; Bragagni, M. Development of a new delivery system consisting in drug-in cyclodextrin-in nanostructured lipid carriers for ketoprofen topical delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, 80, 46-53.
 45. Odom, T.; Huang, J. L. Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. *Nature* **1998**, 391, 62-64.
 46. Kierny, M. R.; Cunningham, T. D. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Rev.* **2012**, 3.
 47. Melita, E. D.; Purcel, G. Carbon nanotubes for cancer therapy and neurodegenerative diseases. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2015**, 5, 349-356.
 48. Anbarasan, B.; Babu, S. V. pH responsive release of doxorubicin to the cancer cells by functionalized multi-walled carbon nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, 15, 4799-4805.
 49. Arora, S.; Kumar, R. Translocation and toxicity of docetaxel multi-walled carbon nanotube conjugate in mammalian breast cancer cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, 10, 3601-3609.
 50. Wu, L.; Man, C. PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin. *Pharm. Res.* **2015**, 30, 412-423.
 51. Naderi, N.; Madani, S. Y. Octa-ammonium post-conjugated single-walled carbon nanotubes as vehicles for targeted delivery of Paclitaxel. *Nano Rev.* **2015**, 6.
 52. Abbasi, E.; Aval, S. F. Dendrimers: synthesis, applications and properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 1-10.
 53. She, W.; Pan, D. PEGylated dendrimer-doxorubicin conjugates as pH-sensitive drug delivery systems: Synthesis and in vitro characterization. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, 11, 964-978.



-
54. Kesavan, A.; Ilaiyaraja, P. Tumor targeting using polyamidoamine dendrimer-cisplatin nanoparticles functionalized with diglycolamic acid and herceptin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 96, 255-263.
 55. Liu, H.; Farrell, S. Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J. Control. Release* **2000**, 68, 167-174.
 56. Thipparaboina, R.; Chavan, R. B. Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2015**, 135, 291-308.
 57. Ueno, T.; Endo, K. Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1, 2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016). *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, 9, 3005-3012.
 58. Scarano, W.; de Souza, P. Dual-drug delivery of curcumin and platinum drugs in polymeric micelles enhances the synergistic effects: a double act for the treatment of multidrug-resistant cancer. *Biomater. Sci.* **2015**, 3, 163-174.
 59. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S. Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8, 102-111.
 60. Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10, 975-999.
 61. Prados, J.; Melguizo, C. Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 66, 69-78.
 62. Clares, B.; Biedma-Ortiz, R. A. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 85, 329-338.
 63. Tasis, D. Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1125.
 64. Torchilin, V. P. Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11, 81-91.
 65. Brigger, I.; Dubernet, C. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 631-651.

-
66. Huff, T. B.; Tong, L. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumorcells. *Nanomedicine*, **2007**, 2, 125-132.
67. Lu, W.; Zhang, G. Tumor site-specific silencing of NF-kappaB p65 by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection. *Cancer Res.* **2010**, 70, 3177-3188.
68. Kato, Y.; Ozawa, S. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, 13, 1-8.
69. Gao, W.; Chan, J. M. pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 1913-1920.
70. **a)** Nicolaou, K. C.; Yang, Z. Liu, J. J. Total synthesis of Taxol. *Nature*, **1994**. 367, 630-634.
- b)** Swain, S. M.; Honing, S. F. A phase II trial of Paclitaxel (Taxol®) as first line treatment in advanced breast cancer. *Invest. New Drugs* **1995**, 13, 217-222.
71. Saville, M.; Lietzau, J. Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with Paclitaxel. *Lancet* **1995**, 346.
72. Hernández-Vargas, H.; Palacios, J. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines. *Cell Cycle* **2007**, 6, 780-783.
73. Gornstein, E.; Schwarz, T. L. The paradox of Paclitaxel neurotoxicity: mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* **2014**, 76, 175-183.
74. Guchelaar, H. J.; Napel, C. H. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review. *Clin. Oncol.* **1994**, 6, 40-48.
75. Ma, P.; Mumper, R. J. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2013**, 4, 117-134.
76. Heidelberg, C. Fluorinated pyrimidines: a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* **1957**, 3, 663-666.

-
77. Tan, C.; Tasaka, H. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* **1967**, 20, 333-353.
78. Di Marco, A.; Gaetani, M. A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother. Rep.* **1969**, 53, 33-37.
79. Momparler, R. L.; Karon, M. Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res.* **1976**, 36, 2891-2895.
80. Mitry, M. A.; Edwards, J. G. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature* **2016**, 10, 17-24.
81. Barenholz, Y. Doxil[®] -The first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* **2012**, 160, 117-134.
82. Dawidczyk, C. M.; Kim, M. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release* **2014**, 187, 133-144.
83. Cabeza, L.; Perazzoli, G. Nanomaterials and cancer therapy. Nanotechnology and drug delivery. Volume two: nano-engineering strategies and nanomedicines against severe diseases. *C. Press* **2016**, 228-256.
84. Sadeghi-Aliabadi, H., Asghari, G., Mostafavi, S. A. & Esmaili, A. Solvent optimization on Taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS. *DARU J. Pharm. Sci.* **2009**, 17, 192-198.
85. a) Hou, D.; Xie, C.; Huang, K. & Zhu, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* **2003**, 24, 1781-1785.
b) Vázquez, M. I. et al. Functionalized lipid nanoparticles-cellophane hybrid films for molecular delivery: preparation, physicochemical, characterization, and stability. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100, 4815-4822.

-
86. Peláez, L.; Vázquez, M. I. Interfacial and fouling effects on diffusional permeability across a composite ceramic membrane. *Ceramics Int.* **2010**, *36*, 797-801.
87. Clara-Rahola, J.; Moscoso, A.; Ruiz-Muelle, A. B.; Laurenti, M.; Formanek, P.; López-Romero, J. M.; Fernández, I.; Fernando Díaz, J.; Rubio-Retama, J.; Fery, A.; Contreras-Cáceres, R. Au@p4VP core@shell pH-sensitive nanocomposites suitable for drug entrapment. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *514*, 704-714.
88. Turkevich, P.; Cooper, S.; Hilier, J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *J. Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75.
89. Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J. Spatially-directed oxidation of gold nanoparticles by Au (III)-CTAB complexes. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 14257-14261.
90. Loxley, A.; Vincent, B. Colloid. Equilibrium and kinetic aspects of the pH-dependent swelling of poly (2-vinylpyridine-co-styrene) microgels. *Polym. Sci.* **1997**, *275*, 1108-1114.
91. Kim, H.; Jo, A.; Baek, S.; Lim, D.; Park, S.-Y.; Cho, S. K.; Chung, J. W.; Yoon, J. Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
92. Guardia, P.; Perez-Juste, J. Heating rate influence on the synthesis of iron oxide nanoparticles: the case of decanoic acid. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6108-6110.
93. Álvarez-Puebla, R. A.; Contreras-Cáceres, R. Au@pNIPAM colloids as molecular traps for surface-enhanced, spectroscopic, ultra-sensitive analysis. *Angew Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 138-143.

-
94. Contreras-Cáceres, R.; Abalde-Cela, S. Multifunctional microgel magnetic/optical traps for SERS ultradetection. *Langmuir* **2011**, *27*, 4520-4525.
 95. Saundersa, B. R.; Vicent, B. Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1999, *80*, 1-25.
 96. Fernández-Nieves, A.; Fernández-Barbero, A.; Vincent, B.; de las Nieves, F. J. Charge controlled swelling of microgel particles. *Macromolecules* **2000**, *33*, 2114-2118.
 97. Peláez-Fernández, M.; Souslov, A. Impact of single-particle compressibility on the fluid-solid phase transition for ionic microgel suspensions, *Phys. Rev. Lett.* **2015**, 114.
 98. Lu, Y.; Xue, F. Phosphorescent polymeric nanoparticles by coordination cross-linking as a platform for luminescence imaging and photodynamic therapy. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16242-16247.
 99. Ozay, O.; Akcali, A. p(4-VP) based nanoparticles and composites with dual action as antimicrobial materials. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *79*, 460-466.
 100. Evanoff, D. D.; Chumanov, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *Chem. Phys. Chem.* **2005**, *6*, 1221-1231.
 101. Schmid, G. Nanoparticles. From theory to application. *Weinheim: Wiley-VCH*, **2004**.
 102. Toshima N. Reaction in homogeneous solutions. *Marcel Dekker New York* **2000**, 430.
 103. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature: Physical Science* **1973**, *241*, 20-22.
 104. Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J. Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes. *Langmuir* **2006**, *22*, 7707-7710.

-
105. Okamoto, S.; Hachisu, S. Ordered structure in monodisperse gold sol. *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, 62, 172-181.
 106. Han, S. W.; Sang, W. J. Adsorption characteristics of anthraquinone-2-carboxylic acid on gold. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 11987-11995.
 107. Xing, Z.; Wang, C. pH/temperature dual stimuli-responsive microcapsules with interpenetrating polymer network structure. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, 288, 1723-1729.
 108. Shen, J. M.; Yin, T. Surface charge-switchable polymeric magnetic nanoparticles for the controlled release of anticancer drug. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 7014-7024.
 109. Nabid, M. R.; Bide, Y. Fe₃O₄-SiO₂-p4VP pH-sensitive microgel for immobilization of nickel nanoparticles: an efficient heterogeneous catalyst for nitrile reduction in water. *Chem. Cat. Chem.* **2014**, 6, 538-546.
 110. Dai, Z.; Li, P. poly(4-vinylpyridine) coated CdTe core/shell quantum dots. *Adv. Mater. Res.* **2009**, 60-61, 114-118.
 111. Li, D.; He, Q. Fabrication of pH-Responsive nanocomposites of gold nanoparticles/poly(4-vinylpyridine). *Chem. Mater* **2007**, 19, 412-417.
 112. Contreras-Cáceres, R.; Pacífico, J. Au@pNIPAM thermosensitive nanostructures control over shell crosslinking, overall dimensions and core growth. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 3070-3076.
 113. Wittemann, A.; Drechsler, M. High elongation of polyelectrolyte chains in the osmotic limit of spherical polyelectrolyte brushes: a study by cryogenic transmission electron microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9688-9689.
 114. Nizri, G.; Magdassi, S. Microstructural characterization of micro and nanoparticles formed biopolymer-surfactant interactions, *Langmuir* **2004**, 20, 4380-4385.

-
115. Danino, D.; Berheim-Grosswasser, A. Digital cryogenic transmission electron microscopy: an advanced tool for direct imaging of complex fluids. *Colloids Surf.* **2001**, 183, 113-122.
 116. Flory, P. J. Principles of polymer chemistry. *Cornell University Press*, **1953**.
 117. Hirotsu, S. Static and time dependent properties of polymer gels around the volume phase transition. *Phase Trans.* **1994**, 47, 183-240.
 118. Pelton, R. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 348, 673-674.
 119. Mitsuishi, M. Nanoscale actuation of thermoreversible polymer brushes coupled with localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles, *Langmuir* **2007**, 23, 7472-7474.
 120. Porod, G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden. *Systemen. Kolloid Z.* **1951**, 124, 83-114.
 121. Schmidt, P.W. Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems, *J. App. Cryst.* **1991**, 24, 414-435.
 122. Clara-Rahola, J.; Fernandez-Nieves, A. Structural properties of thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-poly(ethyleneglycol) microgels, *J. Chem. Phys.* **2012**, 136.
 123. Tagliazucchi, M.; Blaber, M. G. Optical properties of responsive hybrid Au@polymer nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, 6, 8397-8406.
 124. Xu, J. X.; Tang, J. B.; Zhao, L. H.; Shen, Y. Q. Advances in the study of tumor pH-responsive polymeric micelles for cancer drug targeting delivery. *Yaoxue Xuebao* **2009**, 44, 1328-1335.
 125. Sarada, K.; Firoz, S.; Padmini, K. In-situ gelling system: A review. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. and Res.* **2015**, 5, 76-90.
 126. Abandansari, H. S.; Nabid, M. R.; Rezaei, S. J. T.; Niknejad, H. PH-sensitive nanogels based on Boltorn® H40 and poly(vinylpyridine) using mini-emulsion

polymerization for delivery of hydrophobic anticancer drugs. *Polymer* **2014**, 55, 3579-3590.

127. Li, P.; Wang, T.; Lei, F.; Qin, L.; Jiang, J. Preparation and evaluation of paclitaxel-imprinted polymers with a rosin-based crosslinker as the stationary phase in high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* **2017**, 1502, 30-37.
128. Iatridi, Z.; Angelopoulou, A.; Voulgari, E.; Avgoustakis, K.; Tsitsilianis, C. Star-Graft Quarterpolymer-Based Polymersomes as Nanocarriers for Co-Delivery of Hydrophilic/Hydrophobic Chemotherapeutic Agents. *ACS Omega* **2018**, 3, 11896-11908.
129. Liaskoni, A.; Angelopoulou, A.; Voulgari, E.; Tsitsilianis, C.; Avgoustakis, K. Paclitaxel controlled delivery using a pH-responsive functional-AuNP/block-copolymer vesicular nanocarrier composite system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, 117, 177-186.
130. Álvarez-Puebla, R.; Contreras-Cáceres, R.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J. Au@pNIPAM solloids as molecular traps for surface-enhanced, spectroscopic, ultra-sensitive analysis *Angew. Chem. Int. 2009*, 48, 138-143.
131. Gautier, J.; Munnier, E.; Douziech-Eyrolles, L.; Paillard, A. SERS spectroscopic approach to study doxorubicin complexes with Fe²⁺ ions and drug release from SPION-based nanocarriers. *Analyst* **2013**, 138 7354-7356.
132. Beljebbar, A.; Sockalingum, G. D.; Angiboust, J. F.; Manfait, F. Comparative FTSERS resonance Raman and SERS studies of doxorubicin and its complex with DNA. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, 51, 2083-2090.
133. Chu, K. S.; Schorzman, A. N.; Finniss, M. C. Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy. *Biomaterials* **2013**, 34, 8424–8429.

-
134. Lin, L.; Liang, Y.; Jing, Y.; Chuanbing, T.; Qian, W. Development of core-shell nanostructures by in situ assembly of pyridine-grafted diblock copolymer and transferrin for drug delivery application. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2321-2328.
135. Chuan-Chung, C.; Chung-Hsing, L.; Adhimoorthy, P.; Bich-Tram, T-L.; Po-Da, H. Preparation of a drug carrier through alpha-cyclodextrin-induced micellization of poly(epsilon-caprolactone-block-4-vinylpyridine) for controlled delivery of doxorubicin. *J. Polym. Res.* **2015**, *22*, 206.
136. Yang, X.; Moosa, B. A.; Deng, L.; Zhao, L.; Khashab, N. M. PH-triggered micellar membrane for controlled release microchips. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2543-2547.
137. Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E. Synthesis and characterization of thermosensitive pNIPAM microgels covered with superparamagnetic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Langmuir* **2007**, *23*, 10280-10285.
138. Zhang, J.; Xuand, S. Polymer microgels: reactors for semiconductor, metal, and magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7908-7914.
139. Janczewski, D.; Tomczak, N. Stimulus responsive pNIPAM/QD hybrid microspheres by copolymerization with surface engineered QDs. *Macromolecules* **2009**, *42*, 1801-1804.
140. Liu, R.; Fraylich, M.; Saunders, B. R. Thermoresponsive copolymers: from fundamental studies to applications. *Colloid and Polym. Science* **2009**, *287*, 627-643.
141. Elsabahy, M.; Wooley, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545-2561.
142. Llinás, M.; Sánchez-García, D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad IQS* **2014**, *71*, 20-31.

-
143. Maeda, H.; Bharate, G. Y. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, 409-419.
 144. Danhier, F.; Feron, O. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* **2010**, 148, 135-146.
 145. Fang, J.; Nakamura, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2011**, 63, 136-151.
 146. Byrne, J. D.; Betancourt, T. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**; 60 1615-1626.
 147. Manshadi, S.; Ishiguro, L. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model. *Plos One* **2014**, 9.
 148. Yang, G.; Wang, J.; Wang, Y.; Li, L.; Guo, X.; Zhou, S. An implantable active-targeting micelle-in-nanofiber device for efficient and safe cancer therapy. *ACS Nano* **2015**, 9, 1161-1174.
 149. Sang Yoo, H.; Gwan Park, T. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nanoagregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *J. Control. Release* **2004**, 24, 247-256.
 150. Dube, D.; Francis, M.; Leroux, J. C.; Winnik, F.M. Preparation and tumor cell uptake of poly(*N*-isopropylacrylamide) folate conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 685-692.
 151. Du, P.; Yang, H.; Zeng, J.; Liu, P. Folic acid-conjugated temperature and pH dual responsive yolk/shell microspheres as a drug delivery system. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 5298-5308.
 152. El-Hammadi, M.; Delgado, A. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumor activity of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **2017**, 516, 61-70.



-
- 153 Lo, C. L.; Lin, K. M.; Hsiue, G. H. Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(*N*-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid). *J. Controlled Release* **2005**, 104, 477-488.
- 154 Zhang, J. T.; Huang, S. W.; Xue, Y. N.; Liu, J.; Zhuo, R. X. Thermal-sensitive beta-cyclodextrin-containing poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels crosslinked by Si - O- Si bonds -synthesis, characterization and prolonging in vitro release of 5-fluorouracil. *Chinese J. Polymer Science* **2005**, 23, 513-519.
- 155 Li, W.; Guo, Q.; Zhao, H.; Zhang, L.; Li, J.; Gao, J.; Qian, W.; Li, B.; Chen, H.; Wang, H.; Dai, J.; Guo, Y. Novel dual-control poly(*N*-isopropylacrylamide-co-chlorophyllin) nanogels for improving drug release. *Nanomedicine* **2012**, 7, 383-392.
- 156 Liu, S., Zhang, J.; Cui, X.; Guo, Y.; Zhang, X.; Hongyan, W. Synthesis of chitosan-based nanohydrogels for loading and release of 5-fluorouracil *Colloids and Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2016**, 490, 91-97.
- 157 Li, P.; Xu, R.; Wang, W.; Li, X.; Xu, Z.; Yeung, K. W. K.; Chu, P. K. Thermosensitive poly(*N*-isopropylacrylamide-co-glycidyl methacrylate) microgels for controlled drug release. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, **2013**, 101, 251-255.
- 158 Mathews, A. S.; Ha, C. S.; Cho, W. J.; Kim, I. Drug delivery system based on covalently bonded poly[*N*-isopropylacrylamide- co-2-hydroxyethylacrylate]-based nanoparticle networks. *Drug Deliv.* **2006**, 13, 245-251.
- 159 Jin, H.; Liu, X.; Gui, R.; Wang, Z. Facile synthesis of gold nanorods/hydrogels core/shell nanospheres for pH and near-infrared-light induced release of 5-fluorouracil and chemo-photothermal therapy. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **2015**, 128, 498-505.

-
- 160 Zhang, M.; Jin, X.; Gou, G. Preparation and characterization of magnetic thermosensitive fluorouracil micelles. *J. Biomat. Sci. Polymer Ed.* **2016**, *27*, 773-791.
- 161 Zhang, L.; Chen, L.; Zhang, H.; Yang, Y.; Liu, X. Recognition of 5-fluorouracil by thermosensitive magnetic surface molecularly imprinted microspheres designed using a computational approach. *J. Appl. Polymer Sci.* **2017**, *134*, art. no. 45468.
- 162 Li, G.; Song, S.; Zhang, T.; Qi, M.; Liu, J. PH-sensitive polyelectrolyte complex micelles assembled from CS-g-PNIPAM and ALG-g-P(NIPAM-co-NVP) for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 203-210.
- 163 Naga, V.; Shivakumar, S.; Fathima, S. J.; Radha, V.; Khanum, F. PH and thermosensitive 5-fluorouracil loaded poly(NIPAM-co-AAc) nanogels for cancer therapy. *RSC Advances* *6*, 105495-105507.
164. Li, G.; Guo, L.; Wen, Q.; Zhang, T. Thermo- and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release. *Intern. J. Biol. Macromol.* **2013**, *55*, 69-74.
165. Li, W.; Guo, Q.; Zhao, H.; Zhang, L.; Li, J.; Gao, J.; Qian, W.; Li, B.; Chen, H.; Wang, H.; Dai, J.; Guo, Y. Novel dual-control poly(*N*-isopropylacrylamide-cochlorophyllin) nanogels for improving drug release. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 383-392.
166. Andrei, M.; Turturica, G.; Stanescu, O.; Teodorescu, P. Thermosensitive injectable hydrogels from poly(*N*-isopropylacrylamide)-dextran aqueous solutions: thermogelation and drug release properties. *M. Soft Mater.* **2016**, *14*, 162-169.
167. Jun, Y.; Choi, J. Heterostructured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities. *Chem. Commun.* **2007**, 1203-1214.

-
168. Kittel, C. Theory of the structure of ferromagnetic domains in films and small particles. *Phys. Rev.* **1946**, 70, 965-971.
169. Lu, A. H.; Salabas, E. L. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. *Angew Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1222-1244.
170. Laurent, S.; Forge, D. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064-2110.
171. Pankhurst, Q. A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, 167-181.
172. Huang, X.; Zhuang, D. General strategy for designing functionalized magnetic microspheres for different bioapplications. *Langmuir* 2009, 25, 11657-11663.
173. Mailander, V.; Landfester, K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2379-2400.
174. Wang, H.; Luo, W.; Chen, J. Fabrication and characterization of thermoresponsive Fe₃O₄@pNIPAM hybrid nanomaterials by surface-initiated RAFT polymerization. *J. Mater. Sci.* **2012**, 47, 5918-5925.
175. Aqil, A.; Vasseur, S.; Duguet, E.; Passirani, C.; Benoit, J. P.; Jerome, R.; Jerome, C. Magnetic nanoparticles coated by temperature responsive copolymers for hyperthermia. *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3352-3360.
176. Li, Q.; Zhang, L.; Bai, L.; Zhang, Z.; Zhu, J. Multistimuli-responsive hybrid nanoparticles with magnetic core and thermoresponsive fluorescence-labeled shell via surface-initiated RAFT polymerization. *Soft Matter*, **2011**, 7, 6958-6960.
177. Guo, W.; Wang, Q.; Luan, Y.; Wang, G.; Dong, W.; Yu, J. Fabrication of hierarchical Fe₃O₄@SiO₂@P(4VP-DVB)@Au nanostructures and their enhanced catalytic properties. *Chem. Asian J.* **2015**, 10, 701-708.

-
178. Laurenti, M.; Guardia, P.; Contreras Cáceres, R. Synthesis of thermosensitive microgels with tunable magnetic core. *Langmuir* **2011**, *27*, 10484-10491.
179. Kim, H.; Jo, A.; Baek, S.; Lim, D.; Park, S. Y.; Cho, S. K.; Chung, J. W.; Yoon, J. Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41090.
180. Shen, B. B.; Gao, X. C.; Yu, S. Y.; Ma, Y.; Ji, C. H. Fabrication and potential application of a di-functional magnetic system: magnetic hyperthermia therapy and drug delivery. *Crystengcom* **2016**, *18*, 1133-1138.
181. Shen, B.; Ma, Y.; Yu, S.; Ji, C. Smart multifunctional magnetic nanoparticle-based drug delivery system for cancer thermo-chemotherapy and intracellular imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 24502-24508.
182. Behera, S.; Debata, A. Biomedical applications of silver nanoparticles. *J. Asian Sci. Res.* **2011**, *1*, 27-56.
183. Chen, X.; Schluesener, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* **2008**, *176*, 1-12.
184. Panyman, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 329-347.
185. Jhaveri, J. H.; Murthy, Z. A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. *Desalination* **2016**, *379*, 137-154.
186. Sun, Z.; Chen, F. Hydrophilicity and antifouling property of membrane materials from cellulose acetate/polyethersulfone in DMAc. *J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 143-150.
187. Romero, V.; Vázquez, M. I. Study of ionic and diffusive transport through a regenerated cellulose nanoporous membrane. *J. Membr. Sci.* **2013**, *433*, 153-159.

-
188. Klemm, D.; Heublein, B. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3358-3393.
189. Laçin, N. T. Development of biodegradable antibacterial cellulose bases hydrogel membranes for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 67, 22-27.
190. Benavente, J.; Vázquez, M. I.; Hierrezuelo, J.; López-Romero, J. M. Modification of a regenerated cellulose membrane with lipid nanoparticles and layers. Nanoparticle preparation, morphological and physicochemical characterization of nanoparticles and modified membranes. *J. Membr. Sci.* **2010**, 355, 45-52.
191. Vázquez, M. I.; Romero, V.; Hierrezuelo, J.; López-Romero, J. M. Effect of lipid nanoparticles inclusion on transport parameters through regenerated cellulose membranes. *J. Membr. Sci.* **2011**, 370, 70-75.
192. Ahamed, M. I. N.; Sankar, S. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 72, 680-686.
193. Cloete, T. E.; Kwaadsteniet, M.; López-Romero, J. M. Nanotechnology in water treatment applications. *Norfolk: Caister Academic Press.* **2010**.
194. Isogai, A.; Usuda, M.; Koto, T. Solid-state CP/MAS carbon-13 NMP study of cellulose polymorphs. *Macromol.* **1989**, 22, 3168-3172.
195. Ramos, J. D.; Milano, C. Water effect on physical-chemical and elastic parameters for a dense cellulose regenerated membrane: transport of different aqueous electrolyte solutions. *J. Membr. Sci.* **2010**, 352, 153-159.
196. Li, Z.; Wang, L. Improved cell infiltration and vascularization of three-dimensional bacterial cellulose nanofibrous scaffolds by template biosynthesis. *Cellulose*, **2015**, 22, 373-383.

-
197. Stevanović, M. M.; Škapin, S. D. Poly (lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-induced potential. *Polymer* **2012**, 53, 2818-2828.
 198. Mulder, M. Basic principles of membrane technology. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers* **1992**.
 199. Meyer, K. H.; Sievers, J. F. La perméabilité des membranes I. Théorie de la perméabilité ionique. *Helv. Chim. Acta* **1936**, 19, 649-664.
 200. Teorell, T. Transport phenomena in membranes. *Disc. Faraday Soc.* **1956**, 21, 9-26.
 201. Demish, H. U.; Push, W. *Colloid Interface Sci.* **1979**, 69, 247-255.
 202. Robinson, R. A.; Stokes, R. H. Electrolyte Solutions. *London: Butterworths.* **1968**.
 203. Matsumura, Y.; Yoshikata, K. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 4278-4281.
 204. Ahearn, D. G.; May, L. L. Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **1995**, 15, 372-376.
 205. Kim, J. Y.; Lee, C. Enhanced inactivation of E. Coli and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. *Water Res.* **2008**, 42, 356-362.
 206. Schreurs, W. J. A.; Rosenberg, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1982**, 152, 7-13.
 207. Feng, Q. L.; A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J. Biomed. Mat. Res.* **2010**, 52, 662-668.