

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Orgánica  
Laboratorio de Materiales Poliméricos

**NANODISPOSITIVOS MAGNÉTICOS Y  
TERMOSENSIBLES: síntesis, estudios de sus  
propiedades físico-químicas y potencial  
aplicación en nanomedicina**

TESIS DOCTORAL

Catalina Biglione

Córdoba, 2017



Esta Tesis se presenta para optar al grado académico de  
Doctora en Ciencias Químicas

**Directora**

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

**Comisión evaluadora**

Prof. Dra. Carla E. Giacomelli

Prof. Dra. Gabriela I. Lacconi

Prof. Dra. Natalia L. Pacioni

Prof. Dr. Federico J. Williams





*A mis abuelos que siempre decían:*

*“Estudia, y no serás cuando crecido, ni el juguete vulgar de las pasiones, ni el esclavo servil de los tiranos.”*

*Eliás Calixto Pompa*



## Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas y entidades que hicieron posible el desarrollo tanto de la Tesis Doctoral como de mi persona.

A mi país, por haberme dado la oportunidad de formarme de manera gratuita. A la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por hacer posible el desarrollo de mis estudios. Al Departamento de Química Orgánica y a la Escuela de Posgrado por su acompañamiento sobre todo en esta última etapa.

A mi directora, Miriam, mamá Miriam, por todo lo que me enseñó, ayudándome a tener una formación integral. Por darme libertad e independencia y confiar en mi criterio. Gracias por todo tu apoyo, especialmente en este último trayecto de mi carrera, pudiendo cumplir juntas el desafío que nos planteamos.

A los miembros de mi Comisión de Tesis, Dras. Natalia Pacioni, Gabriela Lacconi y Carla Giacomelli, por su ayuda y aporte durante estos años y, sobre todo, en la etapa de la escritura. Al Dr. Federico Williams, por aceptar evaluar mi Tesis.

A las entidades que financiaron este trabajo, CONICET, FONCyT y SECyT-UNC. A los organismos que me permitieron económicamente llevar a cabo mi Doctorado: a CONICET por la beca de posgrado otorgada, al DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico) y SFB (Integrated Research Training Group of the CRC 1112) por las becas que me permitieron realizar una estadía de seis meses en la Universidad Libre de Berlín.

A los investigadores que colaboraron estrechamente conmigo y con esta Tesis, al grupo del Dr. Marcelo Calderón de la Freie Universität Berlin (Alemania), al grupo del Dr. Jayant Khandare del Mahastra Institute of Pharmacy, Kothrud, Pune (India) y al investigador Dr. Bastian Klemke de Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie (Alemania).

A Marce, por darme la posibilidad de ir a su grupo y por volver a confiar en mí en esta nueva etapa. Fue una experiencia increíble y agradezco todo lo que me enseñó en incontables aspectos. Porque es una gran persona, increíblemente inteligente, con la que se puede hablar de todo, ciencias, joda, libros, viajes, etc.

A Ju, Ortiguín, por haberme enseñado todo lo que me enseñó (que no es poco), acompañándome codo a codo en la mesada. Porque es un placer trabajar con él, contagiándome constantemente su entusiasmo. Por las incontables horas que nos pasamos discutiendo resultados, formando así mi propio criterio.

A LaMaP, mi querido polígrup, por acompañarme estos años. A todos por los buenos y divertidos momentos, los mates, las meriendas, las comidas. A las tías Ceci y Mari. A Ceci por su bondad y calidez. A Mari por llevarme por el camino de la articulación y extensión, por transferirme su pasión por la docencia. A César y a Vero por su ayuda. A Marce R. por haberse sentado al lado mío y tranquilizarme cuando

tuve que enfrentarme por primera vez al ultrasonicador, nunca lo voy a olvidar. A Facu por todos sus consejos y apoyo. A todos los chicos con los que pude compartir este tiempo Ariel, Gabi, Flor, Agus, Cin, Gas, David, Ale, Nana, Fer, Mati, Mica, Martín, Giuli, Pancho, Jime, Ly.

A Martín, Mica y Nachito por haber compartido la mesada conmigo. Fue un placer el tiempo compartido y aprendí mucho de ustedes.

También quisiera agradecer al grupo del Marce por haberme integrado y hacerme sentir como una más, y por los cafés (mates para algunos) compartidos. A Stefi por toda su ayuda desde su óptica bio. A Katrin y Arturo, por las divertidas horas de Iron Maiden y Lady Gaga gloves. A Gregor por su inmensa ayuda en mi accidentada llegada a Berlín. A Mazdak, Ana y Martina por haber trabajado conmigo.

A mis alumnos, porque aprendí muchísimo de ellos y me hicieron descubrir mi pasión por la docencia; porque me han dado muchas satisfacciones como docente.

A Cin, Jime, Gas, Dei, Agus y Alexis por haber sido compañeros de viajes, llenándome de anécdotas increíbles como "Posadas", David esperándonos que compráramos en Flores, y "un poquito nada más, no quisiera acabarles su comida".

A mis lectoras queridas que me ayudaron a acelerar el proceso de escritura, Ya y mamá, por estar dispuestas a someterse a tal desafío.

A Copi, cobra cocó, por todos estos años de amistad, consejos y risas. Porque siempre es más fácil construir algo si se lo hace acompañado. Al Lobito, gracias por compartir todos estos años de amistad conmigo y tu inmensa ayuda a la hora de hacer figuras y esquemas. Tengo la suerte de haberte conocido, ¡el mundo entero de ponys para vos amigo!

A Luri, María, ¿qué decir? Un pilar importantísimo en mi vida desde aquel día en que compartimos la primera clase de la carrera, cursando absolutamente todo juntas y siendo compañeras de lab durante tantos años. Por todos los recuerdos que compartimos. Porque es una amiga increíble que siempre está ahí, acompañándome y apoyándome.

A Jime, por sus charlas consejos, por entenderme tan bien generando así una complicidad desmesurada. Por los viajes y momentos compartidos. A Ly, la Gurke, por haber compartido conmigo tantas experiencias, el viaje a Alemania, nuestro turismo de alto impacto y nuestros peligrosos días de compras. A Piki, por nuestras charlas diarias camino al lab, por la amistad que tenemos.

A Nanita, por tener tantas cosas en común (comidas, series, colores, libros, etc.) que hicieron posible que en tan poco tiempo pudiéramos ser grandes amigas. A Mica por compartir conmigo el sinuoso camino de la ATRP, con largas tardes de reggeaton, y por su amistad. A ambas por la gran mano que me dieron en esta última etapa, estando al pie del cañón para cualquier cosa que necesité.

A todos los miembros del Departamento de Química Orgánica. A Pauli, por ser una gran amiga-guía, siempre brindándome su compañía y consejos. A Nativity por su buena onda. Al grupo de Comidas del departamento, por los lindos momentos y buenas comidas compartidas. A los amigos y amigas del pasillo, Huguito, Rox, Daf. A mis jóvenes amigos (Sense8), Nana, Andrés, Nacho por su apoyo y compañía. A las Natis, Nati Pi y Nati Po, por las interminables horas de charlas y meriendas que compartimos, por esta hermosa amistad que tenemos.

A los hermanos que me dio la Facultad, Rafa, Maupi e Ivi, por estar siempre. A Toti y Bani por haber crecido juntas compartiendo tantas horas de estudios que de a poco se fueron convirtiendo en tardes de charlas y meriendas. A Lu, Some, por acompañarme y aconsejarme.

A mis amigos de la vida, por estar siempre y apoyarme. Por crecer conmigo y por crear una amistad basada en el acompañamiento por más distintos que sean los rumbos que tomamos. A las Intensas por sus ocurrencias y las eternas tardes/noches de risas. A las Veges, Natty y Chechu, por estar. A mis amigas desde el jardincito, Ya, Luci y Euge, por todos los momentos compartidos. A mi médico favorito, Manu, por toda su asistencia en cuanto a la terminología clínica.

A mi familia, mis padres y mi hermano, Joaco, por todo el apoyo y paciencia, en especial en este último tiempo en el cual era más fácil verme en figuritas. A la Mamu, por su incondicional apoyo. Porque dirán que nos parecemos tanto, pero eso es bueno, porque de ella aprendí la capacidad del esfuerzo y entendí el significado del término tenacidad. Por haberme contagiado sus ganas de crecer y de viajar, ante todo. Por alentarme a cumplir mis metas, porque siempre con esfuerzo y trabajo, todo es posible. A mi Abu, Nita, por todo su amor y dulzura. A mi familia de corazón, Moni, Majo, Gon y mis sobris Tomi y Agus por todo su amor. A mis tías y tíos de corazón que siempre están cuando las necesito.

A Gino, por su calma y cariño. Por bajarme los decibeles cuando todo se me va de las manos. Por hacer esta etapa un poco más llevadera con su compañía incondicional y palabras de aliento. Y, especialmente, por darme la fuerza necesaria para aventurarme en esta nueva etapa que comienza.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>SECCIÓN 1</b>	
<b><i>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES</i></b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. NANOMEDICINA Y NANODISPOSITIVOS</b>	<b>3</b>
1.1 NANOESCALA Y NANOTECNOLOGÍA	5
1.2 NANOMEDICINA	6
1.3 NANODISPOSITIVOS Y NANOTRANSPORTADORES	9
1.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	13
1.4.1 Nanopartículas magnéticas para hipertermia	14
1.4.2 Nanopartículas magnéticas para hipertermia como agente de contraste en Imágenes de Resonancia Magnética (IRM)	15
1.5 TERAGNOSIS	16
1.6 REFERENCIAS	17
<b>CAPÍTULO 2. NANOGELES Y NANOPARTÍCULAS CORE-BRUSH</b>	<b>23</b>
2.1 NANOGELES	25
2.1.1 Nanogeles híbridos	27
2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH	30
2.3 METODOLOGÍAS DE SÍNTESIS DE NANOGELES Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH	31
2.3.1 Tipos de polimerización	31
2.3.1.1 Polimerización radicalaria no controlada	31
2.3.1.2 Polimerización por apertura de anillo (PAA)	32
2.3.1.3 Polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP)	34
2.3.2 Química <i>click</i> promovida por tensión anular	35
2.3.3 Metodologías de síntesis	36
2.3.3.1 Polimerización por termoprecipitación	37
2.3.3.2 Nanoprecipitación	39
2.4 ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS DE ESTUDIO	40
2.4.1 Nanogeles termosensibles	40
2.4.2 Nanogeles híbridos	41
2.4.3 Nanopartículas magnéticas <i>core-brush</i>	42

2.5 REFERENCIAS	44
<b>MOTIVACIÓN Y OBJETIVO GENERAL</b>	<b>53</b>
<b>SECCIÓN 2</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
3.1 MATERIALES	61
3.2 METODOLOGÍAS	62
3.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas (MNP)	62
3.2.2 Síntesis de dansilazida	62
3.2.3 Modificación superficial de MNPs	62
3.2.3.1 <i>Funcionalización con grupos vinilos</i>	62
3.2.3.2 <i>Funcionalización con grupos aminos</i>	62
3.2.3.3 <i>Funcionalización con grupos BCN</i>	63
3.2.3.4 <i>Funcionalización con grupos halógeno</i>	63
3.2.3.4.1 <i>Funcionalización con grupos cloruro</i>	63
3.2.3.4.2 <i>Funcionalización con grupos bromuro</i>	63
3.2.4 Síntesis de poliglicerol termosensible (tPG)	64
3.2.4.1 <i>Síntesis de poliglicerol, Br-tPG-OH (5,10,15 KDa)</i>	64
3.2.4.2 <i>Síntesis de poliglicerol monoazidado, tPG-N<sub>3</sub> (10 KDa)</i>	64
3.2.4.3 <i>Síntesis de poliglicerol diazidado, N<sub>3</sub>-tPG-N<sub>3</sub> (5 y 15 KDa)</i>	64
3.2.5 Conjugación de transferrina (Tf) al espaciador derivado de PEG	65
3.2.6 Síntesis de nanogeles	65
3.2.6.1 <i>Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles (NG)</i>	65
3.2.6.2 <i>Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles magnéticos (MNG)</i>	67
3.2.6.3 <i>Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles magnéticos mediante química click</i>	67
3.2.6.4 <i>Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles magnéticos decorados con transferrina (MNG@Tf)</i>	68
3.2.7 Modificación de nanogeles con Rodamina B	69
3.2.8 Síntesis de nanopartículas magnéticas core-brush	70
3.2.8.1 <i>Síntesis de nanopartículas magnéticas core-brush mediante ATRP</i>	70
3.2.8.1.1 <i>Síntesis mediante ATRP en solución</i>	70
3.2.8.1.2 <i>Síntesis mediante ATRP en masa</i>	70
3.2.8.2 <i>Síntesis de nanopartículas magnéticas core-brush mediante química click y ultrasonicación</i>	70

3.2.9 Caracterización	70
3.2.9.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	70
3.2.9.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (RMN 1H)	71
3.2.9.3 Análisis termogravimétricos (TGA)	71
3.2.9.4 Espectrofotometría UV-Visible	71
3.2.9.5 Dispersión de luz dinámica (DLS)	71
3.2.9.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)	71
3.2.9.7 Microscopia de fuerza atómica (AFM)	72
3.2.9.8 Medidas de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)	72
3.2.9.9 Experimentos de turbidimetría	72
3.2.9.10 Espectrometría de masas MALDI-TOF	72
3.2.9.11 Cromatografía de permeación de gel (GPC)	72
3.2.9.12 Dicroísmo circular (CD)	73
3.2.9.13 Caracterización magnética	73
3.2.9.13.1 Estudios de magnetización	73
3.2.9.13.2 Imágenes de resonancia magnética	73
3.2.9.14 Cuantificación de transferrina mediante el ensayo de Bradford	74
3.2.10 Ensayos de irradiación de infrarrojo cercano (NIR)	74
3.2.11 Encapsulación de clorhidrato de doxorubicina	74
3.2.11.1 Encapsulación a los MNGs basados en OEG	74
3.2.11.2 Encapsulación a los MNGs y nanopartículas core-brush basados en tPG	74
3.2.12 Ensayos de liberación de clorhidrato de doxorubicina	75
3.2.13 Estudios biológicos	75
3.2.13.1 Estudios de viabilidad celular <i>in vitro</i>	75
3.2.13.2 Estudios de internalización celular	75
3.2.13.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC)	76
3.2.13.4 Estudio de eficiencia de captura de una solución artificial de CTC	76
3.3 REFERENCIAS	77
<b>SECCIÓN 3</b>	
<b>NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 4. SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES MEDIANTE POLIMERIZACIÓN RADICALARIA NO CONTORLADA</b>	<b>81</b>
4.1 INTRODUCCIÓN	83

4.2 OBJETIVOS	86
4.3 RESULTADOS	87
4.3.1 Síntesis de nanogeles termosensibles	87
4.3.2 Análisis de las propiedades de los nanogeles	90
4.3.2.1 Caracterización de los nanogeles	92
4.3.2.2 Análisis del tamaño de los nanogeles	94
4.3.2.3 Análisis del comportamiento termosensible de los nanogeles	95
4.3.3 Estudios biológicos de los nanogeles	96
4.3.3.1 Estudios de citotoxicidad de los nanogeles	97
4.3.3.2 Estudios de internalización celular de los nanogeles	98
4.4 CONCLUSIONES PARCIALES	100
4.5 REFERENCIAS	101
<b>CAPÍTULO 5. NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES MEDIANTE POLIMERIZACIÓN RADICALARIA NO CONTORLADA</b>	<b>105</b>
5.1 INTRODUCCIÓN	107
5.2 OBJETIVOS	109
5.3 RESULTADOS	110
5.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas	110
5.3.2 Síntesis de nanogeles magnéticos y termosensibles	113
5.3.3 Análisis de las propiedades de los nanogeles magnéticos y termosensibles	116
5.3.3.1 Análisis del efecto de las MNP@MEMO en el tamaño y $T_{if}$ de los MNG	117
5.3.3.2 Análisis del efecto de la relación molar de los monómeros en el tamaño y $T_{if}$ de los MNG	119
5.3.4 Respuesta de los nanogeles magnéticos y termosensibles a estímulos externos	122
5.3.4.1 Estudios de magnetización	123
5.3.4.2 Estudios de irradiación de infrarrojo cercano (NIR)	124
5.3.5 Estudios de citotoxicidad de los nanogeles magnéticos y termosensibles	126
5.3.6 Estudios de liberación controlada de fármacos	127
5.4 CONCLUSIONES PARCIALES	129
5.5 REFERENCIAS	130
<b>CAPÍTULO 6. NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES MEDIANTE QUÍMICA CLICK</b>	<b>133</b>
6.1 INTRODUCCIÓN	135
6.2 OBJETIVOS	137
6.3 RESULTADOS	138

6.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas	138
6.3.2 Síntesis de poliglicerol lineal termosensible diazidado (N <sub>3</sub> -tPG-N <sub>3</sub> )	142
6.3.3 Síntesis y caracterización de nanogeles magnéticos y termosensibles	143
6.3.4 Estudio de potenciales aplicaciones de los nanogeles magnéticos en nanomedicina	148
6.3.4.1 Estudios de liberación controlada de fármacos	148
6.3.3.2 Estudios de eficiencia de captura de células circulantes de metástasis	150
6.3.4.2.1 Conjugación de la transferrina al espaciador	152
6.3.4.2.2 Síntesis de los nanogeles magnéticos funcionalizados con transferrina (MNG@Tf)	155
6.3.4.2.3 Eficiencia de captura de CTCs de los distintos MNG@Tf	157
6.4 CONCLUSIONES PARCIALES	163
6.5 REFERENCIAS	165
<b>SECCIÓN 4</b>	
<b>NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH</b>	<b>171</b>
<b>CAPÍTULO 7. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH MEDIANTE ATRP</b>	<b>173</b>
7.1 INTRODUCCIÓN	175
7.2 OBJETIVOS	177
7.3 RESULTADOS	178
7.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas	178
7.3.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas <i>core-brush</i>	180
7.4 CONCLUSIONES PARCIALES	187
7.5 REFERENCIAS	188
<b>CAPÍTULO 8. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH MEDIANTE QUÍMICA CLICK</b>	<b>191</b>
8.1 INTRODUCCIÓN	193
8.2 OBJETIVOS	195
8.3 RESULTADOS	196
8.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas	196
8.3.2 Síntesis de poliglicerol lineal termosensible monoazidado (tPG-N <sub>3</sub> )	197
8.3.3 Síntesis de nanopartículas magnéticas <i>core-brush</i>	197
8.3.4 Estudios de liberación controlada de fármacos	200
8.4 CONCLUSIONES PARCIALES	203
8.5 REFERENCIAS	204

<b>SECCIÓN 5</b>	
<b>CONSIDERACIONES FINALES</b>	<b>207</b>
<b>CAPÍTULO 9. CONSIDERACIONES FINALES</b>	<b>209</b>
9.1 CONCLUSIÓN GENERAL	211
9.2 PROYECCIONES	215
9.3 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	216

## ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido acrílico
<b>AAEM</b>	Acetoacetoxietil metacrilato
<b>AFM</b>	Microscopia de fuerza atómica
<b>AGA</b>	Ácido acrilamidoglicólico
<b>AM</b>	Acrilamida
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>APTES</b>	(3-aminopropil) trietoxisilano
<b>ATRP</b>	Polimerización radicalaria por transferencia atómica
<b>BAC</b>	N,N'-bis(acriloil) cistamina
<b>BCN</b>	Biciclononeno
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
<b>CMA</b>	Campo magnético alternante
<b>CPM</b>	(3-cloropropil) trimetoxisilano
<b>CTC</b>	Células circulantes de metástasis
<b>DLC</b>	Contenido del fármaco en el nanodispositivo
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica
<b>DMAEM</b>	(2-dimetilamino) etil metacrilato
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>DOX.HCl</b>	Doxorrubicina clorhidrato
<b>EE</b>	Eficiencia de encapsulación
<b>EGE</b>	Etil glicidil éter
<b>EPR</b>	Efecto de permeabilidad y retención mejorada
<b>FDA</b>	Administración federal de alimentos y medicamentos
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
<b>GME</b>	Glicidil metil éter
<b>GPC</b>	Cromatografía de permeación de gel
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>HEMA</b>	2-hidroxietil éter metacrilato
<b>HMTETA</b>	1,1,4,7,10,10-Hexametiltriethylentetramina
<b>HPMA</b>	N-(2-hidroxipropil) metacrilamida
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración mínima necesaria para reducir la población de células al 50 %
<b>IRM</b>	Imágenes de resonancia magnética
<b>MALDI-TOF</b>	Espectrometría de masas MALDI-TOF
<b>MEMO</b>	3-(metacriloxi)propil trimetoxisilano
<b>MEO<sub>2</sub>MA</b>	Di(etilenglicol) metil eter metacrilato
<b>MMA</b>	Metacrilato de metilo
<b>MNG</b>	Nanogel magnético
<b>MNG@Tf</b>	Nanogel magnético decorado con transferrina
<b>MNP</b>	Nanopartícula magnética
<b>MNP@APTES</b>	Nanopartícula magnética recubierta con APTES
<b>MNP@BCN</b>	Nanopartícula magnética recubierta con BCN

<b>MNP@Br</b>	Nanopartícula magnética recubierta con Br
<b>MNP@Cl</b>	Nanopartícula magnética recubierta con Cl
<b>MNP@MEMO</b>	Nanopartícula magnética recubierta con MEMO
<b>N<sub>3</sub>-tPG-N<sub>3</sub></b>	Poliglicerol termosensible diazidado
<b>N<sub>3</sub>-PEG<sub>n</sub>-NHS</b>	Espaciador Azida-polietilenglicol <sub>n</sub> -NHS éster
<b>NG</b>	Nanogel
<b>NIPA</b>	N-isopropilacrilamida
<b>NIR</b>	Infrarrojo cercano
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>NTA</b>	Medidas de análisis de rastreo de nanopartículas
<b>OEG</b>	Oligoetilenglicol
<b>OEGMA</b>	Oligo(etilenglicol) metil eter metacrilato
<b>PAA</b>	Polimerización por apertura de anillo
<b>PDI</b>	Índice de polidispersidad
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PG</b>	Poliglicerol
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>RES</b>	Sistema retículo endotelial
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de protones
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SEM</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>SPION</b>	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
<b>T<sub>tf</sub></b>	Temperatura de transición de fase
<b>TEGDMA</b>	Tetra(etilenglicol) dimetacrilato
<b>TEM</b>	Microscopia electrónica de transmisión
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamina
<b>Tf</b>	Transferrina
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>tPG</b>	Poliglicerol termosensible
<b>tPG-N<sub>3</sub></b>	Poliglicerol termosensible monoazidado
<b>UV-Vis</b>	Espectrofotometría ultravioleta-visible
<b>VCL</b>	Vinilcaprolactama
<b>VIm</b>	Vinilimidazol

## RESUMEN

La nanomedicina busca superar nuevos desafíos y problemas que enfrenta la medicina convencional como la toxicidad sistémica y efectos adversos de los agentes anticancerígenos disponibles en la actualidad. Ambas disciplinas son responsables del diagnóstico, tratamiento, prevención de enfermedades, y del alivio del paciente mejorando su calidad de vida. En las terapias convencionales, las moléculas de fármacos simplemente se difunden y distribuyen libremente en todo el cuerpo causando así, efectos secundarios indeseables y limitando el uso de la dosis máxima para un tratamiento eficaz. Con el fin poder superar las limitaciones asociadas con las formulaciones convencionales de fármacos, surge el concepto y la implementación de nanodispositivos y nanotransportadores. Estos tienen el potencial de modular tanto los perfiles farmacocinéticos como farmacodinámicos de los medicamentos mejorando de esta manera su índice terapéutico. Consecuentemente, su incorporación en nanodispositivos puede incrementar su estabilidad *in vivo*, extender su tiempo de circulación sanguínea y permitir la liberación controlada de los mismos en un sitio determinado.

En este contexto, se ubica el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: **“NANODISPOSITIVOS MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES: síntesis, estudios de sus propiedades físico-químicas y potencial aplicación en nanomedicina”**. Este trabajo tiene como objetivo principal el diseño racional de nanodispositivos híbridos, formados con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y un polímero termosensible, mediante el empleo de una metodología de síntesis novedosa como es la síntesis asistida por ultrasonificación.

En la tesis doctoral se describe la síntesis de distintos nanodispositivos con el fin de obtener dos morfologías diferentes: nanogeles híbridos, en los que las nanopartículas magnéticas (MNPs) están unidas químicamente a una red tridimensional polimérica y del tipo *core-brush*, siendo el corazón la MNP con cadenas poliméricas unidas covalentemente a su superficie. El objetivo de este estudio es la obtención de nanogeles híbridos y nanopartículas magnéticas *core-brush* para su potencial aplicación en nanomedicina. Para ello, se desarrolló una nueva metodología de síntesis de distintos sistemas empleando ultrasonificación. Consecuentemente, se demostró el potencial que presenta esta metodología como herramienta de síntesis no sólo de nanogeles y nanopartículas *core-brush* sino también, para la modificación superficial de nanopartículas con diferentes agentes silano.

En una primera etapa, en el estudio de los nanogeles, se evaluó la síntesis de nanogeles termosensibles mediante polimerización radicalaria no controlada; para poder luego, estudiar la incorporación de nanopartículas magnéticas de manera covalente a los fines de obtener nanogeles

magnéticos y termosensibles. Los mismos presentaron alta estabilidad coloidal en el tiempo, comportamiento termosensible que puede ser controlado a partir de las condiciones de síntesis, propiedades superparamagnéticas y respuesta a irradiación de infrarrojo cercano (NIR) enfatizando su potencial uso para el tratamiento por hipertermia, así como tiempos de relajación similares a los agentes comerciales utilizados en la actualidad en resonancia magnética de imágenes.

Por otro lado, se estudió la síntesis de nanogeles magnéticos y termosensibles mediante química *click* y nanoprecipitación asistida por ultrasonificación obteniendo resultados prometedores similares a los expuestos para los nanogeles magnéticos sintetizados vía polimerización radicalaria. Además, se evaluó la potencial aplicación de los mismos en el campo de la nanomedicina. Se demostró la factibilidad del empleo de estos sistemas tanto para liberación controlada de fármacos, así como también para la captura de células circulantes de metástasis.

En una segunda etapa, se estudió la síntesis de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush* mediante polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP) y mediante química *click*. Aquellas nanopartículas sintetizadas mediante esta última técnica demostraron tener potencial aplicación en el campo de la liberación controlada de fármacos.

La Tesis ha sido organizada en cinco secciones. La primera consta de la introducción y los objetivos generales. En ésta se desarrollan conceptos relacionados a la temática abordada ofreciendo una revisión de los principales antecedentes para luego plantear la motivación y los objetivos de este trabajo. En la segunda sección, Materiales y Métodos, se encuentra detallado el desarrollo experimental utilizado para este trabajo de tesis. La tercera y cuarta sección presentan el estudio de cada uno de los sistemas desarrollados. Finalmente, la quinta parte contiene las consideraciones finales de este trabajo. A su vez, cada una de dichas secciones está dividida en capítulos, con su introducción, objetivos específicos, desarrollo y conclusiones.

El desarrollo de esta Tesis de Doctorado fue posible debido a la colaboración y al trabajo conjunto de investigadores de distintas áreas. Este estudio se destacó por su carácter multi e interdisciplinario y por ser uno de los primeros antecedentes en el Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP) en la investigación de nanomateriales mediante la síntesis asistida por ultrasonificación y la síntesis de nanogeles híbridos termosensibles.

## ABSTRACT

One of the main goals of nanomedicine is to overcome the challenges and problems that conventional medicine presents. Both disciplines comprise the diagnosis, treatment and prevention of diseases, as well as the patient relief improving their life quality. In conventional therapies, drug molecules simply diffuse and distribute freely throughout the body thus causing undesirable side effects and limiting the use of the dose required for effective treatment. In order to overcome the pharmacokinetic limitations associated with conventional drug formulations, concepts such as nanodevices and nanocarriers emerged. These systems have the potential to modulate both pharmacokinetic and pharmacodynamic drug profiles thus improving their therapeutic index. Therefore, incorporation of drugs into nanodevices may increase their stability in vivo, extend their blood circulation time and allow controlled release of the drug at a given site.

In this context, the present PhD thesis entitled: '**MAGNETIC AND THERMORESPONSIVE NANODEVICES: Synthesis, studies of their physicochemical properties and potential applications in nanomedicine**' was carried out. This work had as main objective the rational design of hybrid nanodevices, formed by iron oxide magnetic nanoparticles and a thermoresponsive polymer using a novel ultrasound assisted synthetic methodology.

This thesis describes the synthesis of different nanodevices with two different morphologies: hybrid nanogels, in which MNPs are chemically linked to a three-dimensional polymer network and *core-brush* nanoparticles, in which the MNP is the core and polymer chains are attached to their surface by covalent bonds. The main goal of this study was to obtain hybrid nanogels and *core-brush* magnetic nanoparticles for their potential application in nanomedicine. For this purpose, a new synthetic methodology of different systems was developed using ultrasonication. The methodology established was a key tool of great importance for this work, since it allows the synthesis of not only nanogels and *core-brush* nanoparticles but also nanoparticles surface modification with different silane agents.

In a first stage, nanogels synthesis was studied. To begin with, ultrasound assisted synthesis of thermoresponsive nanogels was evaluated using free radical polymerization; then we studied the covalent incorporation of magnetic nanoparticles to obtain magnetic and thermoresponsive nanogels. These systems showed high colloidal stability over time, thermoresponsive behavior that can be controlled with the conditions of synthesis, and superparamagnetic properties and response to near-infrared irradiation (NIR) which emphasize their potential use in hyperthermia treatment. Furthermore, nanogels presented relaxation times

similar to the commercial magnetic agents for magnetic resonance imaging allowing their use in diagnosis.

Afterwards, we studied ultrasound assisted synthesis of magnetic and thermoresponsive nanogels obtained by click chemistry and nanoprecipitation. We obtained promising results like those presented for magnetic nanogels synthesized via radical polymerization. In addition, the potential application of nanomedicine in the field of nanomedicine was evaluated. Potential use of these nanogels was demonstrated for both controlled release of drugs as well as capture of circulating metastatic cells.

In a second stage, the synthesis of magnetic core-brush nanoparticles was studied. We analyzed different synthetic methodologies such as atomic transfer radical polymerization (ATRP) and click chemistry. Those nanoparticles synthesized by this last methodology showed a potential application in the field of controlled drug release.

This Thesis has been organized in five sections. The first part consists of the introduction and general objective, developing the concepts related to the topic addressed and the state of art in this field, following by problem statement and motivation of the research. In Part 2, Materials and Methods, the experimental development used for this thesis work is detailed. Then parts 3 and 4 describe all studied systems. Finally, Part 5 presents the final conclusions of this work. Besides, each of these sections is divided into chapters, with their introduction and specific objectives, discussion and conclusions.

The accomplishment of this doctoral thesis has been possible due to the collaboration and joint work between researchers from different areas. The development of this Thesis stands out for its multi and interdisciplinary nature and for being one of the first antecedents in the Laboratory of Polymeric Materials (LaMaP) in the study of nanomaterials through the ultrasound assisted synthesis of hybrids materials.



# **SECCIÓN I**

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES**





# **C**apítulo 1

## **NANOMEDICINA Y NANODISPOSITIVOS**



## 1.1 NANOESCALA Y NANOTECNOLOGÍA

La **escala nanoscópica** hace referencia a aquellas dimensiones alrededor de  $1 \cdot 10^{-9}$  m. En la Figura 1.1 se muestra una escala que va desde el metro, tamaño que posee un niño de alrededor de 4 años, hasta la décima del nanómetro, en donde se encuentran los átomos. Dentro del rango nanométrico, se sitúan, por ejemplo, los virus, la hemoglobina y la molécula de azúcar.



**Figura 1.1** Ilustración de los diferentes sistemas en el intervalo de los metros a la décima del nanometro.

Si se utiliza como parámetro de comparación el diámetro de un cabello humano, que se encuentra en el rango de 50-100  $\mu$ m, con el de un objeto de diámetro de un nanometro como la molécula de azúcar, éste sería entre 50000 y 100000 veces más pequeño.<sup>1</sup>

La **nanociencia** es el área de la ciencia y la tecnología que estudia las estructuras cuyas dimensiones, o al menos una de ellas, se encuentran entre 1-500 nm.<sup>2,3</sup> Esta ciencia es altamente multidisciplinaria e involucra distintas áreas como la física, la ciencia de los materiales, la química y la ingeniería entre otras áreas.<sup>4,5</sup> En las últimas décadas, se ha incrementado el interés en este campo de investigación ya que la materia en la nanoescala se comporta de una manera totalmente distinta ya sea de las moléculas aisladas como del material masivo. Sus propiedades debidas sólo al tamaño nanométrico del sistema incluyen una gran relación área-volumen, propiedades magnéticas, eléctricas, térmicas, mecánicas y ópticas únicas.<sup>6-8</sup>

En particular, la **nanotecnología** comprende el diseño, fabricación y empleo de nanomateriales.<sup>5,6</sup> Existen distintas definiciones para este concepto variando el área de estudio correspondiente.<sup>9</sup> Por ejemplo, el Comité de la Organización Internacional de Estandarización y Técnica define la **nanotecnología** como el entendimiento y control de la materia y los procesos en la nanoescala. Por su parte, la Iniciativa Nacional en Nanotecnología de EEUU considera que ésta se ocupa además del estudio de las propiedades de los materiales en la nanoescala, de su utilización para la invención de mejores materiales, dispositivos y sistemas, resultando en una innovación tecnológica.<sup>10</sup>

Esta rama de la nanociencia, como ya se ha mencionado, se concentra en el estudio de las propiedades únicas de los materiales resultante de su tamaño nanométrico; debido a ellas, los nanosistemas exhiben particulares propiedades biológicas, químicas, físicas, etc. Este hecho favorece su utilización a escala industrial en distintos campos de aplicación como la medicina, la catálisis, la industria automotor, textil y electrónica, en productos de consumo, en energía sustentable, etc.<sup>6</sup> En este sentido, en la industria textil ya se están desarrollando distintos nanoaditivos que pueden modificar algunas de las propiedades de las fibras naturales como el incremento de la resistencia mecánica y al calor, la durabilidad, la capacidad autolimpiante, el color y el efecto antiséptico. Asimismo, en el área del deporte, Wilson, marca conocida por la manufactura de productos para tenis, introdujo al mercado pelotas con un caucho menos permeable debido al uso de nanoarcillas en la formulación de éste y raquetas más resistentes a causa de la presencia de nanotubos de carbono en el material.<sup>10</sup>

### 1.2 NANOMEDICINA

Se considera que la **Nanomedicina** es la Medicina fusionada con la Nanociencia y la Nanotecnología.<sup>11</sup> La misma, al igual que la nanotecnología, es altamente interdisciplinaria ya que para su desarrollo se requieren conocimientos de diferentes áreas tales como biología, química, física, ingeniería, medicina clínica, etc.<sup>7,12</sup>

Esta área de estudio tiene como objetivo el monitoreo, control, construcción, defensa y mejora de todos los sistemas biológicos humanos, trabajando a nivel molecular y utilizando nanodispositivos para el beneficio médico.<sup>13</sup> En este sentido, la nanomedicina busca superar los desafíos y los problemas que enfrenta la medicina convencional.<sup>8</sup> Actualmente la nanomedicina puede ser responsable del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, y del alivio del paciente mejorando su calidad de vida.<sup>5,13</sup> Para lograr estos objetivos, la investigación de novedosas herramientas analíticas es necesaria y fundamental, así como también el empleo de nanomateriales y nanodispositivos que permitan la creación de nuevos sistemas de liberación de fármacos, sistemas multifuncionales que combinan tanto la terapia como el diagnóstico.<sup>12-14</sup>

La nanomedicina hace uso las propiedades únicas de los materiales debido a sus dimensiones en la nanoescala permitiendo la mejora de las terapias convencionales disponibles en la actualidad. Una de las aplicaciones de la nanomedicina más destacada incluye el empleo de nanodispositivos para el tratamiento del cáncer.<sup>15</sup> El término **cáncer** es utilizado para denominar un grupo heterogéneo de enfermedades malignas en las que las células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Una masa de células cancerosas se llama tumor y un crecimiento incontrolado del mismo, resulta en la destrucción de los tejidos sanos adyacentes

o periféricos. La diseminación de células tumorales a través de la sangre o el flujo linfático conduce a la formación de tumores secundarios o metástasis en otros órganos o tejidos.<sup>16,17</sup>

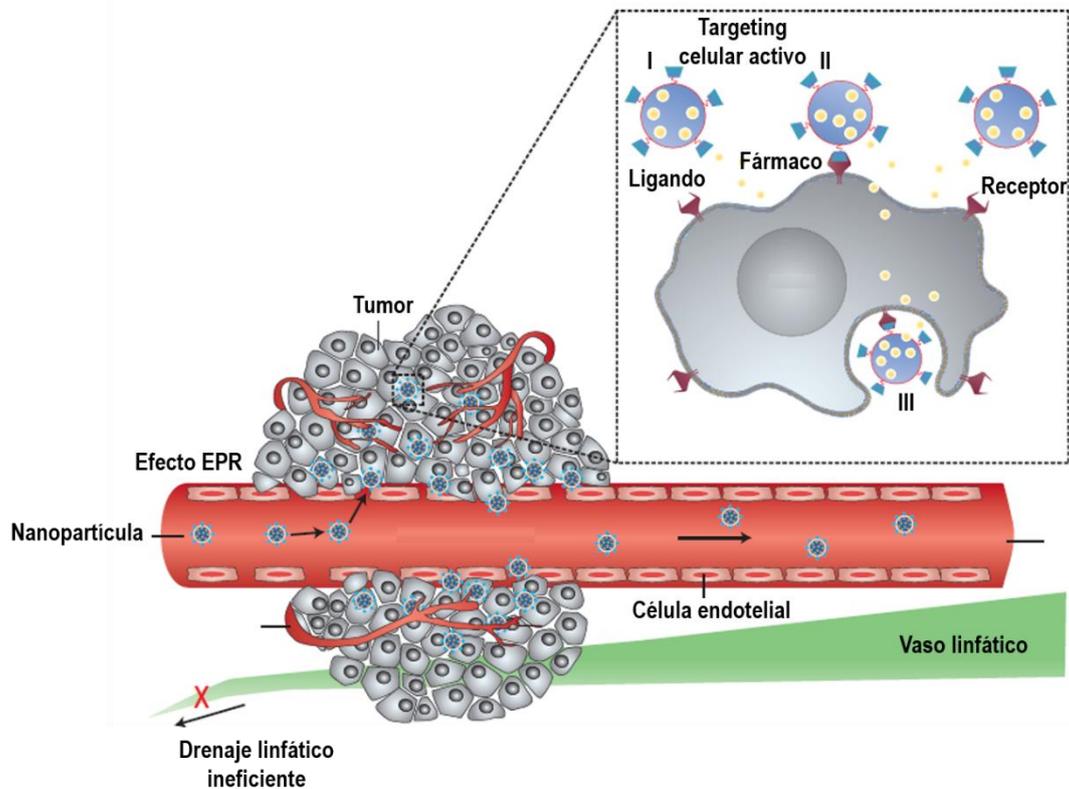
La mayoría de los agentes anticancerígenos convencionales no pueden diferenciar entre las células cancerosas y las normales, ocasionando por este motivo toxicidad sistémica y efectos adversos, limitando así la dosis máxima de fármaco. Además, la eliminación rápida y la distribución generalizada en órganos y tejidos específicos requieren de la administración de un fármaco en grandes cantidades, lo que incrementa el costo del tratamiento y produce una toxicidad indeseable.<sup>16</sup>

El empleo de nanodispositivos presenta numerosas ventajas con respecto a las terapias convencionales ya que mejoran la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco, tienen una circulación prolongada en el torrente sanguíneo evitando la eliminación anticipada por los macrófagos antes de alcanzar a las células tumorales, evadiendo así al sistema retículo endotelial (RES), que es el responsable de detectar y remover las partículas extrañas del cuerpo. Adicionalmente, favorecen la biodistribución, se acumulan en los tejidos enfermos debido al direccionamiento o *targeting* pasivo o activo, y pueden internalizarse de manera eficiente mediante endocitosis, etc.<sup>5,18,19</sup> Todas estas propiedades únicas son resultado del tamaño nanométrico de los sistemas. Las nanopartículas (NPs), a diferencia de las moléculas pequeñas, pueden integrar fácilmente a más de un agente de contraste o fármaco, convirtiéndose en nanoplataformas multifuncionales tanto para el diagnóstico como para el tratamiento. Debido a su gran relación área-volumen, se pueden incorporar físicamente de manera simple o por conjugación química, distintos agentes antineoplásicos o se puede llevar a cabo la modificación superficial del dispositivo con distintos grupos *targeting* u orientadores. A su vez, se puede obtener un gran control tanto del tamaño, como de la composición y comportamiento tanto químico como físico del sistema.<sup>20,21</sup>

Además de las ventajas ya mencionadas, los sistemas en la nanoescala presentan un comportamiento que se denomina **efecto de permeabilidad y retención mejorada** (EPR por sus siglas en inglés). Este efecto fue descubierto por Maeda y colaboradores en la década de los '80.<sup>22</sup> Ellos demostraron que las nanopartículas se acumulan selectivamente en los tejidos tumorales, resultando así en un *targeting* o direccionamiento pasivo.

Cuando las células tumorales alcanzan el tamaño de 150–200  $\mu\text{m}$ , comienzan a desarrollar su propio suministro de sangre y se vuelven dependientes de la neovasculatura, por su aporte nutricional y de oxígeno. Así los vasos tumorales recién formados son generalmente de forma y arquitectura anormales. Las células endoteliales defectuosas están mal alineadas, con amplia fenestración, con espacios entre 100 nm y 780 nm de tamaño o carentes de la capa de

músculo liso y deterioran los receptores funcionales de la angiotensina I y, por lo tanto, los nanodispositivos pueden acumularse selectivamente. Además, los tejidos tumorales por lo general carecen de drenaje linfático eficaz. Todos estos factores darán lugar a la dinámica molecular y de transporte de fluidos anormales (Figura 1.2).<sup>14,22–28</sup>



**Figura 1.2** Ilustración de diferentes vías por las que los nanosistemas pueden administrar fármacos a los tumores ya sea mediante el efecto EPR o mediante *targeting* activo. Adaptado de la referencia 29 con permiso de Nature Publishing Group.©2007

Aunque el *targeting* pasivo presenta una mejora en el transporte y liberación de fármacos al paciente y, en consecuencia, la toxicidad sistémica del fármaco en sí se reduce, también produce algunos inconvenientes. Una de las principales falencias es que, al ser un proceso poco controlado, los fármacos pueden no ser eficientemente conducidos hasta el tumor.<sup>30</sup> Esta deficiencia de control del proceso puede provocar la multiresistencia del tejido enfermo. Además hay algunos tumores donde el efecto EPR no sucede ya que la permeabilidad de los vasos sanguíneos malignos puede diferir de un tumor a otro.<sup>31</sup>

Frente a estas dificultades surge el concepto de **targeting activo**. El mismo propone la modificación del nanosistema con grupos funcionales específicos para una mayor selectividad de las células cancerosas, evitando así el daño de las células sanas.<sup>26</sup> Un nanodispositivo con *targeting* o direccionamiento activo debe ser capaz de escaparse de los vasos sanguíneos en las

lesiones patológicas, ser retenido y acumulado en el sitio dañado y tener una captación selectiva por las células a ser tratadas (Figura 1.2).<sup>32</sup>

La estrategia planteada para el *targeting* activo es la interacción específica entre los receptores de la célula a tratar y el ligando del nanodispositivo. Para que la interacción sea efectiva, los receptores elegidos deben ser sobreexpresados en las células cancerosas o tejidos tumorales mientras que en las células sanas no. Adicionalmente, los receptores deben estar expresados homogéneamente en todas las células diana.<sup>14,30,33</sup> Para ello los nanodispositivos son modificados con distintos ligandos como ácido fólico, anticuerpos, aptámeros, proteínas, carbohidratos, péptidos, etc.<sup>5,26,27</sup>

### 1.3 NANODISPOSITIVOS Y NANOTRANSPORTADORES

Como se ha mencionado, las moléculas de fármacos simplemente se difunden y distribuyen libremente en todo el cuerpo causando así efectos secundarios indeseables y limitando la dosis máxima para un tratamiento eficaz.<sup>19</sup> Para poder superar las limitaciones farmacocinéticas asociadas con las formulaciones convencionales de fármacos surge el concepto de emplear nanodispositivos y nanotransportadores. Los mismos, como se ha descrito, presentan propiedades únicas debido a sus dimensiones nanométricas, la gran relación área-volumen y propiedades físicas y químicas particulares. Tienen el potencial de modular tanto los perfiles farmacocinéticos como farmacodinámicos de los medicamentos mejorando su índice terapéutico. Consecuentemente, la incorporación de medicamentos en los nanodispositivos puede incrementar la estabilidad *in vivo*, extender el tiempo de circulación sanguínea de un compuesto y permitir la liberación controlada del fármaco en un sitio determinado.<sup>28,34</sup>

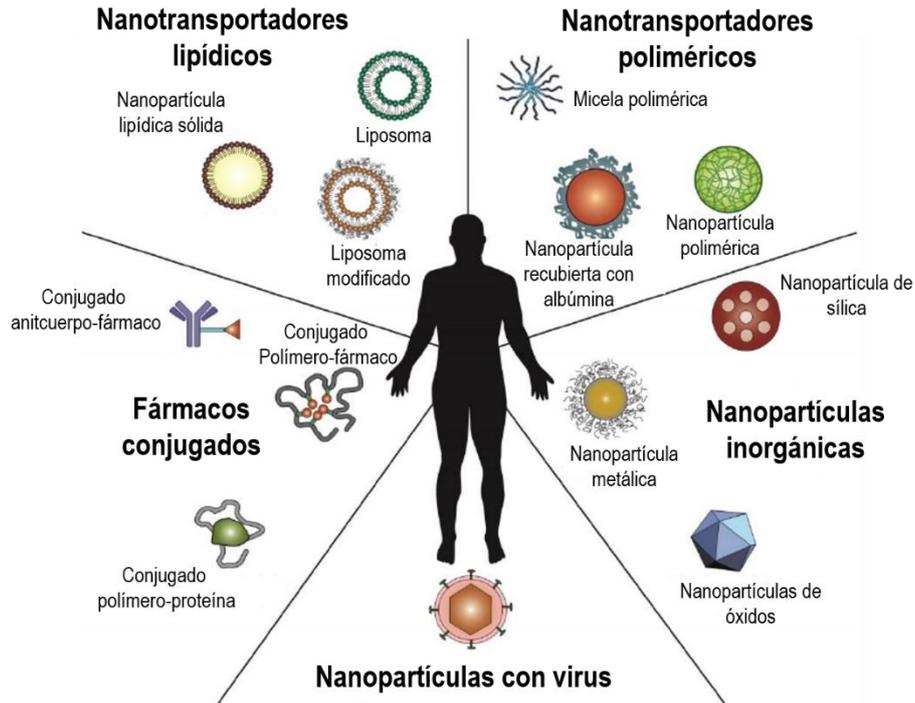
A la hora de diseñar un nanodispositivo, se deben tener en cuenta algunas consideraciones dentro de las cuales se pueden nombrar: a) proteger el fármaco de la degradación prematura, b) evitar que los fármacos interactúen tempranamente con el entorno biológico, c) mejorar la absorción de los mismos en un tejido seleccionado, d) controlar el perfil farmacocinético y de distribución en los tejidos de los fármacos, e) mejorar la internalización intracelular, f) estar compuestos de un material que sea biocompatible, g) fácilmente funcionalizable, h) exhibir una alta eficacia de absorción diferencial en las células a ser tratadas sobre las células normales (o tejido), i) ser soluble o dispersable en condiciones acuosas para aumentar la efectividad, j) tener una circulación prolongada, una baja tasa de agregación y una extensa vida útil, k) ser capaz de administrar múltiples tipos de agentes terapéuticos con propiedades fisicoquímicas potencialmente diferentes.<sup>5,16,18,28,29,35</sup>

Para el diseño de estos nanodispositivos es necesario tener en cuenta diversos factores tales como tamaño y forma, composición, funcionalidad superficial y vectorización del nanosistema esquematizado en la Figura 1.3. Todas las propiedades pueden ser reguladas mediante el control de la estrategia de síntesis empleada.



**Figura 1.3** Esquema de los factores importantes para el diseño de un nanodispositivo. Adaptado de la referencia 35 con permiso de Elsevier.©2014.

En la actualidad ya han sido reportados distintos tipos de nanodispositivos para el tratamiento del cáncer; ya sea como sistemas de liberación controlada de fármacos como transportadores de agentes de contraste, sondas fluorescentes, etc. Los mismos se encuentran esquematizados en la Figura 1.4. Dentro de ellos se encuentran las micelas, los nanogeles, las nanopartículas metálicas y de óxidos de metales, las vesículas anfifílicas, los dendrímeros, los conjugados fármaco-polímero, los liposomas, etc.<sup>34,36-38</sup>



**Figura 1.4** Esquema de algunos nanodispositivos desarrollados en la actualidad. Adaptado de la referencia 34 con permiso de Elsevier. ©2014.

Actualmente, existen algunos nanodispositivos que han sido aprobados para su uso en nanomedicina. Un resumen de los mismos se muestra en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Nanomedicamentos clínicamente aprobados para aplicaciones terapéuticas contra el cáncer.  
Adaptado de la referencia 38 con permiso de Elsevier. ©2016.

Tipo de nanomaterial	Nombre comercial del producto	Descripción	Cáncer al que se dirige	Detalles del permiso
Liposomas	<b>Doxil</b> Centocor Ortho Biotech, J&J	Doxorrubicina clorohidrato encapsulada en liposomas	Cáncer de ovario recurrente, sarcoma de Kaposi asociado al SIDA avanzado, mieloma múltiple	Aprobado por FDA (Administración de federal alimentos y medicamentos) en 1995 y también de EMA (Agencia Europea de Medicina) para el cáncer de mama metastásico (Caelix)
	<b>DaunoXome</b> Galen, Ltd.	Solución acuosa de daunorubicina encapsulada en vesículas lipídicas	Kaposi asociado al VIH avanzado	Aprobado por FDA 1996
	<b>MYOCET</b> Sopherion Therapeutics, LLC y Cephalon, Inc.	Doxorrubicina citrato encapsulada en liposomas correspondiente a 50 mg de doxorrubicina hidrocloreto	Cáncer de mama metastásico	Aprobado en Europa y Canadá. Bajo investigación en combinación con otros fármacos para el cáncer de mama por la FDA.
	<b>Mepact</b> Takeda Pharmaceutical Company Limited	Derivado sintético de muramil dipéptido en una formulación liposomal	Osteosarcoma resectable no metastásico	Aprobado en Europa. Fase clínica 3 en USA.
	<b>DepoCyt</b> Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.	Suspensión inyectable del antimetabolito citarabina encapsulado en nanopartículas lipídicas multivesiculares	Meningitis linfomatosa	La FDA otorgó aprobación acelerada en 1999 y una aprobación completa en 2007
	<b>MARQIBO</b> Talon Therapeutics Inc.	Alcaloides de la vinca antimitóticos encapsulados en el núcleo acuoso de liposomas basados en esfingomielina	Leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Philadelphia negativo	Aprobado por FDA en 2012
Nanopartículas basadas en albúmina	<b>ABRAXANE</b> Abraxis Bioscience/Celgene Europe	Paclitaxel unido a albúmina (tamaño alrededor 130 nm)	Cáncer de mama metastásico, sólido avanzado de no células pequeñas, de pulmón, neoplastias de páncreas y mama	Aprobado por FDA en 2005. Aprobado por EMA en 2008. Plan de investigación pediátrica
Micelas	<b>Genexol-PM</b> Samyang Biopharma	Formulación de paclitaxel encapsulada en nanopartículas micelares copoliméricas	Cáncer de mama metastásico, cáncer de páncreas	Aprobado en Corea del Sur para cáncer de mama, en EEUU en fase 2 para cáncer de mama metastásico en

				combinación con doxorubicina
Nanopartículas poliméricas	<b>ONCASPAR</b> Sigma Tau Pharmaceuticals Inc.	L-asparaginasa conjugada covalentemente a monometoxipolietilenglicol	Leucemia linfoblástica aguda	Aprobado por FDA en 1994 para un uso limitado y expandido a primera línea en 2006
	<b>ZINOSTATIN STIMALAMER</b> Ningun nombre prioritario	Conjugado de la proteína antitumoral NeoCarzinoStatin (NCS) con un copolímero estireno-ácido maleico (SMA) o una proteína	Carcinoma hepatocelular primario irresecable	Aprobado en Japón en 1994.
	<b>NEULASTA</b> Amgen	G-CSF recombinante (filgrastim) conjugado covalentemente a monometoxipolietilenglicol	Reduce el riesgo de infección en pacientes con neoplasias malignas no mieloides que reciben terapia anticancerígena mielo-supresiva asociada con neutropenia febril	Aprobado por FDA y EMA en 2002
Nanopartículas inorgánicas	<b>NanoTherm</b> MagForce Nanotech AG	Conjugados de nanopartículas de fármacos inyectados en el sitio del tumor y calentados selectivamente por un campo magnético, dando como resultado una liberación del fármaco dependiente de la temperatura	Ablación local en glioblastomas multiformes, cánceres de próstata y páncreas	Aprobación del marketing en Europa para glioblastoma, Actualmente se realizan estudios post-marketing

## 1.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En los últimos años, entre todos los nanodispositivos estudiados, las **nanopartículas magnéticas** (MNPs) han recibido una gran atención debido a las características especiales que presentan, entre otras, una gran área superficial sumada a sus propiedades magnéticas únicas.<sup>39-</sup>

42

Existen distintos tipos de MNPs, algunas de ellas, las más ampliamente difundidas, tanto en su uso como en la síntesis y aplicación, son las de óxidos de hierro como la Magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y la Magemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) conocidas como SPION por sus siglas en inglés, *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Las mismas han sido utilizadas en distintos campos de aplicación como para la remoción de metales pesados,<sup>43</sup> dispositivo de memoria de forma,<sup>44</sup> en la construcción de sensores de gas,<sup>45</sup> o en nanocatálisis.<sup>46</sup>

En particular, en el área de la nanomedicina, las MNPs presentan una amplia gama de aplicaciones biomédicas: ya sea en la fase de diagnóstico (como agente de contraste para Resonancia Magnética), como así también en la fase de tratamiento (tratamiento por hipertermia, para detección y separación de células, o para terapia guiada y liberación controlada de fármacos).<sup>47-49</sup> Recientemente han sido probadas en quimioterapia.<sup>50-54</sup> Su empleo se debe a que las MNPs de óxido de hierro presentan propiedades y comportamientos magnéticos únicos y por lo tanto, pueden ser utilizadas para las aplicaciones anteriormente nombradas.<sup>8,51,55-57</sup> Asimismo, estas MNPs presentan varias ventajas como su biocompatibilidad; las mismas han sido aprobadas por la FDA para el uso en humanos como agentes de contraste para IRM (imágenes por resonancia magnética). A su vez, pueden ser fácilmente modificadas con distintos compuestos tales como anticuerpos, péptidos, o polímeros para aumentar la circulación en el torrente sanguíneo y establecer un tratamiento específico provisto por el grupo *targeting*.<sup>21,58</sup>

#### 1.4.1 Nanopartículas magnéticas para hipertermia

La **hipertermia** es un tratamiento contra el cáncer mediante el cual se expone el tejido enfermo del cuerpo a altas temperaturas (de hasta 45°C). Los mecanismos involucrados implican estrés térmico intracelular en el rango de temperatura de 41° C - 46° C, dando como resultado la activación y/o la iniciación de muchos mecanismos de degradación intracelular y extracelular. Dentro de estos mecanismos se encuentra el plegamiento incorrecto de proteínas junto con su agregación, la alteración de las señales de transducción, la inducción a la apoptosis, los cambios en el pH, la reducción del oxígeno en el tumor.<sup>59,60</sup> Esta técnica presenta diversas ventajas como, ser un método no invasivo y específico para el tejido tumoral al que es capaz de localizar con precisión, además de que el calentamiento puede penetrar más fácilmente en los tejidos profundos.<sup>41,61</sup>

Así, las MNPs de óxido de hierro al ser superparamagnéticas pueden inyectarse en el cuerpo y ser guiadas al tejido afectado para luego someterlo a un campo magnético alternante (CMA) y producir un incremento en la temperatura del tejido.<sup>62</sup> En la actualidad ya existen algunos agentes para el tratamiento por hipertermia basados en MNP de óxido de hierro, recubiertas con dextran (Ferumoxsil, Lumirem, Ferumoxide, Feridex, Resovist) o con un co-polímero de estireno y divinilbeceno (Ferristene, Abdocan).<sup>62,63</sup>

### 1.4.2 Nanopartículas magnéticas como agente de contraste en Imágenes de Resonancia Magnética (IRM)

El **diagnóstico por imágenes de resonancia magnética** es una técnica que permite diferenciar entre el tejido normal y el tejido enfermo. La misma presenta varias ventajas como la alta penetración del campo magnético en los tejidos sin verse atenuada la imagen, la capacidad de adquisición de imágenes tomográficas en tiempo real en 3D, no usa radiación ionizante, brinda una buena diferenciación anatómica del contraste y no es invasiva.<sup>55,64,65</sup>

La resonancia magnética se basa en los mismos principios que la resonancia magnética nuclear (RMN). Para obtener una señal de resonancia magnética, un paciente o una muestra se coloca en un campo magnético fuerte ( $B_0$ ). Entonces, los espines nucleares del hidrógeno de las moléculas del agua están orientados en la misma dirección al campo magnético (estado de energía más baja) o en oposición al campo magnético (estado de energía más alta). Cuando se irradia con una radiofrecuencia resonante, el núcleo absorbe la energía y aumenta el número de espines con un estado de mayor energía. Entonces, los núcleos vuelven al estado de equilibrio, proceso que se conoce como relajación. Durante el proceso de relajación, los núcleos excitados emiten una radiofrecuencia débil que puede detectarse. Existen dos tipos de procesos de relajación: la relajación longitudinal (también llamada relajación de espín-red) y la relajación transversal (relajación espín-espín).<sup>55,66</sup>

A medida que los hidrógenos excitados se relajan, su magnetización longitudinal se recupera lentamente, lo que se conoce como relajación longitudinal. El tiempo de relajación  $T_1$  representa el tiempo requerido para que la magnetización longitudinal se recupere desde el valor cero al estado original en un valor del 63%. Al mismo tiempo, la magnetización transversal de los protones decae a medida que se desfasan los espines nucleares, lo que se denomina relajación transversal. El tiempo de relajación  $T_2$  representa el tiempo para que la magnetización transversal disminuye desde el máximo hasta un valor del 37% de su estado excitado. Las relajaciones  $R_1 (= 1 / T_1)$  y  $R_2 (= 1 / T_2)$  se refieren a la tasa de recuperación de la magnetización longitudinal y a la tasa de decaimiento de la magnetización transversal, respectivamente. La inhomogeneidad del campo magnético y la diferencia de susceptibilidad inducen el decaimiento de los espines nucleares. Por lo tanto, la magnetización transversal decae mucho más rápidamente que la tasa de relajación  $R_2$  característica. Esta tasa de relajación se denomina  $R_2^* (= 1 / T_2^*)$ , que es mayor que el valor  $R_2$ .<sup>67</sup>

Debido a que la RM se basa en características inherentes del tejido, no siempre genera suficiente contraste en un entorno clínico. Para contrarrestar este hecho se administran agentes

de contraste que alteran las características magnéticas de los protones de agua cercanos. El agente de contraste no genera una señal en sí, pero afecta la tasa de relajación del protón. Los agentes de contraste pueden clasificarse como agentes de contraste  $T_1$  y  $T_2$ . Los agentes de contraste  $T_1$  (agentes positivos) aumentan la velocidad de recuperación longitudinal, produciendo señales luminosas en las regiones suministradas. Por otra parte, los agentes de contraste  $T_2$  (agentes negativos) aumentan la velocidad de decaimiento de la magnetización transversal, dando como resultado señales oscuras.<sup>67</sup>

A pesar de que las nanopartículas de óxido de hierro afectan tanto a los procesos de relajación longitudinal como transversal, su influencia en la relajación  $T_2$  es considerablemente mayor que en la relajación  $T_1$  y se las utiliza generalmente como agente de contraste negativo.<sup>8,68,69</sup> En los últimos años se han desarrollado diversos agentes de contraste basados en MNP de óxido de hierro, algunos ya mencionados para el tratamiento por hipertermia como Ferumoxsil, Ferumoxide, Feridex, Resovist como MNP ultrapequeñas estabilizadas con citrato (Feruglose) o con almidón modificado con PEG (VSOP-C184).<sup>70</sup>

## 1.5 TERAGNOSIS

El término **teragnosis** hace referencia al diagnóstico, tratamiento y seguimiento de una enfermedad al mismo tiempo.<sup>42,71-73</sup> Los objetivos principales de este campo de estudio son el monitoreo de la respuesta al tratamiento, aumento la eficacia y seguridad del fármaco y eliminación de los tratamientos innecesarios.<sup>74</sup> Además, la misma comprende modalidades de diagnóstico no invasivas como son la resonancia magnética, la tomografía computada y por emisión de positrones.<sup>71,75</sup>

Los agentes teragnósticos utilizados pueden regular la liberación del fármaco en condiciones determinadas, aumentar selectivamente su liberación en determinadas partes del cuerpo, permitir el transporte de fármacos hidrofóbicos.<sup>75,76</sup> Estos dispositivos tienen la capacidad de tener más de una función como visualizar la biodistribución de los mismos, cuantificar la cantidad de fármaco liberada, analizar la eficacia terapéutica.<sup>34</sup>

## 1.6 REFERENCIAS

1. Jones R. Fundamentals of Nanoscience (and Nanotechnology). In: *Nanoscience in Dermatology*. ; 2016:15-29.
2. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*. 2005;105(4):1103-1169. doi:10.1021/cr0300789.
3. Steed JW, Turner DR, Wallace KJ. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. 2nd editio. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 2007.; 2007.
4. Yan L, Yang Y, Zhang W, Chen X. Advanced Materials and Nanotechnology for Drug Delivery. *Adv Mater*. 2014;26(31):5533-5540. doi:10.1002/adma.201305683.
5. Gao Y, Xie J, Chen H, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnol Adv*. 2014;32(4):761-777. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.013.
6. Bashir S, Liu JL. *Nanomaterials and Their Application*. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-801528-5.00001-4.
7. Krol S, Macrez R, Docagne F, et al. Therapeutic Benefits from Nanoparticles : The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier. *Chem Rev*. 2013;113:1877-1903. doi:10.1021/cr200472g.
8. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem Rev*. 2016;116(5):2826-2885. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00148.
9. Schütz CA, Juillerat-jeanneret L, Mueller H, Lynch I, Riediker M. Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation ; on behalf of the NanoImpactNet Consortium. *Nanomedicine*. 2013;8(3):449-467. doi:10.2217/NNM.13.8.
10. Simões FR, Takeda HH. *1 - Basic Concepts and Principles*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-323-49782-4/00001-2.
11. Choi G, Piao H, Kim MH, Choy J-H. Enabling Nanohybrid Drug Discovery through the Soft Chemistry Telescope. *Ind Eng Chem Res*. 2016;55(43):11211-11224. doi:10.1021/acs.iecr.6b02971.
12. Hans-Eckhardt Schaefer. *Nanoscience. The Science of the Small in Physics, Engineering, Chemistry, Biology and Medicine*. Springer; 2010. doi:10.1007/978-3-642-10559-3.
13. E.E.S. Foundation. Nanomedicine, an ESF–European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report. In: *ESF*. ; 2004.
14. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ Quim*. 2016;27(4):286-291. doi:10.1016/j.eq.2016.07.002.
15. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2016;17(1):20-37. doi:10.1038/nrc.2016.108.

16. Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, Sousa Lobo JM. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;126(2015):631-648. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.041.
17. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93(March):52-79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
18. Polo E, Collado M, Pelaz B, del Pino P. Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles *in Vivo*: Understanding Interactions between Nanoparticles and Cells. *ACS Nano*. 2017;acs.nano.7b01197. doi:10.1021/acs.nano.7b01197.
19. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2015;33(9):941-951. doi:10.1038/nbt.3330.
20. He Q, Guo S, Qian Z, Chen X. Development of individualized anti-metastasis strategies by engineering nanomedicines. *Chem Soc Rev*. 2015;44:6258-6286. doi:10.1039/c4cs00511b.
21. Lee D, Koo H, Sun I, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2656-2672. doi:10.1039/C2CS15261D.
22. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. *Cancer Res*. 1986;46(December):6387-6392. doi:10.1021/bc100070g.
23. Montoro SR, Medeiros S de F, Alves GM. *Nanostructured Hydrogels*. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-1-4557-3159-6.00010-9.
24. Greish K. Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: Are we there yet? *Drug Discov Today Technol*. 2012;9(2):e161-e166. doi:10.1016/j.ddtec.2011.11.010.
25. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today*. 2006;11(17-18):812-818. doi:10.1016/j.drudis.2006.07.005.
26. Dai W, Wang X, Song G, et al. Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017. doi:10.1016/j.addr.2017.03.001.
27. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:2-25. doi:10.1016/j.addr.2013.11.009.
28. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k.
29. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387.
30. Arranja AG, Pathak V, Lammers T, Shi Y. Tumor-targeted nanomedicines for cancer

- theranostics. *Pharmacol Res.* 2017;115:87-95. doi:10.1016/j.phrs.2016.11.014.
31. Sriraman SK, Aryasomayajula B, Torchilin VP. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue barriers.* 2014;2(December):e29528. doi:10.4161/tisb.29528.
  32. Yhee JY, Lee S, Kim K. Advances in targeting strategies for nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Nanoscale.* 2014;6(22):13383-13390. doi:10.1039/c4nr04334k.
  33. Ku SH, Kim K, Choi K, Kim SH, Kwon IC. Tumor-targeting multifunctional nanoparticles for siRNA delivery: Recent advances in cancer therapy. *Adv Healthc Mater.* 2014;3(8):1182-1193. doi:10.1002/adhm.201300607.
  34. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release.* 2015;200:138-157. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.030.
  35. Patra HK, Turner APF. The potential legacy of cancer nanotechnology: Cellular selection. *Trends Biotechnol.* 2014;32(1):21-31. doi:10.1016/j.tibtech.2013.10.004.
  36. Sivaram AJ, Rajitha P, Maya S, Jayakumar R, Sabitha M. Nanogels for delivery, imaging and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2015. doi:10.1002/wnan.1328.
  37. Marangoni VS, Zucolotto V. 3.1 Nanomedicine. 2017:71-92. doi:10.1016/B978-0-323-49780-0/00003-X.
  38. Bregoli L, Movia D, Gavigan-Imedio JD, Lysaght J, Reynolds J, Prina-Mello A. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12(1):81-103. doi:10.1016/j.nano.2015.08.006.
  39. Obaidat I, Issa B, Haik Y. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials.* 2015;5(1):63-89. doi:10.3390/nano5010063.
  40. Tietze R, Zaloga J, Unterweger H, et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):463-470. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.022.
  41. Dürr S, Janko C, Lyer S, et al. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Nanotechnol Rev.* 2013;2(4):395-409. doi:10.1515/ntrev-2013-0011.
  42. Wáng, Yi-Xiáng J; Idée, Jean-Marc; Corot C. Scientific and industrial challenges of developing nanoparticle-based theranostics and multiple-modality contrast agents for clinical application. *Nanoscale.* 2016;7(39):16146-16150. doi:10.1039/x0xx00000.
  43. White BR, Stackhouse BT, Holcombe J a. Magnetic gamma-Fe(2)O(3) nanoparticles coated with poly-L-cysteine for chelation of As(III), Cu(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) and Zn(II). *J Hazard Mater.* 2009;161(2-3):848-853. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.04.105.
  44. Zheng X, Zhou S, Xiao Y, Yu X, Li X, Wu P. Shape memory effect of poly(D,L-lactide)/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites by inductive heating of magnetite particles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;71(1):67-72. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.01.009.
  45. Belle CJ, Bonamin A, Simon U, et al. Size dependent gas sensing properties of spinel iron

- oxide nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* 2011;160(1):942-950. doi:10.1016/j.snb.2011.09.008.
46. Polshettiwar V, Luque R, Fihri A, Zhu H, Bouhrara M, Basset JM. Magnetically recoverable nanocatalysts. *Chem Rev.* 2011;111(5):3036-3075. doi:10.1021/cr100230z.
47. Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008;108(6):2064-2110. doi:10.1021/cr068445e.
48. Jo J, Aoki I, Tabata Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *J Control Release.* 2010;142(3):465-473. doi:10.1016/j.jconrel.2009.11.014.
49. Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol Res.* 2010;62(2):144-149. doi:10.1016/j.phrs.2010.01.014.
50. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(1-2):24-46. doi:10.1016/j.addr.2010.05.006.
51. Huang X, Zhang F, Wang Y, et al. Design considerations of iron-based nanoclusters for noninvasive tracking of mesenchymal stem cell homing. *ACS Nano.* 2014;8(5):4403-4414. doi:10.1021/nn4062726.
52. Wang H, Cao G, Gai Z, Hong K, Banerjee P, Zhou S. Magnetic/NIR-responsive drug carrier, multicolor cell imaging, and enhanced photothermal therapy of gold capped magnetite-fluorescent carbon hybrid nanoparticles. *Nanoscale.* 2015;7(17):7885-7895. doi:10.1039/C4NR07335E.
53. Chanana M, Jahn S, Georgieva R, Lutz JF, Bäuml H, Wang D. Fabrication of colloidal stable, thermosensitive, and biocompatible magnetite nanoparticles and study of their reversible agglomeration in aqueous milieu. *Chem Mater.* 2009;21(9):1906-1914. doi:10.1021/cm900126r.
54. Xing R, Liu G, Zhu J, Hou Y, Chen X. Functional Magnetic Nanoparticles for Non-Viral Gene Delivery and MR Imaging. *Pharm Res.* 2014;31(6):1377-1389. doi:10.1007/s11095-013-1205-2.
55. Peng E, Wang F, Xue JM. Nanostructured magnetic nanocomposites as MRI contrast agents. *J Mater Chem B.* 2015;3(11):2241-2276. doi:10.1039/C4TB02023E.
56. Cholkar K, Hirani ND, Natarajan C. *Nanotechnology-Based Medical and Biomedical Imaging for Diagnostics.* Elsevier; 2017. doi:10.1016/B978-0-323-42978-8.00014-0.
57. Baek SM, Singh R, Khanal D, et al. Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles. *Nanoscale.* 2015:14191-14216.
58. Yoon HY, Jeon S, You DG, et al. Inorganic nanoparticles for image-guided therapy. *Bioconjug Chem.* 2016;28:124-134. doi:10.1021/acs.bioconjugchem.6b00512.
59. Deatsch AE, Evans B a. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *J Magn Mater.* 2014;354:163-172. doi:10.1016/j.jmmm.2013.11.006.

60. Verma J, Lal S, Van Noorden CJF. Nanoparticles for hyperthermic therapy: Synthesis strategies and applications in glioblastoma. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2863-2877. doi:10.2147/IJN.S57501.
61. Torres-Lugo M, Rinaldi C. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(10):1689-1707. doi:10.2217/nnm.13.146.
62. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev*. 2012;112(11):5818-5878. doi:10.1021/cr300068p.
63. Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol*. 2003;13(6):1266-1276. doi:10.1007/s00330-002-1721-7.
64. Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: Combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem*. 2011;22(10):1879-1903. doi:10.1021/bc200151q.
65. Veisoh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(3):284-304. doi:10.1016/j.addr.2009.11.002.
66. Brazel CS. Magneto-thermally-responsive nanomaterials: Combining magnetic nanostructures and thermally-sensitive polymers for triggered drug release. *Pharm Res*. 2009;26(3):644-656. doi:10.1007/s11095-008-9773-2.
67. Lee N, Yoo D, Ling D, Cho MH, Hyeon T, Cheon J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem Rev*. 2015;115(19):10637-10689. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00112.
68. Thorek DLJ, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng*. 2006;34(1):23-38. doi:10.1007/s10439-005-9002-7.
69. Dave SR, Gao X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1:583-609. doi:10.1002/wnan.051.
70. Hilger I, Kaiser W a. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine*. 2012;7(9):1443-1459. doi:10.2217/nnm.12.112.
71. Ryu JH, Koo H, Sun I-C, et al. Tumor-targeting multi-functional nanoparticles for theragnosis: new paradigm for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(13):1447-1458. doi:10.1016/j.addr.2012.06.012.
72. Choi KY, Liu G, Lee S, Chen X. Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale*. 2012;4(2):330-342. doi:10.1039/c1nr11277e.
73. Sierra-Martin B, Fernandez-Barbero A. Multifunctional hybrid nanogels for theranostic applications. *Soft Matter*. 2015;11(42):8205-8216. doi:10.1039/C5SM01789K.
74. Lim EK, Kim T, Paik S, Haam S, Huh YM, Lee K. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. *Chem Rev*. 2015;115(1):327-394. doi:10.1021/cr300213b.

75. Sailor MJ, Park J-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv Mater.* 2012;24(28):3779-3802. doi:10.1002/adma.201200653.
76. Merino S, Martín C, Kostarelos K, Prato M, Vázquez E. Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano.* 2015;9(5):4686-4697. doi:10.1021/acsnano.5b01433.

# **C**apítulo 2

## **NANOGELES Y NANOPARTÍCULAS *CORE-BRUSH***

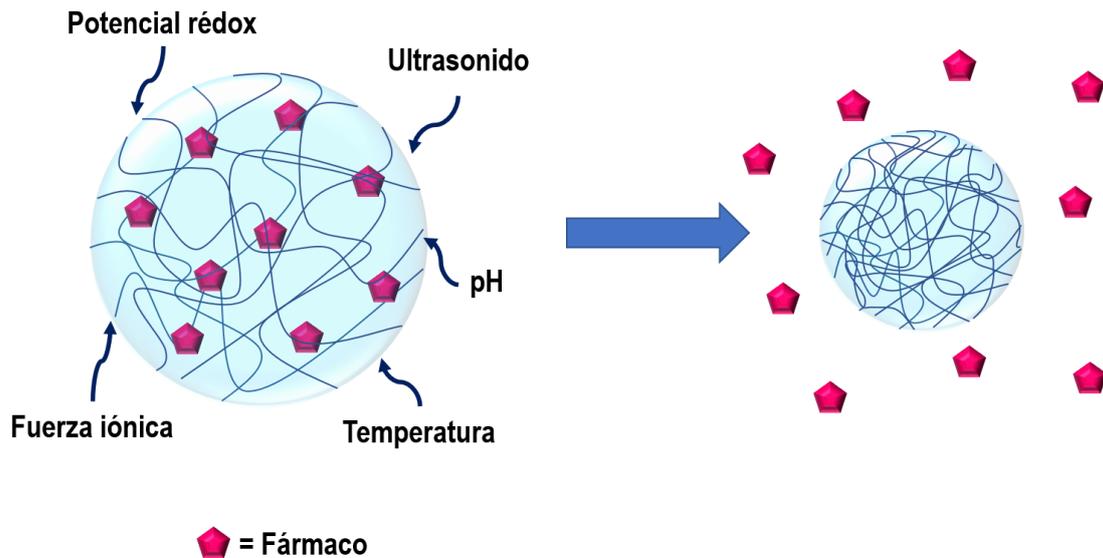


## 2.1 NANOGELES

En las últimas décadas, los **nanogeles** han sido ampliamente investigados como nanodispositivos en el área de la medicina debido a sus propiedades únicas. Un nanogel es una matriz polimérica tridimensional entrecruzada que presenta tamaños nanométricos en sus tres dimensiones y que combina simultáneamente las características de los hidrogeles y de las nanopartículas. Los mismos están formado por una cadena con distintas unidades repetitivas (monómeros) las cuales se encuentran entrecruzadas mediante un agente entrecruzante.<sup>1-5</sup> Estos sistemas presentan diversas ventajas como una biocompatibilidad superior, una buena permeabilidad al oxígeno, una baja adsorción de proteínas y adhesión celular, una capacidad de modificar la superficie con biomoléculas específicas y propiedades físicas similares a tejidos biológicos.<sup>6-9</sup>

Por otra parte, la estructura porosa del nanogel permite la incorporación de un fármaco u otras moléculas bioactivas, actuando como protección de los mismos de las posibles degradaciones que ocurren antes de llegar al tejido objetivo. A su vez, los fármacos o moléculas bioactivas pueden ser liberados regulando el tiempo y la dosis necesaria<sup>10,11</sup> Asimismo, estos sistemas específicamente diseñados pueden presentar una naturaleza sensible a los estímulos, una facilidad de incorporación del fármaco, una estabilidad física, y una versatilidad en el diseño modificando su síntesis.<sup>2</sup>

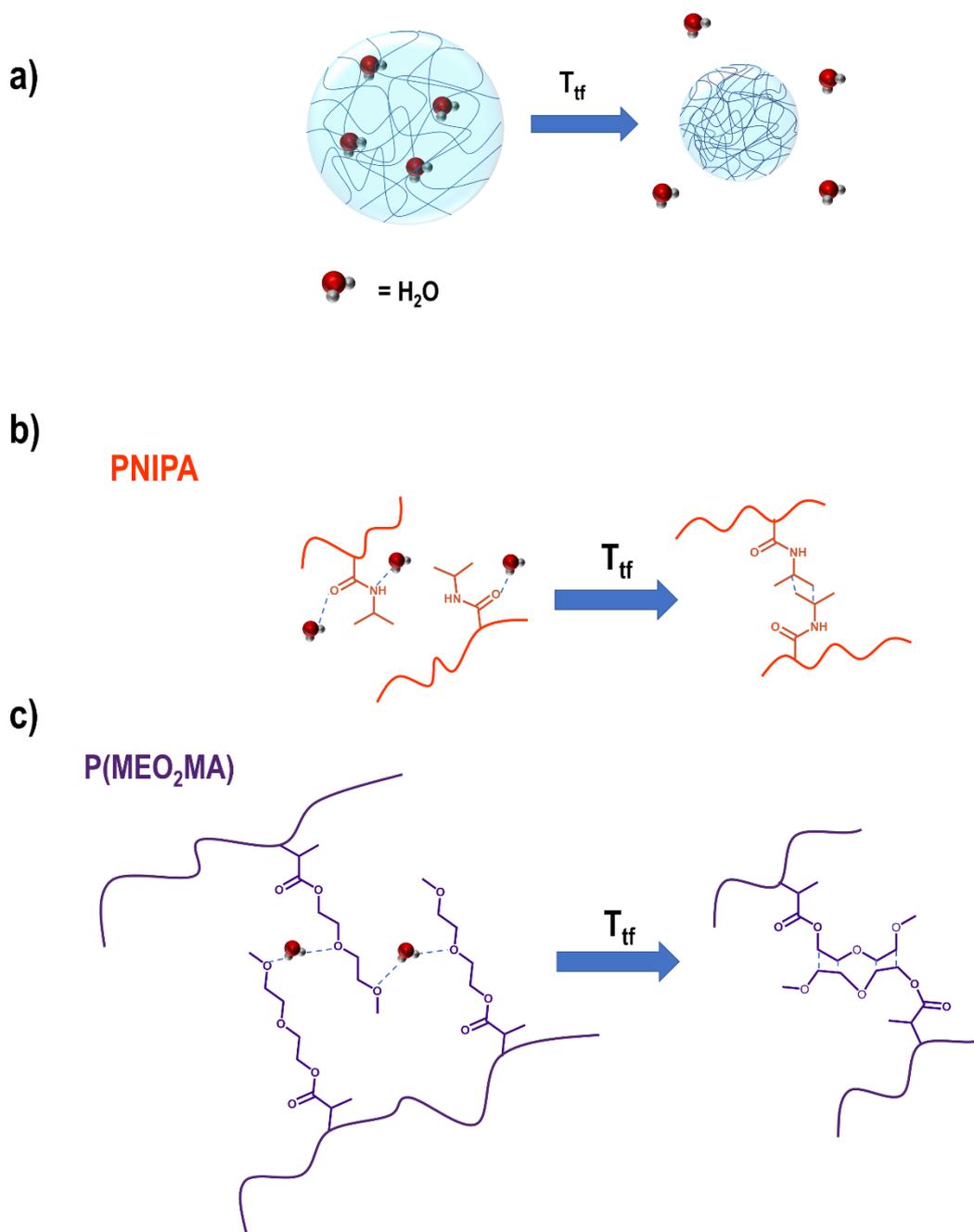
En particular, aquellos nanogeles que sufren un cambio conformacional debido a la presencia de un estímulo externo se denominan **nanogeles con respuesta estímulo o inteligentes**.<sup>1,7,12-14</sup> Existen distintos estímulos como la temperatura, el pH, ultrasonido, etc. con distintos fines determinados de aplicación.<sup>15-17</sup> Este comportamiento puede ser utilizado para el tratamiento selectivo de los tejidos enfermos ya que características como el pH, el potencial redox y la temperatura de los tumores difieren de los tejidos sanos siendo la temperatura ligeramente mayor en las células cancerosas. Por lo tanto, esta diferencia podría emplearse para la liberación de un fármaco en la zona de interés.<sup>5</sup> En la Figura 2.1 se esquematiza la respuesta a distintos estímulos de un nanogel.



**Figura 2.1** Esquema de liberación de un fármaco del nanogel por la acción de un estímulo externo.

Aquellos nanogeles que sufren un cambio conformacional en respuesta a la temperatura se denominan **nanogeles termosensibles**. Los mismos tienen una temperatura de transición de fase ( $T_{tf}$ ) que provoca una disminución del tamaño de la nanopartícula.<sup>7,13,18</sup> Por debajo de esta temperatura, las interacciones hidrofílicas del tipo puente hidrógeno entre los grupos pendientes de la cadena polimérica y el agua predominan mientras que por encima de la  $T_{tf}$  cobran importancia las interacciones hidrofóbicas produciendo que el nanogel colapse. Este comportamiento se ve reflejado en la Figura 2.2 a). Estos sistemas resultan de gran interés debido a que la naturaleza hipertérmica de la mayoría de los sitios patológicos inflamados y de los tumores actuaría como un estímulo intrínseco.<sup>8,19</sup> Si la temperatura de transición de fase de los nanogeles es alrededor de 39-40°C, éstos podrían circular por los vasos sanguíneos, cuya temperatura es 37 °C, sin alterarse y luego precipitar en el tejido tumoral donde la temperatura ronda los 42 °C, liberando el fármaco de su interior.<sup>20</sup>

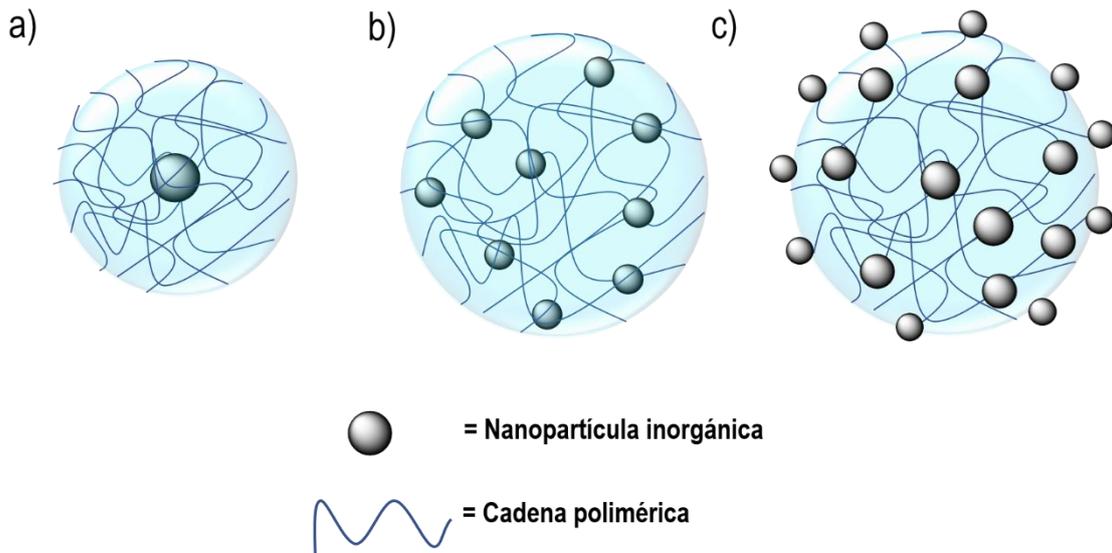
Existen distintos tipos de nanogeles termosensibles, entre los que el poli-N-isopropilamida (PNIPA) y sus derivados han sido los más estudiados para su empleo en nanomedicina,<sup>21-23</sup> con una  $T_{tf}$  de 32 °C (Figura 2.2 b). Adicionalmente, los nanogeles de polímeros derivados del oligoetilenglicol (OEG), como el P(MEO<sub>2</sub>MA), han sido ampliamente investigados ya que presentan muchas características prometedoras incluyendo una  $T_{tf}$  regulable, excelente biocompatibilidad y reversibilidad (Figura 2.2 c).<sup>18,24,25</sup> Por otra parte, los nanogeles de poli (N-vinilcaprolactama) (PVCL) también han sido foco de atención en su uso como nanogeles termosensibles porque es un polímero termosensible y biocompatible que posee una temperatura de transición próxima a la temperatura fisiológica (32 °C-38 °C)



**Figura 2.2** Representación esquemática de a) comportamiento termosensible de un nanogel; interacciones químicas por debajo y por encima de la  $T_{tf}$  de b) PNIPAM y c) P(MEO<sub>2</sub>MA).

### 2.1.1 Nanogeles híbridos

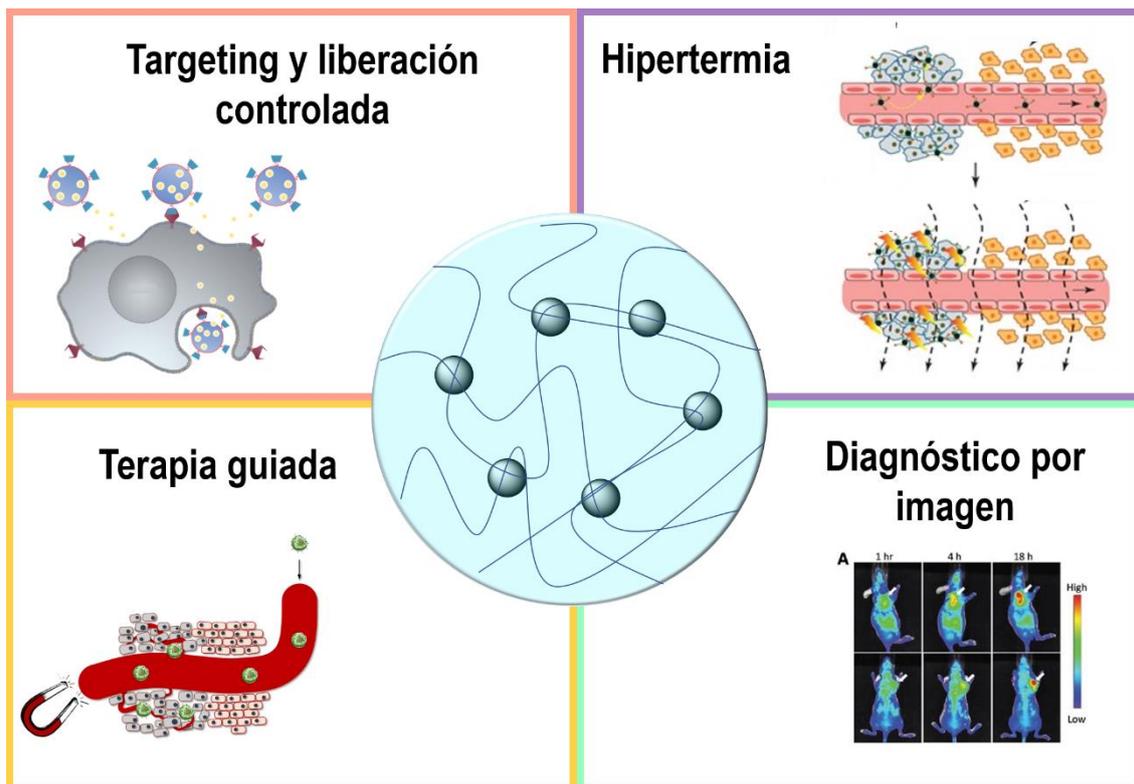
El concepto de **nanogeles híbridos** hace referencia a aquellos en los que se incorporan partículas inorgánicas en la matriz polimérica.<sup>14,17,26</sup> Montoro y colaboradores<sup>6</sup> clasificaron a los NGs híbridos en tres categorías según su morfología: (a) nanogeles *core-shell* con las nanopartículas inorgánicas en el centro, rodeadas de una matriz polimérica; (b) nanopartículas inorgánicas distribuidas en la matriz del nanogel y (c) nanogeles cubiertos con nanopartículas inorgánicas. En la Figura 2.3 se esquematizan las tres categorías de nanogeles híbridos.



**Figura 2.3** Representación gráfica de a) hidrogel *core-shell* con las nanopartículas inorgánicas en el centro, rodeada de una matriz polimérica; b) nanopartículas inorgánicas distribuidas en la matriz del nanogel y c) nanogeles cubiertos con nanopartículas inorgánicas

En la síntesis de NGs híbridos se han utilizado diferentes nanopartículas (NPs), como nanopartículas magnéticas (MNPs), nanopartículas de oro (AuNPs), nanopartículas de sílica, puntos cuánticos o *quantum dots* (QDs), nanopartículas de plata (AgNPs), etc. Dependiendo de la naturaleza de la nanopartícula inorgánica, se pueden conseguir diferentes funcionalidades permitiendo su utilización como agente de contraste, en terapia guiada o para tratamiento fototérmico o hipertermia.<sup>27</sup>

Estos nanodispositivos han ganado considerable atención en los últimos años debido a su singular potencial aplicación al combinar de forma sinérgica tanto las características del nanogel como las propias de la nanopartícula inorgánica, presentando distintas ventajas frente a los fármacos y agentes convencionales en el área de detección óptica, diagnóstico por imagen y administración de fármacos (Figura 2.4).<sup>28-30</sup>



**Figura 2.4** Representación de un nanogel híbrido con grupos targeting y las distintas áreas de aplicación de los mismos.

La incorporación de NPs en una matriz le proporciona una ventaja adicional al sistema: la naturaleza de la nanopartícula incorporada regula el tipo de estímulo que se puede utilizar para liberar el fármaco en las condiciones deseadas, potenciando el suministro en diferentes partes del cuerpo, permitiendo el transporte de fármacos hidrofóbicos o la obtención de sistemas con una multirespuesta.<sup>31</sup> El estímulo puede ser un campo magnético, irradiación infrarroja cercana, pH, temperatura u otros. Además, en algunos casos la incorporación de NPs tales como sílica mesoporosa puede mejorar la carga de un fármaco.

Existen dos estrategias principales para incorporar NPs inorgánicas en la red polimérica, una física y otra química: a) pueden introducirse físicamente en la matriz antes o después de la gelificación para que queden atrapadas en el NG; o b) pueden incorporarse covalentemente utilizando NPs como agente entrecruzante o en los sitios de anclaje del nanogel.<sup>10,14</sup> Esta última estrategia resulta prometedora ya que presenta distintas ventajas al estar las nanopartículas unidas covalentemente, como no difundir a través de la matriz polimérica.

En particular, la incorporación de nanopartículas magnéticas al nanogel concede la posibilidad de utilizarlo como agente teragnóstico ya que puede responder rápidamente a un campo magnético externo, permitiendo un seguimiento del nanodispositivo y un mayor control en la liberación del fármaco, resultando ideal para las terapias localizadas, como quimioterapia,

radiación, inmunoterapia, hipertermia, o una combinación de estos.<sup>31,32</sup> En este sentido, la combinación de nanopartículas magnéticas y un nanogel termosensible además de poder ser utilizado como agente de contraste, permite la liberación estimulada óptima de fármacos durante varias semanas posteriores debido a la relación entre la temperatura de transición de fase ( $T_{if}$ ) del nanogel. Así, el calor generado por las nanopartículas magnéticas bajo un campo magnético alternante aumenta la temperatura de los nanogeles por encima de su  $T_{if}$ , generando el colapso de los mismos y, por lo tanto, mejora la difusión del fármaco a través de los nanogeles.<sup>31</sup>

## 2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH

Otro nanodispositivo ampliamente utilizado son las nanopartículas magnéticas recubiertas. Una de las principales motivaciones es que los macrófagos del sistema retículo endotelial (RES) tienen la habilidad de remover nanopartículas desnudas del flujo sanguíneo en tan sólo segundos luego de la administración intravenosa. Estos macrófagos no pueden identificar las nanopartículas en sí mismas, sino que reconocen las proteínas opsoninas específicas unidas a la superficie de las partículas. Para evitar el proceso de opsonización es que se recurre a distintas estrategias de revestimiento que permiten a las nanopartículas no ser reconocidas temporalmente y es así como aumentan su tiempo de vida medio de circulación en el torrente sanguíneo.<sup>33</sup>

En particular, las nanopartículas magnéticas se recubren a menudo con un material polimérico para (1) que sean biocompatibles y estables en fluidos fisiológicos, (2) proporcionar una superficie modificada que puede usarse para una funcionalización adicional, (3) aumentar la estabilidad química y térmica, (4) disminuir la citotoxicidad.<sup>34</sup> Esta modificación superficial puede incrementar la afinidad de inmovilización de distintas moléculas como fármacos, ligandos, receptores, etc.<sup>35-37</sup> Si la nanopartícula está recubierta por cadenas poliméricas, el sistema se denomina **core-brush**.

Además, si la capa polimérica utilizada para cubrir las nanopartículas es termosensible no sólo existe la posibilidad de utilizarlo como agente teragnóstico debido a las propiedades inherentes de las MNPs, sino que también se puede realizar una liberación controlada estimulada por la temperatura, cuando ésta supere la  $T_{if}$  del polímero utilizado.<sup>38</sup>

## 2.3 METODOLOGÍAS DE SÍNTESIS DE NANOGELES Y NANOPARTÍCULAS MAGNETICAS CORE-BRUSH

Existen distintas técnicas y metodologías para la obtención de nanogeles y nanopartículas magnéticas termosensibles tipo *core-brush*. En el siguiente apartado se explican las polimerizaciones y reacciones químicas más utilizadas como también las metodologías empleadas para lograr el control del tamaño del nanogel o nanopartícula.

### 2.3.1 Tipos de polimerización

Dependiendo de la estructura y funcionalidad de los monómeros, las polimerizaciones radicalarias, catiónicas y aniónicas, se presentan como alternativas sintéticas. Sin embargo, el empleo de estas metodologías no permite el control del peso molecular de las cadenas poliméricas. En respuesta a esta dificultad, se desarrollaron nuevas rutas sintéticas mediante el uso de la polimerización radicalaria controlada (PRC). En los últimos años, han sido reportadas distintas técnicas de PRC tales como la polimerización controlada por transferencia atómica (ATRP por sus siglas en inglés),<sup>39-42</sup> la polimerización mediada por nitróxido (NMP por sus siglas en inglés)<sup>43,44</sup> y polimerización por transferencia de cadena reversible de adición-fragmentación (RAFT por sus siglas en inglés)<sup>45</sup>. Tanto ATRP como RAFT se basan en el equilibrio dinámico entre especies activas y desactivadas. Las técnicas de PRC son una buena manera de producir nanopartículas poliméricas con peso molecular controlado y baja polidispersidad.<sup>46</sup> Otras metodologías como aquellas que involucran apertura de anillo, las reacciones de acoplamiento y la química click también se usan para sintetizar los NGs a partir de monómeros y polímeros funcionalizados.

#### 2.3.1.1 Polimerización radicalaria no controlada

La polimerización radicalaria no controlada es una de las técnicas más utilizadas para la obtención de nanogeles. Esta metodología emplea monómeros vinílicos y un iniciador. Este último tiene un enlace lábil que permite el inicio de la reacción. Esta consta de tres etapas como se muestra en la Figura 2.5.<sup>47</sup>

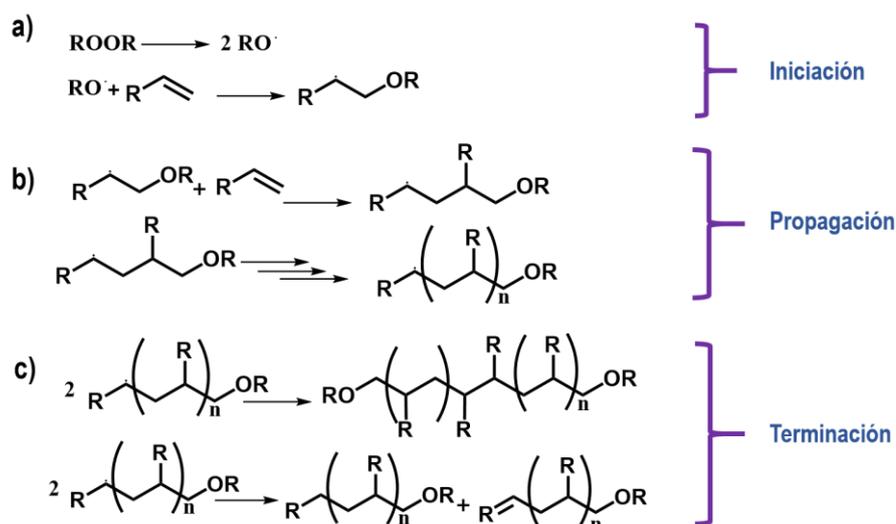


Figura 2.5. Esquema de las etapas de la polimerización radicalaria no controlada.

En una primera etapa se genera el radical en el iniciador ya sea por activación térmica, fotoquímica, etc. Este radical se adiciona a uno de los carbonos vinílicos para generar el radical más estable. A partir de allí, la cadena empieza a crecer al ir incorporando los monómeros hasta llegar a una etapa de terminación, en donde puede haber una abstracción de un hidrógeno o dos cadenas pueden encontrarse.<sup>48</sup>

La principal ventaja de esta técnica es su versatilidad: puede realizarse en distintos medios de reacción, con cualquier monómero vinílico y resulta una metodología simple. Una de las desventajas que presenta esta técnica es que no se puede controlar el crecimiento de las cadenas poliméricas y, por ende, el tamaño de la partícula sintetizada. Es por esta razón que esta técnica se utiliza para la síntesis de nanopartículas poliméricas en combinación a otras metodologías que permitan el control de su tamaño. Así, existen varias estrategias para la síntesis de nanogeles utilizando polimerización radicalaria no controlada mediante precipitación o miniemulsión. Ambas técnicas permiten lograr una dispersión de tamaños de las partículas muy baja.<sup>6,13</sup>

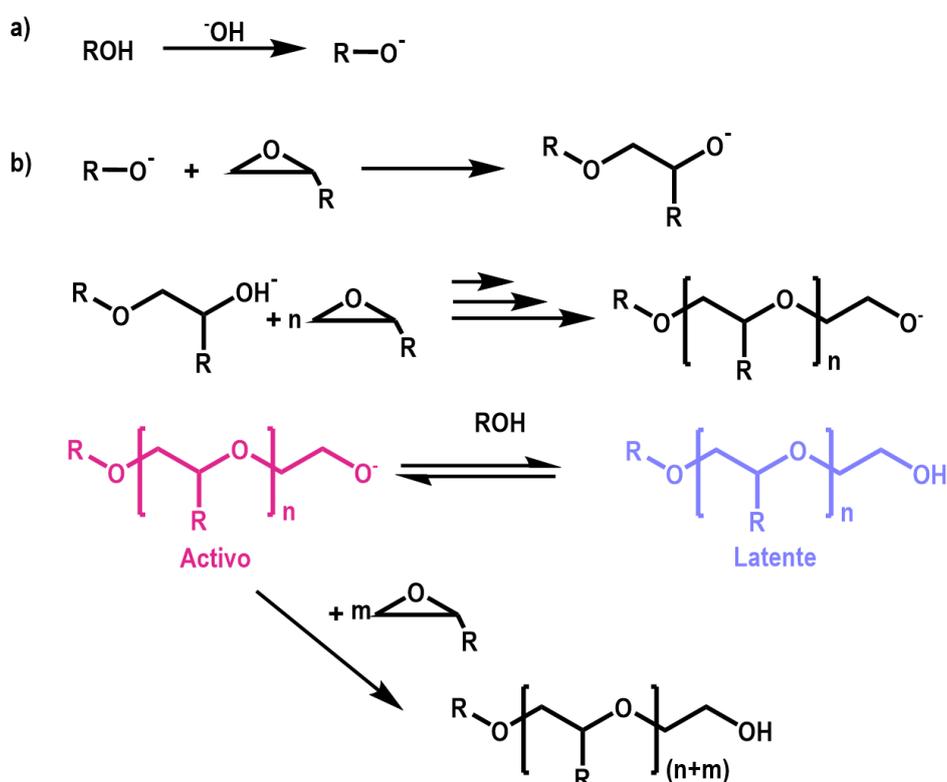
### 2.3.1.2 Polimerización por apertura de anillo (PAA)

La polimerización por apertura de anillo se ha utilizado para la obtención de polímeros importantes comerciales tales como resina epoxi a partir de éteres cíclicos de anillo epóxidos de 3 miembros, poliésteres de ésteres cíclicos (lactonas), poliamidas de amidas cíclicas (lactamas), polisiloxanos de siloxanos cíclicos, entre otros.<sup>49</sup>

En particular, la síntesis de polímeros originados mediante polimerización por apertura de anillo epóxido ha sido ampliamente estudiada principalmente porque permite la obtención de poliéteres de gran interés biológico. La fuerza motriz para la PAA es la alta tensión anular de los epóxidos. Esto permite la polimerización de monómeros de epóxido (IUPAC: oxirano) de tres maneras: a) iniciado por base, b) iniciado por ácido, y c) por polimerización por coordinación.<sup>50</sup>

En particular, la PAA aniónica ha sido una de las metodologías más empleadas en los últimos años y se basa en utilizar un nucleófilo como iniciador. Si se desea la obtención de poliglicerol (PG) de bajo peso molecular, se emplean compuestos de metales alcalinos para catalizar y formar el nucleófilo. También se puede agregar un agente complejante para acelerar la polimerización de epóxido.

El esquema de la reacción de polimerización se muestra en la Figura 2.6. En una primera etapa, se produce la desprotonación parcial del iniciador alcóxido que es suficiente para iniciar la polimerización mediante un ataque nucleofílico que marca el comienzo de la etapa de propagación. El crecimiento de la cadena puede verse como una polimerización con una terminación reversible, siendo que las mismas tienen un grupo hidroxilo latente que por acción de una base fuerte puede perder el protón para seguir con la polimerización.<sup>51</sup>



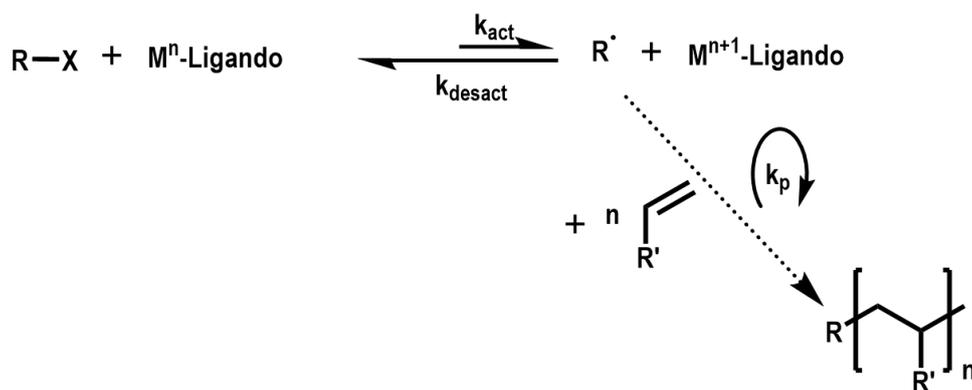
**Figura 2.6** Esquema de polimerización aniónica por apertura de anillo. a) iniciación, b) propagación.

Los poliéteres alifáticos generados por la polimerización por apertura de anillo (PAA) a partir de los monómeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) resultan de gran

interés. En particular, el poliglicerol (PG) ha sido uno de los más estudiados debido a sus propiedades de biocompatibilidad y a sus potenciales aplicaciones en distintas áreas como farmacéuticas, cosméticas y médicas.<sup>52-54</sup> Además, se lo utiliza para una amplia gama de productos que van desde el cuidado de la piel hasta formulaciones de comprimidos, laxantes y aditivos alimentarios.

### 2.3.1.3 Polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP)

La polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP) es una técnica robusta para controlar de manera uniforme y con precisión la composición química y la arquitectura de los polímeros, además del crecimiento uniforme de todas las cadenas del mismo. El mecanismo mediante el cual se produce la polimerización por ATRP se esquematiza en la Figura 2.7.<sup>55</sup>



**Figura 2.7** Esquema de reacción de la polimerización radicalaria por transferencia atómica.

El iniciador es un halogenuro de alquilo el cual reacciona para formar un radical que será el que inicie la polimerización. Estas especies se generan a través de un proceso rédox reversible catalizado por un complejo de un metal de transición M<sup>n</sup>-Ligando (M<sup>n</sup> representa la especie de un metal de transición con estado de oxidación n y L el ligando), el cual sufre una transferencia de un electrón con una abstracción simultánea del halógeno. Las especies latentes reaccionan periódicamente con los metales de complejos de transición en sus bajos estados de oxidación, M<sup>n</sup>-Ligando con constante de velocidad de desactivación (k<sub>desact</sub>). Esto produce radicales que tienen un crecimiento intermitente (R•) y un desactivador, el complejo de metal de transición en su estado de oxidación más alto (X-M<sup>n+1</sup>/L). La propagación ocurre por la adición de las especies radicalarias al monómero, con una constante de velocidad k<sub>p</sub>, de manera similar a la polimerización radicalaria convencional. El crecimiento de cadena continúa hasta que el radical propagante terminal reduce las especies oxidadas metálicas. El agente desactivador reacciona con el radical que se propaga en la reacción inversa (k<sub>desact</sub>) para volver a formar la

especie latente y el activador. Por lo tanto, el mecanismo está controlado por un equilibrio entre los radicales que se propagan y las especies latentes, predominando las formas de haluros de alquilo (R-X) que inician las especies radicalarias.<sup>40,41,56</sup>

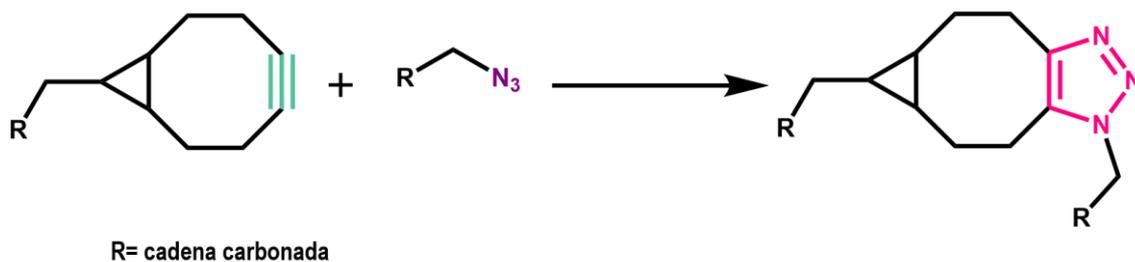
Este proceso catalítico puede ser mediado por diversos complejos de metales de transición, siendo  $Cu^I/L$  y  $Cu^{II}/L$  uno de los sistemas catalíticos más utilizados en este tipo de reacciones. Sin embargo, también pueden emplearse otros metales tales como Ru, Fe, Mo, Os, etc. Además, también existen una gran variedad de ligandos complejantes por ejemplo 2,2-bipiridina (Bipy), (1,1,4,7,7) pentametildietilentríamina (PMDETA) o (tris [2- (dimetilamino) etil] amina) (Me6TREN). La selección del ligando óptimo depende del monómero, el peso molecular que se busca y las condiciones de reacción. A su vez, distintos parámetros deben ser considerados para una ATRP. Entre ellos pueden nombrarse: la solubilidad, la estabilidad del complejo metálico, el potencial redox y afinidad hacia haluros, el halógeno empleado, etc.<sup>57,58</sup>

La metodología correspondiente presenta algunas ventajas como que todas las cadenas del polímero pueden crecer al mismo tiempo, por lo cual pueden obtenerse polímeros de peso moleculares altos con baja dispersidad. Asimismo, si se agrega un segundo monómero puede reactivarse el crecimiento de cadenas logrando copolímeros en bloque. Es decir, que la ATRP posibilita el control preciso de la arquitectura molecular (composición, topología, y funcionalidad), que conduce a la síntesis de diferentes materiales con aplicaciones interesantes.<sup>55,59,60</sup> Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la modificación de superficies planas, la síntesis de nanogeles, y polímeros tipo estrellas.<sup>61-64</sup>

### 2.3.2 Química *click* promovida por tensión anular

El concepto de química *click* fue introducido por Sharpless en el año 2001.<sup>65</sup> Las principales ventajas de este procedimiento son los tiempos de reacción más cortos y su mayor reactividad.<sup>66,67</sup> Adicionalmente, las reacciones de tipo *click* se caracterizan por su selectividad, simple armado del sistema experimental, aplicabilidad en sistemas acuosos y aeróbicos, tolerancia a una variedad de grupos funcionales, rendimientos cuantitativos y trabajo experimental sencillo.<sup>68</sup>

En particular, el empleo de la reacción azida-alquino de Huisgen libre de cobre promovida por tensión anular consta de un sólo paso de reacción en el cual el grupo azida de un compuesto reacciona con el grupo alquino presente en un compuesto que tiene una gran tensión anular (Figura 2.8).<sup>69</sup>



**Figura 2.8** Esquema de la cicloadición de Huisgen azida-alquino libre de cobre promovida por tensión anular.

Particularmente, estas reacciones no tienen requerimientos adicionales y son más amigables con el medioambiente que las reacciones clásicas de química click ya que no utilizan cobre, el cual es tóxico. Esta técnica es muy prometedora en el área biológica ya que permite la modificación simple de distintas moléculas biológicas como ADN, péptidos y proteínas sin alterar sus funciones. De esta manera, distintas moléculas biológicas podrían conjugarse a diversos nanodispositivos.<sup>69</sup>

### 2.3.3 Metodologías de síntesis

Las técnicas de polimerización y síntesis descritas anteriormente pueden ser utilizadas para la obtención tanto de polímeros a escala macro como nano. Para sistemas poliméricos en la nanoescala se necesita una metodología que permita tener un gran control del tamaño del sistema final.

Existen dos enfoques principales para la creación de partículas a escala nanométrica: el enfoque *top-down* (litografía) y el enfoque *bottom-up*, en el que la escala nanométrica se controla diseñando estructuras y conjuntos moleculares. Esta última metodología es la más extendida en nanotecnología y en la formación de nanopartículas poliméricas. Actualmente se conocen distintas metodologías para la obtención de nanopartículas poliméricas. En la Tabla 2.1 se muestra un resumen de las más utilizadas.

**Tabla 2.1.** Resumen de las técnicas más utilizadas para la obtención de nanopartículas poliméricas.

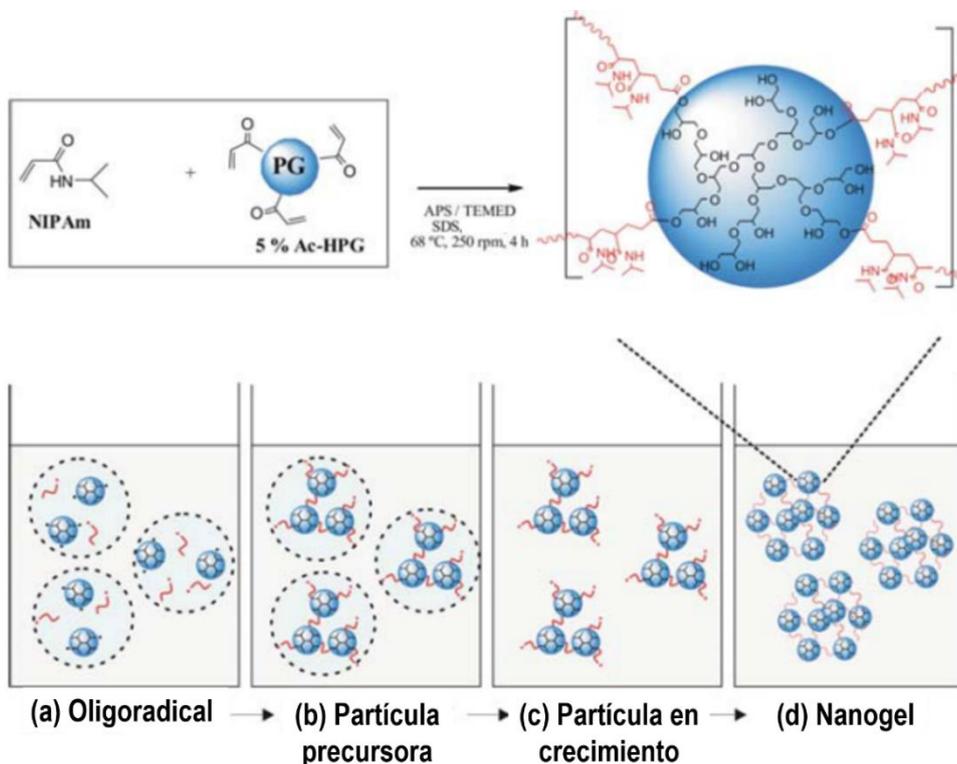
Técnica	Principio	Ventajas	Desventajas	Referencias
<b>Miniemulsión</b>	Micelas de tamaños nanométricos donde se realiza la polimerización	Versátil. Distribución de tamaños entre 50-500 nm Puede incorporarse un fármaco <i>in situ</i>	Uso de surfactante. Utilización de equipos especiales como ultrasonicador. Dificultad para escalar la síntesis.	70–74
<b>Termoprecipitación</b>	A medida que se forma el polímero, el mismo se encuentra insoluble a T de reacción, y por consiguiente precipita	Proceso de un único paso. Control del tamaño entre 100-600 nm en función de la concentración de monómeros	Solo funciona con monómeros para obtener polímeros termosensibles	75–77
<b>Nanoprecipitación</b>	Utilización de un solvente en el que el polímero debe ser soluble y un no-solvente (miscible con el solvente)	Versátil, facilidad de incorporación de fármacos <i>in situ</i>	El par solvente/no-solvente se elige en función de los reactivos	74,78–80
<b>Autoensamblado físico</b>	Interacciones electrostáticas entre las cadenas poliméricas	Condiciones suaves de reacción. Incorporación de moléculas bioactivas sensibles	Puede ser utilizado solo con copolímeros con funcionalidades específicas	81–84

### 2.3.3.1 Polimerización por termoprecipitación

La polimerización por termoprecipitación se utiliza en los casos en que los monómeros son dispersables en un solvente específico mientras que el polímero no. Es una metodología útil para la preparación de diversos NGs termosensibles tales como aquellos derivados del NIPA o de OEG.<sup>75</sup>

La polimerización ocurre a una temperatura mayor a la  $T_{if}$  del polímero, encontrándose dispersos tanto los monómeros como el iniciador. La cadena polimérica comienza a crecer hasta alcanzar un tamaño crítico y precipita, generando partículas precursoras. En algunos casos también se le adiciona un surfactante cuando alguno de los monómeros no es soluble.<sup>85</sup> Las partículas precursoras insolubles se encuentran estabilizadas por la presencia del agente surfactante iónico (en concentraciones menores a la concentración micelar crítica, CMC). Estas partículas crecen mediante la absorción de monómeros e iniciadores. El diámetro de las partículas depende inversamente de la concentración del surfactante, por lo que se pueden obtener partículas pequeñas aumentando la concentración del mismo.<sup>76,86</sup> Cai y colaboradores<sup>87</sup> estudiaron el efecto del surfactante en la síntesis de nanogel termosensibles derivados del OEG demostrando que al incrementar la cantidad de surfactante, el tamaño del nanogel disminuía.

El Laboratorio de Materiales Poliméricos (LAMAP) en colaboración con el grupo del Dr. Calderón del Instituto de química y bioquímica de la Universidad Libre de Berlín, sintetizaron dos nanogel de PNIPA utilizando como agente entrecruzante poliglicerol dendrítico acrilado mediante termoprecipitación como se muestra en la Figura 2.9.



**Figura 2.9** Esquema de síntesis de nanogel de PNIPA utilizando como agente entrecruzante poliglicerol dendrítico mediante termoprecipitación. Reproducido de la referencia 23.

Por un lado, se estudió la síntesis de nanogeles encontrando que se podía controlar el tamaño y la  $T_{tr}$  mediante la cantidad de poliglicerol. Estos nanogeles mostraron buenas propiedades biológicas en cuanto a citotoxicidad e internalización celular.<sup>23</sup> Por otro lado, se investigaron nanogeles de PNIPAM utilizando como co-monómero dendrones del tipo Newkome obteniendo propiedades únicas con respuesta a distintos estímulos como el pH y la temperatura.<sup>88</sup>

Por su parte, Calderón y colaboradores<sup>89</sup> continuaron con el estudio de los nanogeles basado en NIPA y poliglicerol dendrítico evaluando su función como nanodispositivo de liberación de fármacos para tratamientos de enfermedades de la piel. La liberación de albúmina de suero bovino (BSA) y asparginasa en la piel de cerdo se produjo al aumentar temperatura específicamente en la epidermis de la piel carente de barreras y esta liberación se logró sin pérdida de integridad y bioactividad de la proteína.<sup>90</sup> Además, se estudió la síntesis de nanogeles incorporando como comonómero (2-dimetilamino) etil metacrilato (DMAEM). Se demostró que tanto la  $T_{tr}$  como el potencial Z de los nanogeles depende de manera drástica de la proporción de DMAEM y se logró exitosamente la incorporación de doxorubicina.<sup>21</sup>

### 2.3.3.2 Nanoprecipitación

La nanoprecipitación es un método que implica el uso de un solvente orgánico que es miscible con una fase acuosa y en el cual el polímero es soluble.<sup>74</sup> La formación de las partículas se genera mediante la disolución del polímero en el solvente, y la inyección de esta solución en el no- solvente. Al inyectarlo, se produce una rápida difusión del solvente en el no-solvente y la formación de una suspensión coloidal. El proceso de formación de las partículas posee 3 etapas: a) nucleación, b) crecimiento y c) agregación, en las cuales la tercera etapa ocurrirá hasta la formación de una dispersión estable.<sup>91,92</sup> El tamaño de los nanogeles sintetizados mediante esta metodología pueden variar entre 80 y 300 nm y compuestos bioactivos pueden ser incorporados fácilmente de manera *in situ*.<sup>79,93</sup>

Esta técnica presenta varias ventajas como su simplicidad, que puede escalarse a nivel industrial y que requiere sólo una ligera agitación bajo condiciones suaves de reacción. En general, se obtienen NPs más pequeñas mediante este método.<sup>74</sup>

Actualmente, se encuentra en constante estudio el mejoramiento de esta técnica. Por un lado, Liu y su grupo de investigación<sup>94</sup> desarrollaron una plataforma secuencial microfluidica de nanoprecipitación mediante la cual se pueden obtener nanocompósitos de estructura tipo *core-shell* en un proceso continuo y rápido. Por otro lado, Reisch y colaboradores<sup>95</sup> desarrollaron una

metodología de nanoprecipitación controlada por la carga del polímero permitiendo la obtención de nanopartículas ultrapequeñas.

Se encuentran reportadas nanoesferas de almidón lográndose un gran control en el tamaño de las mismas variando la concentración de almidón.<sup>96</sup> En esta misma línea, Geissler *et al.*<sup>97</sup> estudiaron la síntesis de nanopartículas de ésteres de estearoil de celulosa encontrando también una dependencia del tamaño de las nanopartículas en función de la concentración de celulosa. A su vez, demostraron la factibilidad de utilizar estas nanopartículas para la fabricación de superficies superhidrofóbicas con respuesta a la temperatura.

Por otra parte, Yan y colaboradores<sup>98</sup> reportaron el diseño de nanocápsulas basadas en Poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA) mediante nanoprecipitación y demostraron una eficiencia de encapsulación de fármacos anticancerígenos dentro de las mismas. Además, Calderón y su grupo de investigación sintetizaron mediante nanoprecipitación nanogeles basados en PNIPA.<sup>80</sup>

## **2.4 ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS DE ESTUDIO**

### **2.4.1 Nanogeles termosensibles**

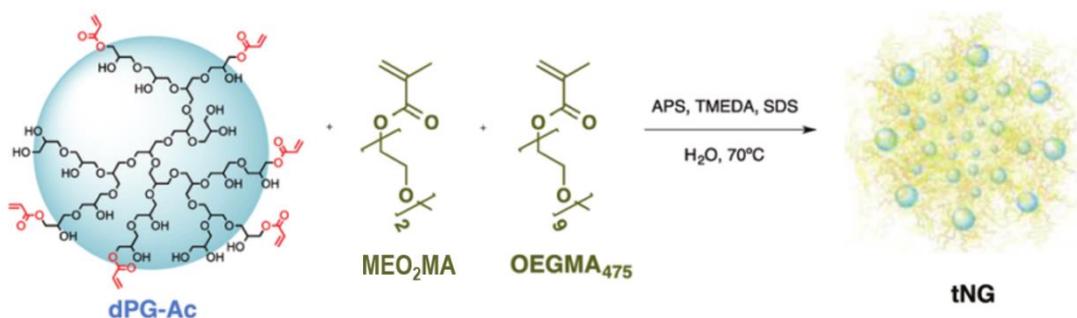
En la actualidad existen varios reportes de nanogeles termosensibles utilizando distintos monómeros. Por ejemplo, se reportó la síntesis de nanogeles termosensibles de gelatina y PNIPA con una temperatura de transición de fase alrededor de 32 °C. Se observó una considerable reducción de volumen inducida térmicamente debido a la transición de la cadena de gelatina dentro del gel de una conformación hélice a una desordenada.<sup>99</sup>

Además, se han diseñado distintos nanogeles termosensibles de PVCL. Wang y colaboradores<sup>100</sup> sintetizaron un nanogel de PVLC incorporando enlaces disulfuro utilizando como entrecruzante N,N'-bis(acrilóil) cistamina (BAC). Se demostró la biocompatibilidad y la degradabilidad de estos nanogeles inteligentes y su potencial empleo como nanodispositivo con respuesta a la temperatura, al pH y al potencial rédox. Por su parte, Madhusudana Rao y su grupo de investigación<sup>101</sup> obtuvieron nanogeles pH y termosensibles a partir de VCL y ácido acrilamidoglicólico (AGA) que logró incorporar 5-Flurouracil, un fármaco contra el cáncer, al sistema. Los estudios de liberación *in vitro* de 5-FU demostraron la naturaleza dual (pH y temperatura) de estos NG.

Por otro lado, Calderón y colaboradores han estado investigando nanogeles dendríticos termosensibles.<sup>21,102-105</sup> Así, sintetizaron diversos nanogeles basados en PNIPA y poliglicerol dendrítico. en un rango amplio de tamaños, de 100 nm a 600 nm, variando así sus aplicaciones

ya sea para liberación controlada de fármacos anticancerígenos o bien para aplicación dérmica.<sup>77,106</sup>

Los nanogeles basados en oligoetilenglicol también han captado el interés científico. Cai y colaboradores<sup>87</sup> sintetizaron nanogeles de (MEO<sub>2</sub>MA-co-OEGMA) obteniendo un control de la  $T_{tr}$  variando la relación entre los monómeros. Además, el grupo de investigación del Dr. Calderón reportaron la síntesis de nanogeles a partir de MEO<sub>2</sub>MA utilizando como entrecruzante poliglicerol dendrítico.<sup>103,104</sup> El esquema de reacción se puede observar en la Figura 2.10.



**Figura 2.10** Esquema de reacción de la síntesis de nanogel a partir de dPG y monómeros derivados de oligo etilenglicol. Reproducido de la referencia 103.

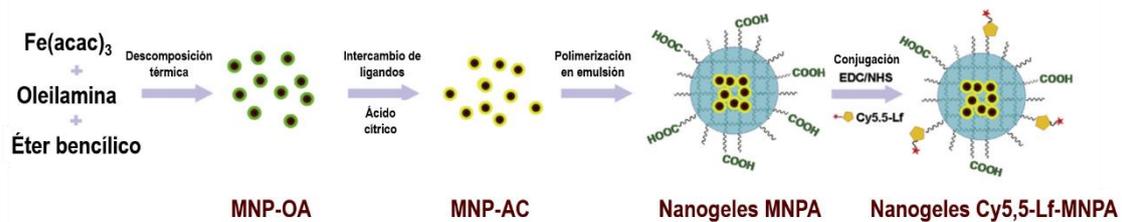
Los estudios demostraron tanto el comportamiento termosensible del sistema como la factibilidad de anclar una serie de colorantes para la utilización de este nanodispositivo para terapia fotodinámica y fototérmica

## 2.4.2 Nanogeles híbridos

Existen diversos ejemplos de distintos nanogeles híbridos. En particular, se encuentran reportados diversos nanogeles magnéticos y termosensibles con la incorporación, principalmente física de las MNPs. Se han utilizados distintos monómeros tales como NIPA,<sup>107-109</sup> VCL,<sup>110</sup> AM,<sup>111</sup> quitosano,<sup>112,113</sup> para la síntesis de los nanogeles. En particular, Liu G. y colaboradores<sup>107</sup> sintetizaron un NG de PNIPA cargado con MNPs de magnetita y demostraron la potencial capacidad del sistema para la liberación controlada de fármacos. Asimismo, Liu J. y colaboradores<sup>110</sup> incorporaron nanopartículas de maghemita en nanogeles basados en poli(vinilalcohol-b-N-vinilcaprolactama) [P (VA-b-VCL)] para la liberación de doxorubicina (DOX) y debido a las propiedades superparamagnéticas de las MNPs la liberación del fármaco se vio acelerada por el empleo del campo magnético alternante. Del mismo modo, Chiang y su grupo de investigación<sup>114</sup> informaron la síntesis de un nanogel magnético formado por polietilenglicol

(PEG), ácido acrílico (AA) y PNIPAA utilizando como entrecruzante 2-metacriloxietil acrilato (MEA) y observaron también un incremento en la liberación de DOX.

Por otro lado, Jiang y colaboradores<sup>115</sup> diseñaron nanogeles sensibles al pH y a la temperatura conjugados a lactoferrina marcada con cianina 5.5 (Cy5.5-Lf) utilizando como monómeros AA y NIPAA y como entrecruzante N,N'-metilbisacrilamida e incorporando MNP de óxido de hierro como se esquematiza en la Figura 2.11.

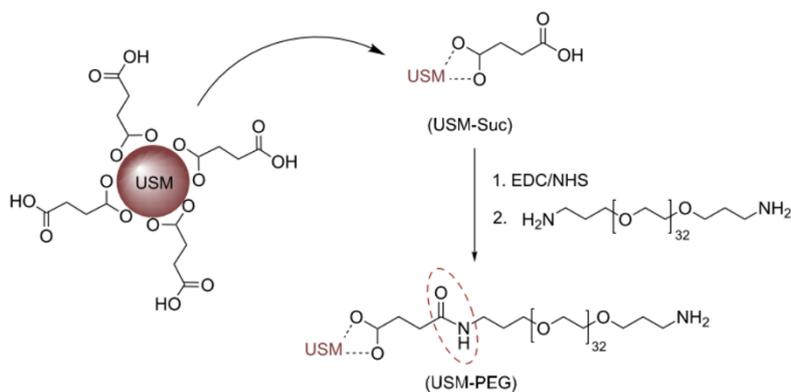


**Figura 2.11** Síntesis de nanopartículas magnéticas, intercambio de ligando y síntesis de nanogeles magnéticos. Reproducido de la referencia 115.

Del mismo modo, Bhattachary *et al.*<sup>116,117</sup> reportaron nanogeles con respuesta a la temperatura y el pH y la formación *in situ* de nanopartículas de óxido de hierro en la estructura del nanogel. Los monómeros utilizados para la síntesis fueron N-vinilcaprolactama (VCL), acetoacetoxietil metacrilato (AAEM) y vinilimidazol (VIm). La combinación única de las diferentes respuestas a estímulo en estos dispositivos híbridos hace que sean interesantes candidatos para aplicaciones de liberación de fármacos controlados magnéticamente.

### 2.4.3 Nanopartículas magnéticas *core-brush*

Uno de los polímeros más utilizados para recubrir nanopartículas es el polietilenglicol debido principalmente a que las cadenas de PEG en la superficie de la nanopartícula crea una barrera para bloquear la adhesión de las opsoninas presentes en el suero sanguíneo, por lo que las nanopartículas pueden permanecer camufladas e invisibles a las células macrófitas.<sup>33</sup> Existen numerosos reportes de la utilización de este polímero para el recubrimiento de nanopartículas magnéticas. Por ejemplo, Castillo y colaboradores<sup>118</sup> estudiaron la encapsulación de camptotecina en nanopartículas magnéticas ultrapequeñas desnudas y nanopartículas recubiertas con PEG. Para la síntesis de este sistema *core-brush*, primero modificaron superficialmente la nanopartícula con grupos carboxílicos para la posterior unión covalente del PEG con terminales amino como se esquematiza en la Figura 2.12.



**Figura 2.12** Esquema de modificación superficial de nanopartículas magnéticas ultrapequeñas (USM) con cadenas de PEG. Reproducido de la referencia 118.

Para ambas nanopartículas se logró una exitosa incorporación de la camptotecina. Se demostró que la modificación superficial de las nanopartículas con PEG permite la encapsulación de una gran cantidad de camptotecina con una capacidad de incorporación del 26 %.

En consecuencia, existen algunos antecedentes de nanopartículas magnéticas y termosensibles tipo *core-brush*. Wang y colaboradores<sup>119</sup> sintetizaron nanopartículas magnéticas híbridas sensibles a la temperatura para la liberación de fármacos. Para ello recubrieron MNPs con poli(óxido de etileno)- poli(L-lisina) e incorporaron DOX al sistema. Se demostró la liberación de DOX debido a los efectos sinérgicos de los polímeros termosensibles y del calentamiento inducido magnéticamente.

**2.5 REFERENCIAS**

1. Kabanov A V., Vinogradov S V. Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew Chemie - Int Ed.* 2009;48(30):5418-5429. doi:10.1002/anie.200900441.
2. Sivaram AJ, Rajitha P, Maya S, Jayakumar R, Sabitha M. Nanogels for delivery, imaging and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2015. doi:10.1002/wnan.1328.
3. Coll Ferrer MC, Dastgheyb S, Hickok NJ, Eckmann DM, Composto RJ. Designing nanogel carriers for antibacterial applications. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2105-2111. doi:10.1016/j.actbio.2014.01.009.
4. Tang Z, He C, Tian H, et al. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2016;60:86-128. doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.05.005.
5. Wu HQ, Wang CC. Biodegradable smart nanogels: A new platform for targeting drug delivery and biomedical diagnostics. *Langmuir.* 2016;32(25):6211-6225. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00842.
6. Montoro SR, Medeiros S de F, Alves GM. *Nanostructured Hydrogels.* Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-1-4557-3159-6.00010-9.
7. Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem Soc Rev.* 2016;45(5):1457-1501. doi:10.1039/C5CS00798D.
8. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Ghasemi A, et al. Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(33):21107-21133. doi:10.1021/acsami.6b00371.
9. Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater.* 2016;1:16071. doi:10.1038/natrevmats.2016.71.
10. Kowalczyk A, Trzcinska R, Trzebicka B, Müller AHE, Dworak A, Tsvetanov CB. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. *Prog Polym Sci.* 2014;39(1):43-86. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.10.004.
11. Stéphanie L, Rousseau B, Epherre R, et al. Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganite nanoparticles for remotely triggered drug release. *Polym Chem.* 2012;3:1408-1417. doi:10.1039/C4NR01030B.
12. Xue C, Li Q. Stimuli-responsive smart organic hybrid metal nanoparticles. In: *Intelligent Stimuli-Responsive Materials: From Well-Defined Nanostructures to Applications.* ; 2013:293-333. doi:10.1002/9781118680469.ch9.
13. Varaprasad K, Sadiku ER, Ramam K, Jayaramudu J, Reddy GSM. *Significances of Nanostructured Hydrogels for Valuable Applications.* Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-1-4557-3159-6.00008-0.
14. Thoniyot P, Tan MJ, Karim AA, Young DJ, Loh XJ. Nanoparticle-Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Adv*

- Sci.* 2015;2:1400010. doi:10.1002/advs.201400010.
15. Omura T, Ebara M, Lai JJ, Yin X, Hoffman AS, Stayton PS. Design of Smart Nanogels that Respond to Physiologically Relevant pH Values and Temperatures. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(3):2557-2562. doi:10.1166/jnn.2014.8551.
  16. Cheng R, Meng F, Deng C, Klok HA, Zhong Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials.* 2013;34(14):3647-3657. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.084.
  17. Cao ZQ, Wang GJ. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Materials: Particles, Films, and Bulk Gels. *Chem Rec.* 2016;16:1398-1435. doi:10.1002/tcr.201500281.
  18. Bergueiro J, Calderón M. Thermoresponsive nanodevices in biomedical applications. *Macromol Biosci.* 2015;15(2):183-199. doi:10.1002/mabi.201400362.
  19. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Baghaee-Ravari S, Ghazizadeh M, Mirshekari H, Hamblin MR. Smart nanostructures for cargo delivery: Uncaging and activating by light. *J Am Chem Soc.* 2017;139(13):4584-4610. doi:10.1021/jacs.6b08313.
  20. Xiong W, Wang W, Wang Y, et al. Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;84(2):447-453. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.01.040.
  21. Molina M, Giubudagian M, Calderón M. Positively charged thermoresponsive nanogels for anticancer drug delivery. *Macromol Chem Phys.* 2014;215(24):2414-2419. doi:10.1002/macp.201400286.
  22. Jochum FD, Theato P. Temperature- and light-responsive smart polymer materials. *Chem Soc Rev.* 2013;42(17):7468-7483. doi:10.1039/C2CS35191A.
  23. Cuggino JC, Álvarez I. CI, Strumia MC, et al. Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications. *Soft Matter.* 2011;7(23):11259. doi:10.1039/c1sm06357j.
  24. Kozlovskaya V, Xue B, Kharlampieva E. Shape-adaptable polymeric particles for controlled delivery. *Macromolecules.* 2016;49(22):8373-8386. doi:10.1021/acs.macromol.6b01740.
  25. Hou L, Wu P. Microgels with Linear Thermosensitivity in a Wide Temperature Range. *Macromolecules.* 2016;49(16):6095-6100. doi:10.1021/acs.macromol.6b01359.
  26. Sierra-Martin B, Fernandez-Barbero A. Multifunctional hybrid nanogels for theranostic applications. *Soft Matter.* 2015;11(42):8205-8216. doi:10.1039/C5SM01789K.
  27. Sierra-Martin, B.; Fernandez-Barbero A. Multifunctional hybrid nanogels for theranostic applications. *Soft Matter.* 2015;11:8205-8216. doi:10.1039/c5sm01789k.
  28. Wu W, Zhou S. Responsive Polymer-Inorganic Hybrid Nanogels for Optical Sensing, Imaging, and Drug Delivery. In: *Nanomaterials in Drug Delivery, Imaging, and Tissue Engineering.* ; 2013:269-319. doi:10.1002/9781118644591.ch8.
  29. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for

- remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B*. 2015;3(30):6117-6147. doi:10.1039/C5TB00664C.
30. Ryu JH, Koo H, Sun I-C, et al. Tumor-targeting multi-functional nanoparticles for theragnosis: new paradigm for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(13):1447-1458. doi:10.1016/j.addr.2012.06.012.
  31. Merino S, Martín C, Kostarelos K, Prato M, Vázquez E. Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano*. 2015;9(5):4686-4697. doi:10.1021/acsnano.5b01433.
  32. Brazel CS. Magneto-thermally-responsive nanomaterials: Combining magnetic nanostructures and thermally-sensitive polymers for triggered drug release. *Pharm Res*. 2009;26(3):644-656. doi:10.1007/s11095-008-9773-2.
  33. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
  34. Kolhatkar A, Jamison A, Litvinov D, Willson R, Lee T. *Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles*. Vol 14.; 2013. doi:10.3390/ijms140815977.
  35. Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;209:8-39. doi:10.1016/j.cis.2013.12.008.
  36. Wu W, Shen J, Banerjee P, Zhou S. Core-shell hybrid nanogels for integration of optical temperature-sensing, targeted tumor cell imaging, and combined chemo-photothermal treatment. *Biomaterials*. 2010;31(29):7555-7566. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.030.
  37. Peng E, Wang F, Xue JM. Nanostructured magnetic nanocomposites as MRI contrast agents. *J Mater Chem B*. 2015;3(11):2241-2276. doi:10.1039/C4TB02023E.
  38. Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Prog Polym Sci*. 2010;35(1-2):174-211. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.10.004.
  39. Dong H, Matyjaszewski K. Thermally Responsive P(M(EO)<sub>2</sub> MA-co-OEOMA) Copolymers via AGET ATRP in Miniemulsion. *Macromolecules*. 2010;43(10):4623-4628. doi:10.1021/ma100570s.
  40. Matyjaszewski K. Atom transfer radical polymerization: From mechanisms to applications. *Isr J Chem*. 2012;52(3-4):206-220. doi:10.1002/ijch.201100101.
  41. Matyjaszewski K, Xia J. *Atom Transfer Radical Polymerization*. Vol 101.; 2001. doi:10.1021/cr940534g.
  42. Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*. 2012;45:4015-4039. doi:10.1021/ma3001719.
  43. Gromadzki D, Jigounov A, Štěpánek P, Makuška R. Synthesis of thermally responsive cylindrical molecular brushes via a combination of nitroxide-mediated radical polymerization and "grafting onto" strategy. *Eur Polym J*. 2010;46(4):804-813. doi:10.1016/j.eurpolymj.2009.12.015.
  44. Nesvadba P. Controlled / Living Radical Polymerization Mediated by Stable Organic

- Radicals. In: *Fundamentals of Controlled/Living Radical Polymerization*. ; 2013:112-167.
45. Zoppe JO, Cavusoglu Ataman N, Mocny P, Wang J, Moraes J, Klok H-A. Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: State-of-the-Art, Opportunities, and Challenges in Surface and Interface Engineering with Polymer Brushes. *Chem Rev*. 2016;117(3):1105–1318. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00314hemrev.6b00314.
  46. Jafari M, Kaffashi B. Pure and Applied Chemistry Synthesis and characterization of a novel solvent- free dextran-HEMA-PNIPAM thermosensitive nanogel. *Pure Appl Chem*. 2016;53(2):68-74. doi:10.1080/10601325.2016.1120173.
  47. Briscoe WH. Polymers and Nanoscience. *Colloid Found Nanosci*. 2014:107-133. doi:10.1016/B978-0-444-59541-6.00005-9.
  48. Stevens MP. . *Polymer Chemistry*. Oxford: Oxford University Press; 1999.
  49. Su W-F. Ring-Opening Polymerization. In: *Principles of Polymer Design and Synthesis*. ; 2013:267-299. doi:10.1007/978-3-642-38730-2\_11.
  50. Tardy A, Nicolas J, Gimes D, Lefay C, Guillaneuf Y. Radical Ring-Opening Polymerization: Scope, Limitations, and Application to (Bio)Degradable Materials. *Chem Rev*. 2017;117(3):1319–1406. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00319.
  51. Herzberger J, Niederer K, Pohlit H, et al. Polymerization of Ethylene Oxide, Propylene Oxide, and Other Alkylene Oxides: Synthesis, Novel Polymer Architectures, and Bioconjugation. *Chem Rev*. 2015;116:2170-2243. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00441.
  52. Weinhart M, Becherer T, Schnurbusch N, Schwibbert K, Kunte HJ, Haag R. Linear and hyperbranched polyglycerol derivatives as excellent bioinert glass coating materials. *Adv Eng Mater*. 2011;13(12):501-510. doi:10.1002/adem.201180012.
  53. Tonhauser C, Schüll C, Dingels C, Frey H. Branched acid-degradable, biocompatible polyether copolymers via anionic ring-opening polymerization using an epoxide inimer. *ACS Macro Lett*. 2012;1(9):1094-1097. doi:10.1021/mz300265z.
  54. Schulte B, Walther A, Keul H, Möller M. Polyglycidol-based prepolymers to tune the nanostructure of microgels. *Macromolecules*. 2014;47(5):1633-1645. doi:10.1021/ma401465c.
  55. Matyjaszewski K, Tsarevsky N V. Macromolecular engineering by atom transfer radical polymerization. *J Am Chem Soc*. 2014;136(18):6513-6533. doi:10.1021/ja408069v.
  56. Matyjaszewski K, Spanswick J. *Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)*.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.01354-0.
  57. Ran J, Wu L, Zhang Z, Xu T. Atom transfer radical polymerization (ATRP): A versatile and forceful tool for functional membranes. *Prog Polym Sci*. 2014;39(1):124-144. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.09.001.
  58. Król P, Chmielarz P. Recent advances in ATRP methods in relation to the synthesis of copolymer coating materials. *Prog Org Coatings*. 2014;77(5):913-948. doi:10.1016/j.porgcoat.2014.01.027.
  59. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features,

- developments, and perspectives. *Prog Polym Sci.* 2007;32(1):93-146. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.11.002.
60. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Recent mechanistic developments in atom transfer radical polymerization. *J Mol Catal A Chem.* 2006;254(1-2):155-164. doi:10.1016/j.molcata.2006.01.076.
  61. Zhou Y, Wang S, Ding B, Yang Z. Modification of magnetite nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP). *Chem Eng J.* 2008;138(1-3):578-585. doi:10.1016/j.cej.2007.07.030.
  62. Wang M, Yuan J, Huang X, Cai X, Li L, Shen J. Grafting of carboxybetaine brush onto cellulose membranes via surface-initiated ARGET-ATRP for improving blood compatibility. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;103:52-58. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.025.
  63. Jung KO, Siegwart DJ, Lee H II, et al. Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: Synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *J Am Chem Soc.* 2007;129(7):5939-5945. doi:10.1021/ja069150l.
  64. Polanowski P, Jeszka JK, Matyjaszewski K. Synthesis of star polymers by “core-first” one-pot method via ATRP: Monte Carlo simulations. *Polymer (Guildf).* 2014;55(10):2552-2561. doi:10.1016/j.polymer.2014.03.049.
  65. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2001;40(11):2004-2021. doi:10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
  66. Fournier D, Hoogenboom R, Schubert US. Clicking polymers: a straightforward approach to novel macromolecular architectures. *Chem Soc Rev.* 2007;36(8):1369-1380. doi:10.1039/b700809k.
  67. Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2014;35(18):4969-4985. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.001.
  68. Golas PL, Matyjaszewski K. Marrying click chemistry with polymerization: expanding the scope of polymeric materials. *Chem Soc Rev.* 2010;39(4):1338-1354. doi:10.1039/b901978m.
  69. Koo H, Lee S, Na JH, et al. Bioorthogonal copper-free click chemistry inVivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(47):11836-11840. doi:10.1002/anie.201206703.
  70. Antonietti M, Landfester K. Polyreactions in Miniemulsions. *Prog Polym Sci.* 2002;27(4):689-757. doi:10.1016/S0079-6700(01)00051-X.
  71. Cao Z, Ziener U. Synthesis of nanostructured materials in inverse miniemulsions and their applications. *Nanoscale.* 2013;5(21):10093-10107. doi:10.1039/c3nr03190j.
  72. Landfester K, Willert M, Antonietti M. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules.* 2000;33(7):2370-2376. doi:10.1021/ma991782n.

73. Capek I. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2010;156(1-2):35-61. doi:10.1016/j.cis.2010.02.006.
74. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k.
75. Saunders BR, Laajam N, Daly E, Teow S, Hu X, Stepto R. Microgels: From responsive polymer colloids to biomaterials. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009;147-148(C):251-262. doi:10.1016/j.cis.2008.08.008.
76. Hu X, Tong Z, Lyon LA. Control of poly(N-isopropylacrylamide) microgel network structure by precipitation polymerization near the lower critical solution temperature. *Langmuir.* 2011;27(7):4142-4148. doi:10.1021/la200114s.
77. Cuggino JC, Alvarez I. Cl, Strumia MC, et al. Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications. *Soft Matter.* 2011;7(23):11259. doi:10.1039/c1sm06357j.
78. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release.* 1999;57(2):171-185. doi:10.1016/S0168-3659(98)00116-3.
79. Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, et al. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater.* 2010;9(7):572-578. doi:10.1038/nmat2819.
80. Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderón M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym Chem.* 2014;5(24):6909-6913. doi:10.1039/C4PY01186D.
81. Morimoto N, Hirano S, Takahashi H, Loethen S, Thompson DH, Akiyoshi K. Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. *Biomacromolecules.* 2013;14(1):56-63. doi:10.1021/bm301286h.
82. Biro A. Water politics and the construction of scale. *Stud Polit Econ.* 2007;83(80):9-30. doi:10.1002/bip.
83. Akiyoshi K, Kobayashi S, Shichibe S, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *J Control Release.* 1998;54(3):313-320. doi:10.1016/S0168-3659(98)00017-0.
84. Mateescu, M. A. ; Ispas-Szabo, P.; Assaad E. Self-assembling in natural, synthetic, and hybrid materials with applications in controlled drug delivery. In: *Controlled Drug Delivery.* ; 2015:163-223. doi:10.1016/B978-1-907568-45-9.00005-6.
85. Ramos J, Imaz A, Forcada J. Temperature-sensitive nanogels: poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide). *Polym Chem.* 2012;3:852-856. doi:10.1039/c2py00485b.
86. McPhee W, Tam KC, Pelton R. Poly(N-isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium DodecylSulfate. *J Colloid Interface Sci.* 1993;156:24-30. doi:10.1006/jcis.1993.1075.

87. Cai T, Marquez M, Hu Z. Monodisperse thermoresponsive microgels of poly(ethylene glycol) analogue-based biopolymers. *Langmuir*. 2007;23(17):8663-8666. doi:10.1021/la700923r.
88. Rimondino GN, Miceli E, Molina M, et al. Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions. *J Mater Chem B*. 2017;5(4):866-874. doi:10.1039/C6TB02001A.
89. Witting M, Molina M, Obst K, et al. Thermosensitive dendritic polyglycerol-based nanogels for cutaneous delivery of biomacromolecules. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11:1179-1187. doi:10.1016/j.nano.2015.02.017.
90. Quesada-Perez M, Ahualli S, Martin-Molina A. Temperature-sensitive nanogels in the presence of salt: Explicit coarse-grained simulations. *J Chem Phys*. 2014;141(12). doi:10.1063/1.4895960.
91. Steinhilber D, Witting M, Zhang X, et al. Surfactant free preparation of biodegradable dendritic polyglycerol nanogels by inverse nanoprecipitation for encapsulation and release of pharmaceutical biomacromolecules. *J Control Release*. 2013;169(3):289-295. doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.008.
92. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P. Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;71:86-97. doi:10.1016/j.addr.2013.12.009.
93. Giubudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderón M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym Chem*. 2014;5:6909-6913. doi:10.1039/C4PY01186D.
94. Liu D, Zhang H, Cito S, et al. Core/Shell Nanocomposites Produced by Superfast Sequential Microfluidic Nanoprecipitation. *Nano Lett*. 2017;17(2):606-614. doi:10.1021/acs.nanolett.6b03251.
95. Reisch A, Runser A, Arntz Y, Mély Y, Klymchenko AS. Charge-controlled nanoprecipitation as a modular approach to ultrasmall polymer nanocarriers: Making bright and stable nanoparticles. *ACS Nano*. 2015;9(5):5104-5116. doi:10.1021/acs.nano.5b00214.
96. Tan Y, Xu K, Li L, Liu C, Song C, Wang P. Fabrication of size-controlled starch-based nanospheres by nanoprecipitation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009;1(4):956-959. doi:10.1021/am900054f.
97. Geissler A, Biesalski M, Heinze T, Zhang K. Formation of nanostructured cellulose stearoyl esters via nanoprecipitation. *J Mater Chem A*. 2014;2(4):1107-1116. doi:10.1039/c3ta13937a.
98. Yan X, Ramos R, Hoibian E, et al. Nanoprecipitation of PHPMA (Co)Polymers into Nanocapsules Displaying Tunable Compositions, Dimensions, and Surface Properties. *ACS Macro Lett*. 2017:447-451. doi:10.1021/acsmacrolett.7b00094.
99. Ghandi SS, Yan H, Kim C. Thermoresponsive Gelatin Nanogels. *ACS Macro Lett*. 2014;3:1210-1214. doi:10.1021/mz500499q.

100. Wang Y, Nie J, Chang B, Sun Y, Yang W. Poly(vinylcaprolactam)-based biodegradable multiresponsive microgels for drug delivery. *Biomacromolecules*. 2013;14(9):3034-3046. doi:10.1021/bm401131w.
101. Madhusudana Rao K, Mallikarjuna B, Krishna Rao KS V, Siraj S, Chowdoji Rao K, Subha MCS. Novel thermo/pH sensitive nanogels composed from poly(N-vinylcaprolactam) for controlled release of an anticancer drug. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;102:891-897. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.009.
102. Molina M, Asadian-Birjand M, Balach J, Bergueiro J, Miceli E, Calderón M. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 2015;44(17):6161-6186. doi:10.1039/C5CS00199D.
103. Asadian-Birjand M, Bergueiro J, Rancan F, et al. Engineering thermoresponsive polyether-based nanogels for temperature dependent skin penetration. *Polym Chem*. 2015;6(32):5827-5831. doi:10.1039/C5PY00924C.
104. Asadian-Birjand M, Bergueiro J, Wedepohl S, Calderón M. Near Infrared Dye Conjugated Nanogels for Combined Photodynamic and Photothermal Therapies. *Macromol Biosci*. 2016:1-10. doi:10.1002/mabi.201600117.
105. Molina M, Wedepohl S, Calderón M. Polymeric near-infrared absorbing dendritic nanogels for efficient in vivo photothermal cancer therapy. *Nanoscale*. 2016;8(11):5852-5856. doi:10.1039/c5nr07587d.
106. Sahle FF, Giubudagian M, Bergueiro J, Lademann J, Calderón M. Dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide based thermoresponsive nanogels as smart carriers for controlled delivery of drugs through the hair follicle. *Nanoscale*. 2017;9(1):172-182. doi:10.1039/C6NR06435C.
107. Liu G, Cai M, Wang X, Zhou F, Liu W. Magnetite-Loaded Thermosensitive Nanogels for Bioinspired Lubrication and Multimodal Friction Control. *ACS Macro Lett*. 2016;5(1):144-148. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00860.
108. Zhou A, Luo H, Wang Q, Chen L, Zhang TC, Tao T. Magnetic thermoresponsive ionic nanogels as novel draw agents in forward osmosis. *RSC Adv*. 2015;5(20):15359-15365. doi:10.1039/C4RA12102C.
109. Socoliuc V, Vékás L, Turcu R. Magnetically induced phase condensation in an aqueous dispersion of magnetic nanogels. *Soft Matter*. 2013;9(11):3098-3105. doi:10.1039/c2sm27262h.
110. Liu J, Detrembleur C, Debuigne A, et al. Glucose-, pH- and thermo-responsive nanogels crosslinked by functional superparamagnetic maghemite nanoparticles as innovative drug delivery systems. *J Mater Chem B*. 2014;2(8):1009-1023. doi:10.1039/c3tb21272f.
111. Sun H, Yu J, Gong P, Xu D, Zhang C, Yao S. Novel core-shell magnetic nanogels synthesized in an emulsion-free aqueous system under UV irradiation for targeted radiopharmaceutical applications. *J Magn Magn Mater*. 2005;294(3):273-280. doi:10.1016/j.jmmm.2004.12.023.
112. Demarchi CA, Debrassi A, Buzzi FDC, et al. A magnetic nanogel based on O-carboxymethylchitosan for antitumor drug delivery: synthesis, characterization and in vitro

- drug release. *Soft Matter*. 2014;10(19):3441-3450. doi:10.1039/c3sm53157k.
113. Wang X, Niu D, Li P, et al. Dual-Enzyme-Loaded Multifunctional Hybrid Nanogel System for Pathological Responsive Ultrasound Imaging and T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *ACS Nano*. 2015;9(6):5646-5656. doi:10.1021/nn5068094.
  114. Chiang WH, Ho VT, Chen HH, et al. Superparamagnetic hollow hybrid nanogels as a potential guidable vehicle system of stimuli-mediated MR imaging and multiple cancer therapeutics. *Langmuir*. 2013;29(21):6434-6443. doi:10.1021/la4001957.
  115. Jiang L, Zhou Q, Mu K, et al. PH/temperature sensitive magnetic nanogels conjugated with Cy5.5-labeled lactoferrin for MR and fluorescence imaging of glioma in rats. *Biomaterials*. 2013;34(30):7418-7428. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.078.
  116. Bhattacharya S, Eckert F, Boyko V, Pich A. Temperature-, pH-, and magnetic-field-sensitive hybrid microgels. *Small*. 2007;3(4):650-657. doi:10.1002/smll.200600590.
  117. Pich A, Bhattacharya S, Lu Y, Boyko V, Adler HJP. Temperature-sensitive hybrid microgels with magnetic properties. *Langmuir*. 2004;20(24):10706-10711. doi:10.1021/la040084f.
  118. Castillo PM, de la Mata M, Casula MF, Sánchez-Alcázar JA, Zaderenko AP. PEGylated versus non-PEGylated magnetic nanoparticles as camptothecin delivery system. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5(1):1312-1319. doi:10.3762/bjnano.5.144.
  119. Wang H, Ke F, Mararenko A, Wei Z, Banerjee P, Zhou S. Responsive polymer-fluorescent carbon nanoparticle hybrid nanogels for optical temperature sensing, near-infrared light-responsive drug release, and tumor cell imaging. 2014;6(13):7443-7452. doi:10.1039/c4nr01030b.

## MOTIVACIÓN Y OBJETIVO GENERAL

El cáncer es una de las enfermedades más temidas y una gran amenaza para la vida humana. Entre los tratamientos que se realizan actualmente contra esta patología se encuentra la quimioterapia convencional que no siempre es exitosa. La misma proporciona el agente anticancerígeno tóxico indiscriminadamente tanto a tumores como a órganos y tejidos normales. Por lo tanto, el desarrollo de un nanodispositivo que permita la administración selectiva de fármacos en los tejidos enfermos y no en los sanos, resulta de gran interés ya que permitiría evitar efectos secundarios sistémicos indeseables.

Un nanodispositivo ideal para el tratamiento del cáncer, como ya se ha mencionado, debe cumplir, entre otras, las siguientes condiciones:

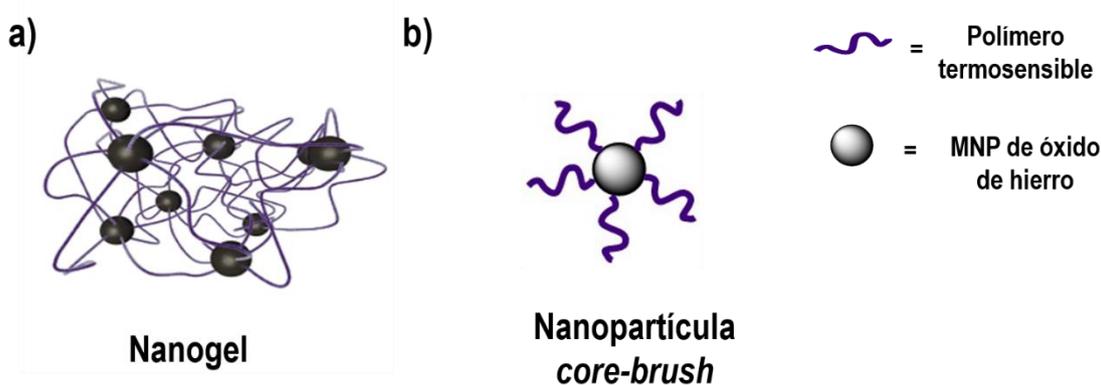
- Tamaños nanométricos que faciliten el proceso de evasión del sistema retículo endotelial (RES) y que permitan la permeabilidad mejorada y la retención de fármacos en tumores sólidos debido al efecto de permeación y retención mejorada (EPR).
- Capacidad para incorporar medicamentos que pueden ser liberados bajo la acción de un estímulo externo en una parte específica del cuerpo.
- Tener una superficie activa para permitir modificaciones post-sintéticas con grupos *targeting* a los fines de unirse a receptores específicos de membrana de las células tumorales.
- Capacidad de detección y captura de células circulantes de metástasis.

En este contexto y frente a la necesidad de conocer cómo las diferentes metodologías sintéticas afectan la eficiencia de nanodispositivos en su capacidad de administrar de forma selectiva un fármaco anticancerígeno o bien la posibilidad de ser utilizados para terapia guiada o en el tratamiento por hipertermia, se realizó este trabajo de tesis doctoral.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar distintas metodologías de síntesis para el diseño racional de nanodispositivos híbridos, formados por nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y un polímero termosensible. Se eligieron nanopartículas de magnetita debido a que presentan varias ventajas como su biocompatibilidad, su comportamiento superparamagnético, adicionalmente, éstas ya han sido aprobadas por la FDA para el uso en humanos como agentes de contraste para IRM. Por otro lado, la motivación principal para la utilización de un polímero termosensible radica en que el polímero puede sufrir un cambio conformacional en respuesta a la temperatura. Así, si la temperatura de transición de fase de estos polímeros se regula para que sea alrededor de 39-40°C, los nanodispositivos podrían circular por los vasos sanguíneos, cuya temperatura es de 37°C, y luego precipitar en el tejido tumoral donde su temperatura es aproximadamente de 42°C, liberando el fármaco de su interior. Por último, el combinar de forma

sinérgica tanto las características del polímero como las propias de las nanopartículas magnéticas posibilita su empleo en el campo de la teragnosis logrando así crear un nanodispositivo con multirespuesta para su uso tanto en el diagnóstico y seguimiento, como en el tratamiento del cáncer. Como metodología de síntesis de los nanodispositivos se decidió emplear polimerización radicalaria (controlada y no controlada) y química *click*.

A partir de este objetivo planteado, la investigación abordó el estudio de dos nanodispositivos con distinta morfología. Por un lado, la obtención de nanogeles magnéticos y termosensibles y por otro, la de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush* como se esquematiza en la Figura 2.13 (a y b).



**Figura 2.13** Esquema de los sistemas estudiados en el transcurso de esta tesis doctoral.

En la primera parte, para la obtención de los nanogeles magnéticos y termosensibles, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Sinterizar nanogeles termosensibles utilizando como metodología la ultrasonificación. Caracterizar y realizar estudios biológicos.
- Obtener nanogeles magnéticos y termosensibles mediante síntesis asistida por ultrasonificación. Caracterizar y evaluar los mismos como agente de contraste y nanotransportadores.
- Sintetizar nanogeles magnéticos y termosensibles mediante química *click*, empleando nanoprecipitación asistida por ultrasonificación como metodología de síntesis. Caracterizar y evaluar potenciales aplicaciones de los sistemas en nanomedicina.

Para el desarrollo de la segunda parte, la obtención de las nanopartículas magnéticas tipo *core-brush*, se planearon los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush* utilizando *ATRP*.
- Sintetizar de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush* mediante *química click*.

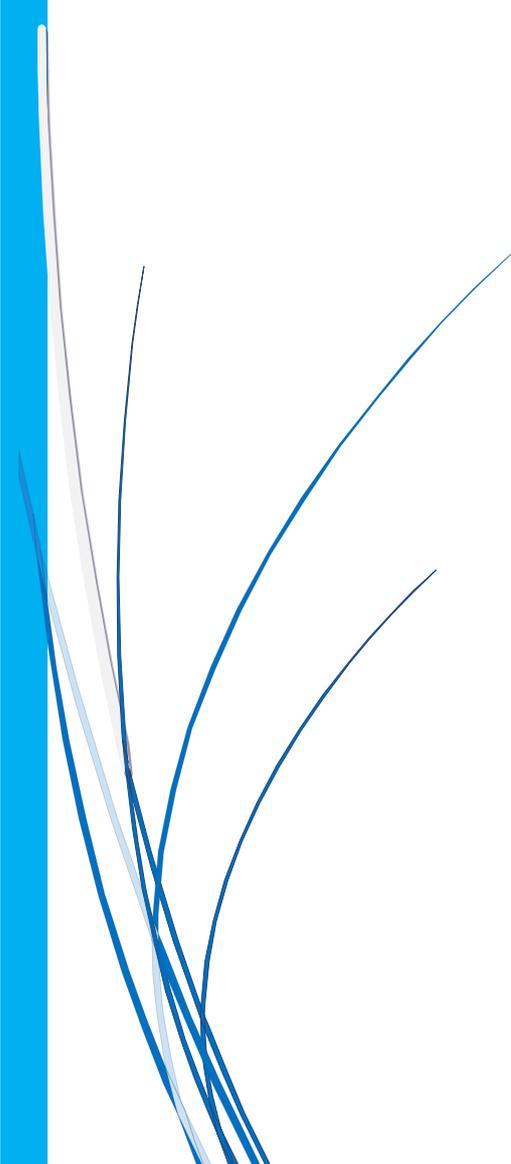
El desarrollo de esta Tesis se realizó en el marco de un proyecto bilateral de colaboración internacional entre Argentina y Alemania (Conicet/DFG) con el grupo del Dr. Marcelo Calderón de la Universidad Libre de Berlín y becas de The Integrated Research Training Group (IRTG) of the CRC 1112 y del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD). El mismo involucró un trabajo no sólo sintético sino también más integral, donde interactúan fuertemente distintas áreas de la ciencia, como la química (química orgánica tradicional, la fisicoquímica de superficies e interfaces), la física, la biología, la nanotecnología y la medicina. Por esta razón, se ha enfatizado el abordaje interdisciplinario de los sistemas estudiados, pudiendo emplear distintas estrategias sintéticas y una amplia gama de técnicas.

Con este trabajo se espera contribuir a la obtención de distintos nanodispositivos híbridos que posibiliten o ayuden a superar los desafíos y problemas que enfrenta la medicina convencional, demostrando la ventaja de combinar dos estímulos como la temperatura y el campo magnético en el diseño racional del nanodispositivo.



## **SECCIÓN 2**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





# **C**apítulo 3

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 MATERIALES

Los solventes adquiridos fueron de grado reactivo y se destilaron si era necesario. Los reactivos empleados fueron di(etilenglicol) metil éter metacrilato (MEO<sub>2</sub>MA, 95%, Sigma Aldrich), oligo(etilenglicol) metil eter metacrilato (Mn 475 g/mol, OEGMA, Sigma Aldrich), 2-hidroxietil eter metacrilato (HEMA, Sigma Aldrich), tetra(etilenglicol) dimetacrilato (TEGDMA, Sigma Aldrich), dodecil sulfato de sodio (SDS, Biopack), persulfato de amonio (APS, Anedra), tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma Aldrich), rodamina B (RhB, Sigma Aldrich), Cloroformo-d (CDCl<sub>3</sub>, Sigma Aldrich), agua deuterada (D<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich), dimetilformamida (DMF, Sigma Aldrich), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, Sigma Aldrich), metanol (MeOH, Sintorgan), Glicidil metil éter (GME) (85%, TCI Europe, Eschborn, Alemania), etil glicidil éter (EGE) (98%, TCI Europe), Trietilamina (TEA, 99% Acros), cloruro férrico hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O, 99% Grüssing), cloruro ferroso tetrahidratado (FeCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, 99% Grüssing), hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH, 25% Roth), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, ≥65% Roth), ácido pícrico (1,3% en agua, Sigma Aldrich), acetona seca (99 % Acros), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES, 99% Sigma Aldrich), 3 (metacriloxi)propil trimetoxisilano, (MEMO, 98 % Sigma Aldrich), 3 cloropropil trimetoxisilano, (CPE), 98 % Sigma Aldrich), bromuro de 2-bromoisobutirilo (Sigma Aldrich), (1R, 8S, 9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il-metil (4-nitrofenil) carbonatop(BCN-PNP), cloruro de dansilo (≥99% Sigma Aldrich), transferrina humana (Sigma Aldrich), azida-dPEG<sup>TM</sup><sub>12</sub>-NHS éster (Creosalus), azida-dPEG<sup>TM</sup><sub>8</sub>-NHS éster (Creosalus), azida-dPEG<sup>TM</sup><sub>4</sub>-NHS éster (Creosalus), 1,1,4,7,10,10-Hexametiltriellentetramina (HMTETA, 97 % Sigma Aldrich), 2,2'-bipiridina (BPy, 97 % Sigma Aldrich), cloruro cuproso (CuCl, 99 % Sigma Aldrich), cloruro cúprico (CuCl<sub>2</sub>, 99 % Sigma Aldrich), metacrilato de metilo (MMA, 98 % Sigma Aldrich), Tetrahidrofurano seco (THF, 99 % Acros), cloruro de metansulfonilo (98 % Sigma Aldrich), azida de sodio (Across), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>, Acros), éter etílico (Acros), etanol absoluto (Sinorgan), doxorrubicina clorhidrato (DOX.HCl, Sigma Aldrich) .

## 3.2 METODOLOGÍAS

### 3.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas (MNP)

Para llevar a cabo la síntesis de las MNP se basó en la técnica de coprecipitación de sales de hierro.<sup>1</sup> Se colocaron las dos sales,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (16.136 g) y  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (5.556 g) en un balón de 250 mL junto con 130 mL de agua MilliQ. Se agregaron gota a gota 70 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3 M) y se dejó bajo agitación magnética durante 15 minutos. Luego, las nanopartículas fueron separadas magnéticamente, se descartó el sobrenadante. Las MNPs fueron resuspendidas en 20 mL de  $\text{HNO}_3$  (2 M) y se agitó durante 15 minutos. Para purificar se realizaron 3 lavados con acetona, uno con etanol, y dos lavados con agua para dejarlas suspendidas finalmente en agua para posteriores análisis.

### 3.2.2 Síntesis de dansilazida

Para llevar a cabo la síntesis de dansilazida se siguió el protocolo descrito por Peng y colaboradores<sup>2</sup>. De manera general, se suspendieron 250 mg (0,93 mmol) de cloruro de dansilo en 15 mL de etanol absoluto y se le agregó gota a gota 125 mg (1,92 mmol) de  $\text{NaN}_3$  disueltos en 7 mL de una mezcla etanol:agua (40:60) bajo campana. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 h. Se extrajo el crudo de reacción con éter etílico y se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se purificó mediante cromatografía en columna con sílica gel utilizando como fase móvil diclorometano. El producto se caracterizó mediante IR y RMN  $^1\text{H}$ .

### 3.2.3 Modificación superficial de MNPs

#### 3.2.3.1 Funcionalización con grupos vinilo

Para realizar la funcionalización superficial de las nanopartículas, se siguió el protocolo reportado por Bloemen y colaboradores<sup>3</sup> con algunas modificaciones. Brevemente, se suspendieron 50 mg de MNPs en 26 mL de una mezcla  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1). Luego se agregaron 2 mL de MEMO y la dispersión resultante se sonicó 5 veces durante 2 minutos con un ultrasonicador (70 % potencia, sonicador de punta Bandelin UW 2070 o Omni-Ruptor 400). El crudo de reacción se purificó mediante separación magnética y se lavó 3 veces con acetona. Finalmente, las  $\text{MNP@MEMO}$  fueron resuspendidas en agua y se caracterizaron mediante FT-IR, TEM.

#### 3.2.3.2 Funcionalización con grupos amino

Se suspendieron 50 mg de MNPs en 26 mL de una mezcla  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1). Luego se agregaron 2 mL de APTES y la dispersión resultante se sonicó 5 veces durante 2 minutos con un ultrasonicador (70 % potencia, sonicador de punta Bandelin UW 2070 o Omni-Ruptor 400). El

crudo de reacción se purificó mediante separación magnética y se lavó 3 veces con acetona. Finalmente, las MNP@APTES fueron resuspendidas en DMF y se caracterizaron mediante FT-IR, TEM.

Para realizar la cuantificación de los grupos amino se siguió el protocolo reportado por Wang y colaboradores<sup>4</sup>. Primero, se midió la absorbancia a la longitud de onda máxima, 430 nm mediante espectrofotometría UV-visible de una solución de ácido pícrico  $5,674 \times 10^{-5}$  M. 1 mL de esta solución se puso en contacto con 300  $\mu$ L de la solución de MNP@APTES. Luego de media hora, las MNP@APTES se recolectaron con un imán y se midió la absorbancia del sobrenadante nuevamente a 430 nm.

### 3.2.3.3 Funcionalización con grupos BCN

Se disolvieron 2 mg de BCN-PNP en 20 mL de una dispersión de MNP@APTES en DMF. Luego se agregaron 200  $\mu$ L de TEA y se agitó durante 6 h. El crudo de reacción se purificó mediante separación magnética y se lavó 3 veces con acetona. Finalmente, las MNP@APTES fueron resuspendidas en DMF y se caracterizaron mediante FT-IR, TEM.

Para realizar la cuantificación de los grupos BCN se conjugaron las MNP@BCN con el colorante dansilazida. Primero, se midió la absorbancia a 362 nm mediante espectrofotometría UV-visible de una solución de dansilazida (0,18 mM, DMF). 1 mL de esta solución se puso en contacto con 300  $\mu$ L de la solución de MNP@BCN. Luego de media hora, las MNP@BCN se recolectaron con un imán y se midió la absorbancia del sobrenadante nuevamente a 362 nm.

### 3.2.3.4 Funcionalización con grupos halógeno

#### 3.2.3.4.1 Funcionalización con grupos cloruro

Para llevar a cabo la silanización se disolvieron 50 mg de MNPs en 26 mL de una mezcla EtOH:agua (1:1). Luego se agregó una cantidad determinada de 3 cloropropil trimetoxisilano (CPM). La mezcla se sonicó 5 veces durante 2 minutos con un ultrasonificador en punta (70 % potencia, sonicador en punta Omni-Ruptor 400). La purificación se llevó a cabo mediante 3 lavados con acetona para finalmente resuspenderlas en etanol.

#### 3.2.3.4.2 Funcionalización con grupos bromuro

En una primera instancia se llevó a cabo la modificación superficial de las MNP con APTES como se describió en la sección 3.2.3.2. En una segunda etapa, se modificaron los grupos amino con bromuro de 2-bromoisobutirilo siguiendo el protocolo reportado por Liu y colaboradores<sup>5</sup>. De manera general, 100 mg de MNP@APTES, 143  $\mu$ L de TEA y 2,4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro se colocaron en un balón de 5 mL. La mezcla se mantuvo bajo agitación en baño de hielo y se

agregaron gota a gota 109,5  $\mu\text{L}$  de bromuro de 2-bromoisobutirilo. Se dejó reaccionar 12 h bajo atmósfera inerte. Las MNPs se purificaron mediante separación magnética y lavados con acetona.

### 3.2.4 Síntesis de poliglicerol termosensible (tPG)

#### 3.2.4.1 Síntesis de poliglicerol, Br-tPG-OH (5,10,15 kDa)

La síntesis de los polímeros lineales termosensibles se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Giulbudagian y colaboradores<sup>6</sup>. A continuación, se describe el método general de síntesis de Br-tPG-OH (5 kDa, relación 1:1 de monómeros): Las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte en un tubo de Schlenk, el cual fue secado mediante ciclos de Ar y flameo antes del agregado de los reactantes al mismo.

En una primera instancia, se adicionaron al tubo de Schlenk 0,2297 g (0,42 mmol, 1 eq.) de NOct4Br junto con el agitador magnético y se secó el sólido bajo vacío a 70 °C. Luego, se agregaron 22 mL de tolueno anhidro, 0,88 g de GME (10 mmol), 1,02 g (10 mmol) de EGE y se enfrió a 0 °C para de este modo evitar la precipitación de la sal de amonio. La polimerización fue activada mediante el agregado de 1,44 mL de una solución 1 M de *i*-Bu<sub>3</sub>Al (1,54 mmol), y se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante el agregado de EtOH (0,015 mL) y se purificó mediante diálisis a temperatura ambiente con una membrana de 2 kDa MWCO en tolueno por 72 h. Rendimiento 1,67 g, 83 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3,89-3,94 (m, 1H, OH terminal), 3,39-3,71 (m, 409 H, esqueleto del polímero), 3,33 (s, 105 H, -OCH<sub>3</sub>), 1,16 (t, 82 H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). FT-IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2870, 1456, 1198, 1103, 961, 930, 872. GPC: Mn = 4746 g mol<sup>-1</sup>, Mw = 5175 g mol<sup>-1</sup>, Mz = 5586 g mol<sup>-1</sup>, PDI = 1,09

#### 3.2.4.2 Síntesis de poliglicerol monoazidado, tPG-N<sub>3</sub> (10 kDa)

Se pesaron 0,9088 g (0,091 mmol) de Br-tPG<sub>10kDa</sub>-OH y se disolvieron en 10 mL de DMF seca. Se agregaron 0,0710 g (1,1 mmol) de NaN<sub>3</sub> formándose una suspensión, la cual se dejó reaccionar a 85 °C por 3 días bajo agitación magnética. La sal amarronada se eliminó mediante filtración y el producto obtenido se dializó (membrana 2 kDa MWCO) en metanol por 1 día. El solvente se evaporó para obtener el producto seco. Rendimiento 0,4025 g (89%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  (ppm): 3,89-3,94 (m, 1H, OH terminal), 3,39- 3,71 (m, 409H, esqueleto del polímero), 3,33 (s, 105H, -OCH<sub>3</sub>), 3,09 (m, 3H, -SO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,16 (t, 82H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

#### 3.2.4.3 Síntesis de poliglicerol diazidado, N<sub>3</sub>-tPG-N<sub>3</sub> (5,15 kDa)

Primero se realizó la mesilación del Br-tPG<sub>5kDa</sub>-OH. Para ello, en un balón se secaron 1 g (0,2 mmol) de Br-tPG<sub>5kDa</sub>-OH a 110 °C y en vacío. Se disolvieron en 7 mL de THF seco, se agregaron 404 mg de TEA (4 mmol) y se colocó en un baño de hielo. Luego se agregaron 229 mg

(2 mmol) de cloruro de metansulfonilo gota a gota y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 h. La sal de amonio se removió mediante filtración y se purificó mediante diálisis (membrana 2 kDa MWCO) en metanol por 1 día y se evaporó el solvente a presión reducida. Rendimiento: 856 mg (86 %); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.39-3.71 (m, 409 H, esqueleto del polímero), 3.33 (s, 105 H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.09 (m, 3H,  $-\text{SO}_3-\text{CH}_3$ ), 1.16 (t, 82 H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). FT-IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2871, 1456, 1198, 1108, 963, 930.

Finalmente, se disolvieron 800 mg (0,16 mmol) del tPG mesilado en 7 mL de DMF anhidra, se agregaron 208 mg (3,2 mmol) de  $\text{NaN}_3$  y se agitó la suspensión a 60 °C durante tres días de acuerdo a lo reportado por Roller y colaboradores<sup>7</sup>. Una vez filtrada la sal, el crudo de reacción se purificó mediante diálisis (membrana 2 kDa MWCO) en metanol durante dos días y se evaporó el solvente a presión reducida.

### 3.2.5 Conjugación de transferrina (Tf) al espaciador derivado de PEG

Para realizar la conjugación de la transferrina, se utilizaron tres espaciadores del tipo  $\text{N}_3\text{-PEG}_n\text{-NHS}$  con distintos largos de cadena  $n=4, 8$  y  $12$ . Asimismo, se utilizaron 5 diferentes relaciones Tf:espaciador: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20. Para ello, en 5 mL de agua MilliQ se mezclaron 25 mg ( $3,16 \times 10^{-4}$  mmol) de transferrina humana junto con la cantidad correspondiente del espaciador. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Los conjugados Tf- $\text{PEG}_n\text{-N}_3$  obtenidos se purificaron mediante diálisis (membrana 50 kDa MWCO) en agua durante tres días y se liofilizaron. La caracterización de los conjugados se realizó mediante espectrometría MALDI-TOF, DC y RMN  $^1\text{H}$ .

### 3.2.6 Síntesis de nanogeles

#### 3.2.6.1 Síntesis asistida por ultrasonificación de nanogeles (NG)

De manera general, se colocaron los monómeros  $\text{MEO}_2\text{MA}$ , OEGMA (1 mmol), el comonómero HEMA, el entrecruzante TEGDMA (1,5 mol%), en 10 mL de agua destilada. Luego, se agregaron el surfactante SDS (1,6 mol%), el iniciador APS (1,6 mol%) y el activador TEMED (0,3 mL, 0,25 M). La solución se calentó a 60 °C y se ultrasonificó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia durante el tiempo de reacción (sonicador en punta Omni-Ruptor 400). Los nanogeles fueron purificados mediante diálisis en agua durante 3 días a temperatura ambiente utilizando una membrana con MWCO 50 kDa. En la Tabla 3.1 se describen las distintas condiciones estudiadas.

**Tabla 3.1** Condiciones de síntesis de los distintos nanogeles.

Muestra	Relación molar MEO <sub>2</sub> MA:OEGMA	HEMA	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	TEMED			
1	9:1	4 %	180	60	SI			
2			120					
3			90					
4			60					
5			30					
6			15	60		60	NO	
7								50
8								40
9								Tamb
10								
NG 1	6 : 4	4 %	15	60	SI			
NG 2	7 : 3	4 %	30					
NG 3	7 : 3	4 %	15					
NG 4	8 : 2	4 %	30					
NG 5	8 : 2	4 %	15					
NG 6	8 : 2	8 %	15					
NG 7	9 : 1	4 %	15					

### 3.2.6.2 Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles magnéticos (MNG)

De manera general, se colocaron los monómeros MEO<sub>2</sub>MA, OEGMA (1 mmol), el comonómero HEMA y las nanopartículas magnéticas (MNP@MEMO) en 10 mL de agua destilada. Luego, se agregaron el surfactante SDS (1,6 mol%), el iniciador APS (1,6 mol%) y el activador TEMED (0,3 mL, 0,25 M). La solución se calentó a 60 °C y se ultrasonicó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia durante el tiempo de reacción (Sonicador en punta Omni-Ruptor 400 o Bandelin UW 2070). Los nanogeles fueron purificados mediante separación magnética y posterior diálisis en agua durante 3 días a temperatura ambiente utilizando una membrana con MWCO 50 kDa. En la Tabla 3.2 se describen las distintas condiciones estudiadas para la síntesis de los MNG.

**Tabla 3.2** Condiciones de síntesis de MNGs.

Muestra	Relación molar MEO <sub>2</sub> MA:OEGMA	MNP@MEMO (mg)
MNG 1	8 : 2	0,6
MNG 2	8 : 2	1,5
MNG 3	8 : 2	2,3
MNG 4	8 : 2	3,0
MNG 5	7 : 3	1,5
MNG 6	9 : 1	
MNG 7	9,5 : 0,5	
MNG 8	10:0	

### 3.2.6.3 Síntesis asistida por ultrasonicación de nanogeles magnéticos mediante química *click*

Para la síntesis de MNGs mediante química *click*, se calentaron 20 mL de agua MilliQ a 50 °C en un frasco de 30 mL. Por otra parte, se preparó una solución de DMF con volumen final 1 mL conteniendo las MNP@BCN y el polímero N<sub>3</sub>-tPG-N<sub>3</sub> de 10 KDa y se enfrió en un baño de hielo. Esta mezcla se inyectó en los 20 mL de agua y se ultrasonicó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia en los 15 minutos de reacción (Sonicador en punta Bandelin UW 2070). Entre cada ultrasonicación, el crudo de reacción se agitó magnéticamente. El producto se purificó mediante 3 lavados con acetona y separación magnética. Los mismos se caracterizaron mediante FT-IR, NTA, TEM, DLS y TGA.

#### 3.2.6.4 Síntesis asistida por ultrasonificación de nanogeles magnéticos decorados con transferrina (MNG@Tf)

Para la síntesis de los MNG@Tf, se calentaron 20 mL de agua MilliQ a 50 °C en un frasco de 30 mL. Por otra parte, se preparó una solución de DMF con volumen final 1 mL conteniendo tanto las MNP@BCN como el polímero N<sub>3</sub>-tPG-N<sub>3</sub> y se enfrió en un baño de hielo. Esta mezcla se inyectó en los 20 mL de agua y se ultrasonificó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia en los 15 minutos de reacción (Sonicador en punta Bandelin UW 2070). Entre cada ultrasonificación, el crudo de reacción se agitó magnéticamente. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se inyectó el conjugado, Tf-PEG<sub>n</sub>-N<sub>3</sub>. El producto se purificó mediante 3 lavados con acetona y separación magnética. La Tabla 3.1 muestra las distintas condiciones de reacción para cada MNG@Tf sintetizado. Los mismos se caracterizaron mediante IR, NTA, TEM, DLS y medidas de magnetización. La cuantificación de Tf en los nanogeles se obtuvo a través del ensayo de Bradford. En la Tabla 3.3 se describen las distintas condiciones estudiadas para la síntesis de los MNG@Tf.

Tabla 3.3. Condiciones de síntesis de los distintos MNG@Tf.

Muestra	N3-tPG-N3			Tf-PEG <sub>n</sub> -N <sub>3</sub>			Dispersión de MNP@BCN (μL)
	KDa	μmol	mg	n	Relación Tf-espaciador	nmol	
MNG@Tf 1	5	2	10	-	-	63	500
MNG@Tf 2				4	1:1		
MNG@Tf 3				8			
MNG@Tf 4				12			
MNG@Tf 5				4	1:3		
MNG@Tf 6				8			
MNG@Tf 7				12			
MNG@Tf 8				4	1:5		
MNG@Tf 9				8			
MNG@Tf 10				12			
MNG@Tf 11				4	1:9		
MNG@Tf 12				8			
MNG@Tf 13				12			
MNG@Tf 14			15		30		

### 3.2.7 Modificación de nanogeles con rodamina B

La modificación de los nanogeles con RhB se realizó mediante la formación de un éster entre los grupos hidroxilo del NG y los ácidos carboxílicos de la RhB. Se suspendieron 7,5 mg de nanogel en 200 μL de DMF seca. Por otro lado, en 300 μL de DMF se disolvieron 4,2 μmol de RhB, 6,44 μmol de EDC y 5,25 μmol de DMAP y se agitó la solución resultante durante 10 min. Finalmente se mezclaron ambas soluciones y se dejó reaccionar bajo agitación durante 16 h. Los nanogeles modificados se purificaron mediante diálisis, primero en una solución metanol:agua (1:1) y luego durante 5 días en agua con una membrana con MWCO 50 kDa. Los nanogeles se almacenaron en el freezer y la cantidad de colorante se determinó mediante espectroscopía UV visible (MeOH, 1 mg/mL,  $\lambda_{\max}$  = 561 nm,  $\epsilon$  =  $1,15 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### 3.2.8 Síntesis de nanopartículas *core-brush*

#### 3.2.8.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas *core-brush* mediante ATRP

##### 3.2.8.1.1 Síntesis mediante ATRP en solución

En un balón de 3 bocas se colocaron etanol, los monómeros, el ligando HMTETA y las MNP bajo vigorosa agitación. Se burbujeó con nitrógeno durante 10 minutos. Luego se agregaron el Cu (II) y Cu (I) bajo corriente positiva de nitrógeno. Se dejaron reaccionar durante el tiempo de reacción bajo agitación a temperatura ambiente. En todos los casos se agregaron 36,13  $\mu\text{mol}$  de Cu (I), Cu (II), HMTETA y se llevó a volumen final de 25 mL con etanol. Para purificar se realizaron dos lavados con etanol y luego dos lavados con agua para dejarlas suspendidas finalmente en agua para posteriores análisis.

##### 3.2.8.1.2 Síntesis mediante ATRP en masa

Para llevar a cabo la síntesis se siguió el protocolo reportado por Fan y colaboradores<sup>8</sup>. En un balón se colocaron el monómero y las MNP@X bajo vigorosa agitación. Se burbujeó con nitrógeno durante 10 minutos. Luego se agregaron el Cu (II) y Cu (I) con el ligando correspondiente ya sea HMTETA o BPy. Se deja reaccionar durante 18 h de reacción bajo agitación a 30°C. Para purificar se realizaron dos lavados con etanol y luego dos lavados con agua para dejarlas suspendidas finalmente en agua para posteriores análisis.

#### 3.2.8.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas *core-brush* mediante química *click* y ultrasonicación

Para la síntesis de las MNPs tipo *core-brush* mediante química *click*, se calentaron 20 mL de agua MilliQ a 50 °C en un frasco de 30 mL. Por otra parte, se preparó una solución en DMF con volumen final 1 mL conteniendo tanto las MNP@BCN (500  $\mu\text{L}$ ) como el polímero tPG-N<sub>3</sub> de 10 KDa (2  $\mu\text{mol}$ ) y se enfrió en un baño de hielo. Esta mezcla se inyectó en los 20 mL de agua y se ultrasonicó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia en los 15 minutos de reacción (Sonicador en punta Bandelin UW 2070). Entre cada ultrasonicación, el crudo de reacción se agitó magnéticamente. El producto se purificó mediante 3 lavados con acetona y separación magnética. Los mismos se caracterizaron mediante IR, NTA, TEM, DLS y TGA.

### 3.2.9 Caracterización

#### 3.2.9.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los estudios de IR de transmitancia y reflectancia se llevaron a cabo usando o un espectrofotómetro JASCO FT-IR 4100 o un microscopio FT-IR NICOLET IN, en el rango 4000 –

500  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 32 barridos promediados. Para el procesamiento de los espectros obtenidos se empleó el programa OMNIC 8.3.

#### 3.2.9.2 Espectroscopia de resonancia magnética de protones (RMN $^1\text{H}$ )

Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Jeol ECX 400, operado a 400 MHz a 25°C utilizando como solvente agua deuterada o cloroformo deuterado según correspondiera. Para el análisis de los resultados obtenidos se usó el programa MestreC. Los espectros fueron calibrados usando la señal residual del solvente, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) relativos a TMS.

#### 3.2.9.3 Análisis termogravimétricos (TGA)

Los estudios de TGA fueron realizados en un analizador Shimadzu DTG-60 (Japan) en el rango de temperaturas comprendidos en  $T_{amb}$  y 800 °C, empleando una rampa de calentamiento de 10 °C/min, con flujo de nitrógeno. Se utilizaron entre 1-10 mg de la muestra a analizar. Para graficar y procesar los datos se emplearon los programas GraphPad Prism 6 y OriginPro 8.0.

#### 3.2.9.4 Espectrofotometría UV-visible

Las mediciones se efectuaron en espectrofotómetros Shimadzu MultiSpect 1501 y 1800. Los espectros fueron adquiridos entre 200-800 nm a 25 °C con velocidad media de barrido, utilizando celdas de cuarzo o plástico según correspondiera con paso óptico de 1 cm. Para graficar y procesar los datos se emplearon los programas GraphPad Prism 6 y OriginPro 8.0.

#### 3.2.9.5 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Los experimentos de DLS fueron llevados a cabo utilizando un Malvern Zetasizer Nano-ZS 90 (Malvern Instruments), equipado con un láser He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) y ángulo de dispersión de 173°. Los tamaños de partículas y la distribución de tamaños se obtienen del promedio de 3 mediciones de las curvas de distribución de intensidad. La temperatura de transición de fase se midió a diversas temperaturas que oscilaban entre 15 y 80°C mediante dispersión dinámica de la luz. Los valores de potencial zeta se midieron aplicando un campo eléctrico a través de las soluciones de muestra utilizando la técnica de anemometría láser Doppler.

#### 3.2.9.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)

Las imágenes TEM y SEM se realizaron en un microscopio electrónico Hitachi Scanning Electron Microscope (SU8030) (20 kV) en el modo TEM o SEM (Universidad Libre de Berlín,) o bien un Microscopio electrónico JEOL EXII operado a 80 kV. Las muestras fueron preparadas

sobre grillas de cobre (200 mesh, QUANTIFOIL) depositando 2  $\mu\text{L}$  de la solución que contenía la muestra.

### 3.2.9.7 Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes AFM se registraron en aire bajo condiciones ambientales, con un equipo MultiMode 8 AFM equipado con un controlador Nanoscope V de Veeco Instruments, Santa Barbara, California (Universidad Libre de Berlín). Se depositaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución de 0,1 mg/mL del NG en mica escindida y se mantuvo durante aproximadamente 3 min. Después de ese tiempo, el líquido se retiró cuidadosamente con papel de filtro. Los análisis estadísticos se realizaron con ImageJ en una región de 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.9.8 Medidas de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Las medidas de NTA se realizaron en un equipo Malvern NanoSight NS500 equipado con una cámara SCMOS y con un láser de 635 nm bajo un ángulo de dispersión de 100 ° a 25 ° C (Universidad Libre de Berlín). La captura de vídeo se ha realizado con un nivel de cámara, un obturador deslizante y una ganancia de deslizamiento establecida en 13, 800 y 350, respectivamente. Para cada muestra se registraron 3 tramas de video por 30 segundos con 25 FPS. El análisis de los datos se ha realizado utilizando el software NTA 3.0 0064.

### 3.2.9.9 Experimentos de turbidimetría

Se midieron las temperaturas de transición de fase ( $T_{\text{tr}}$ ) en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Vis equipado con una cámara de muestra de 6 posiciones con temperatura controlada (Universidad Libre de Berlín). Las soluciones acuosas medidas se calentaron a 0,2 °C/min mientras se monitoreaba tanto la transmitancia (% T) a 500 nm (1 cm de paso óptico) como la temperatura de la solución (de 23 a 70°C) determinada por la sonda de temperatura interna. Para graficar y procesar los datos se empleó el programa GraphPad Prism 6. La  $T_{\text{tr}}$  de cada muestra se determinó usando el mínimo de la primera derivada del gráfico % T vs temperatura. Se realizaron 3 ciclos de enfriamiento-calentamiento para cada medición.

### 3.2.9.10 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los estudios se efectuaron en un equipo MALDI-Mass Spectrometry (Bruker Ultraflex II TOF/TOF) (Universidad Libre de Berlín).

### 3.2.9.11 Cromatografía de permeación de gel (GPC)

Las distribuciones de peso molecular (PM) se determinaron por medidas de GPC acoplado a un detector de índice de refracción (RID), para obtener la distribución de pesos completa ( $M_n$ ),

Mp, Mw, PDI) (Universidad Libre de Berlín). Las medidas se realizaron en condiciones de alta dilución (10 mg/mL, volumen inyectado 5  $\mu$ L), en un GPC que consiste en un sistema de entrega de solvente con bomba Agilent 1100, inyector manual, y un refractómetro diferencial Agilent. Para la separación se utilizaron 3 columnas (PPS: Estándar Polymer Standards Service GmbH, Alemania; Suprema 100 Å, 1000 Å, 3000 Å con tamaños de partícula de 5 y 10  $\mu$ m), empleándose muestras acuosas de los polímeros con 0,05 % de NaN<sub>3</sub> como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. Las columnas se operaron a temperatura ambiente, mientras que el RID se operó a 50 °C. La calibración se realizó usando pululano como estándar interno y calibración estándar lineal (PPS). La adquisición e interpretación de los datos se realizó con el programa WinGPC.

#### 3.2.9.12 Dicroísmo circular (CD)

Las muestras se analizaron en buffer fosfato 10 mM (pH 7,4). Los espectros de dicroísmo circular (CD por sus siglas en inglés) de ultravioleta lejano (UV) se registraron en un espectropolarímetro J-810 (Jasco GmbH) equipado con una celda de cuarzo de temperatura controlada de 0,1 cm de paso óptico (Universidad Libre de Berlín). Los espectros registrados se evaluaron con el paquete de software Jasco. Los espectros fueron promediados a partir de tres medidas recogiendo datos de 190 a 240 nm a intervalos de 0,2 nm, 2 nm de ancho de banda y 1 s de tiempo de respuesta.

#### 3.2.9.13 Caracterización magnética

##### 3.2.9.13.1 Estudios de magnetización

Las mediciones de magnetización de las distintas muestras se realizaron utilizando un equipo Magnetic Property Measurement (5T-MPMS, Quantum Design) equipado con un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) (Helmholtz-Zentrum Berlin). El rango de campo de -20000 a 20000 Oe y en el rango de temperatura de 300 a 323 K.

##### 3.2.9.13.2 Imágenes de resonancia magnética (IRM)

Las imágenes IRM y el tiempo de relajación T<sub>2</sub> de las distintas muestras se adquirieron usando un equipo Bruker 7T BioSpec (Bruker, Alemania) con un Resonador de Volumen de 20 mm de Cuadratura (Rapid Biomed) (Helmholtz-Zentrum Berlin). El contenido de iones metálicos (Fe) en los MNG se estimó a partir de la cantidad utilizada para la síntesis y los rendimientos del MNG después del tratamiento magnético. Antes de la medición, se fijaron MNGs en diferentes concentraciones en gel de agarosa al 1 %. Las imágenes ponderadas en T<sub>2</sub> fueron adquiridas usando técnicas convencionales de adquisición de eco de spin (TR = 2.000 ms) con valores de TE

entre 6 y 260 ms. La relajación,  $r_2$ , se calculó a partir del ajuste de la curva de las tasas de relajación medidas  $T_2$  ( $R_2 = 1 / T_2$ ,  $s^{-1}$ ) en función de la concentración del Fe (mM).

#### 3.2.9.14 Cuantificación de transferrina mediante el ensayo de Bradford

Para realizar el ensayo de Bradford, se prepararon 4 soluciones del reactivo de Bradford con distintas concentraciones de proteínas testigo: 1, 3, 5 y 7  $\mu\text{g/mL}$  y se obtuvo la curva de calibración. Luego, se dejaron reaccionar 100  $\mu\text{L}$  del reactivo junto con 100  $\mu\text{L}$  de la solución de MNG@Tf durante 30 minutos y se separaron los MNG@Tf magnéticamente. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 595 nm.

#### 3.2.10 Ensayos de irradiación con infrarrojo cercano (NIR)

Para evaluar el calentamiento de los nanogeles magnéticos y las nanopartículas magnéticas al ser irradiados con NIR, soluciones acuosas de los mismos de distintas concentraciones entre 0 y 4 mg/mL fueron analizadas. Para ello, las soluciones fueron expuestas de forma continua a un láser de 785 nm y 0.59 W  $\text{cm}^2$ . Los cambios en la temperatura se midieron con una cámara de imagen térmica (FLIR E30) en diferentes puntos de la solución (Universidad Libre de Berlín). Cada experimento se realizó por triplicado. Como control negativo se utilizó agua. Para graficar y procesar los datos se emplearon los programas GraphPad Prism 6.

#### 3.2.11 Encapsulación de clorhidrato de doxorrubicina

##### 3.2.11.1 Encapsulación a los MNGs basados en OEG

Para realizar la incorporación de clorhidrato de doxorrubicina (DOX.HCl), se colocaron 3 mg del MNG en 1 mL de una solución de DOX.HCl en buffer acetato (pH =5,1) a distintas concentraciones y se incubaron 16 h bajo agitación mecánica a temperatura ambiente. Las concentraciones de DOX.HCl utilizadas fueron 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM y 2,5 mM. Luego, el MNG fue separado magnéticamente de la solución y lavado dos veces con buffer acetato. La solución remanente de cada lavado se cuantificó mediante espectrofotometría UV-vis. Se midió la absorbancia de la misma a 480 nm para calcular la eficiencia de encapsulación y el cargado del fármaco. Para ello, previamente se realizó una curva de calibración de DOX.HCl en buffer acetato para obtener el coeficiente de absortividad molar. Para cada concentración, el experimento se realizó por triplicado.

##### 3.2.11.2 Encapsulación a los MNGs y nanopartículas core-brush basados en tPG

Para realizar la incorporación de clorhidrato de doxorrubicina, se colocaron 5 mg del sistema (MNG o *core brush*) en 2,5 mL de una solución de DOX.HCl en buffer acetato (pH =5,1)

2 mM y se incubaron 16 h bajo agitación mecánica a temperatura ambiente. Luego, el MNG o la partícula *core-brush* fue separado magnéticamente de la solución y lavado dos veces con buffer acetato. La solución remanente de cada lavado se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Vis siguiendo el protocolo informado en el inciso 3.2.11.1.

### 3.2.12 Ensayos de liberación de clorhidrato de doxorrubicina

Para realizar los ensayos de liberación de doxorrubicina se prepararon 10 muestras que contenían 0,25 mg del sistema a analizar y 100  $\mu$ L de buffer fosfato (pH= 7,5). Todas las muestras comenzaron la liberación al mismo tiempo bajo agitación mecánica, pero cada muestra fue separada a distintos tiempos: 2,4,6,10, 30 minutos y 1, 2, 4, 6 y 24 h. El sistema se separó mediante un campo magnético y la solución remanente se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Vis. Se midió la absorbancia de la misma a 480 nm para calcular el porcentaje de liberación. Estos ensayos se realizaron a temperatura ambiente y a 50 °C. Cada experimento se realizó por triplicado.

### 3.2.13 Estudios biológicos

#### 3.2.13.1 Estudios de viabilidad celular *in vitro*

Los estudios de viabilidad celular *in vitro* se realizaron en la Universidad Libre de Berlín. Las células de cancer de pulmón A549 (#ACC-107) se obtuvieron de DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) y se las almacenó en DMEM con 10 % de FCS (Biochrom AG) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Life Technologies) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para estudiar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, se sembraron 10000 células por pocillo junto con 100 mL de medio. Luego de 16 h, el medio fue reemplazado por 50 mL de medio fresco y 50 mL del medio que contiene distintas concentraciones del sistema a analizar. Se incubó durante 48 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> y luego, se descartó el sobrenadante. Se lavaron las células dos veces con 200 mL de buffer fosfato (PBS) por pocillo. Finalmente, se colocaron 100 mL de medio por pocillo y 10 mL de bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT, 5 mg/mL en PBS) y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Se descarta el sobrenadante y se agregan 100 mL de una solución 0,04 N de HCl/2-propanol. La absorbancia de la solución se midió a 570 nm en el equipo Tecan Infinite M200 Pro. Cada muestra se realizó por triplicado. De manera similar se midió la citotoxicidad en células cancerígenas HeLA y las células KB-V1 multiresistentes.

#### 3.2.13.2 Estudios de internalización celular

Los estudios de internalización celular se realizaron en la Universidad Libre de Berlín. Las células A549 fueron sembradas en concentraciones de 5000 células/mL en una placa de cultivo

de 24 pocillos sobre un cubreobjetos de vidrio (Sigma) y se cultivaron durante 24 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con medio solo (control) o con el medio con una solución de los NG modificados con RhB durante 4 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>, placas de 24 pocillos y se dejan crecer durante la noche. Luego se descarta el medio y se lava dos veces con PBS y se agrega 1 mL de medio fresco. Se colocaron 10 µL del nanogel modificado con RhB (10 mg/mL en agua) y se incubó durante 4 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de dos lavados con PBS, las células se permeabilizaron con una solución en PBS de Triton X-100 1 % durante 5 minutos y se lavaron 3 veces más. Se utilizaron el marcador de endosoma temprano EEA1 y DAPI para la tinción de las muestras. Las mismas fueron analizadas en un microscopio confocal de barrido láser (Leica) y procesadas con el Software LASAF.

### *3.2.13.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC)*

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana se realizó en el Instituto de Farmacia, Pune, India. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana se realizó en el instituto de Farmacia, Pune, India mediante centrifugación gradual de Ficoll-Hypaque. Se recogió sangre de individuos voluntarios sanos en tubos Vacutainer heparinizados estériles. Se mezclaron volúmenes iguales de sangre y PBS con una pipeta estéril en un tubo de ensayo de 50 mL. A esta mezcla de sangre-PBS se le agregó lentamente 15 mL de solución de Ficoll-Hypaque. Después se centrifugó a 1500 rpm durante 40 minutos a 18 °C. La capa superior que contenía plasma y plaquetas se eliminó con una pipeta estéril. La capa de color caramelo que contenía hPBMCs se transfirió a un tubo nuevo, se lavó dos veces con 20 mL de PBS y se resuspendió en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium). Se contaron las células y se determinó la viabilidad de las células mediante prueba de exclusión de azul de tripano.

### *3.2.13.4 Estudio de eficiencia de captura de una solución artificial de CTC*

La suspensión artificial de CTC se realizó en el Instituto de Farmacia, Pune, India. Para ello, se preparó por saturación de células HCT 116 con hPBMCs a razón específica (1:50- 1:10 HCT116:hPBMC). Se añadieron la cantidad de MNG@Tf equivalente a 20 µg de Tf a una suspensión artificial de CTC, se incubaron durante 5 min y luego se sometieron a separación magnética. El sedimento de células recogido usando campo magnético se eliminó de la mezcla de HCT116 no capturadas y hPBMCs. Las fracciones capturadas y no capturadas se tiñeron con Eosina y la proteína de fluorescencia verde para la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia. La eficiencia porcentual se calculó contando el número de células capturadas y no capturadas.

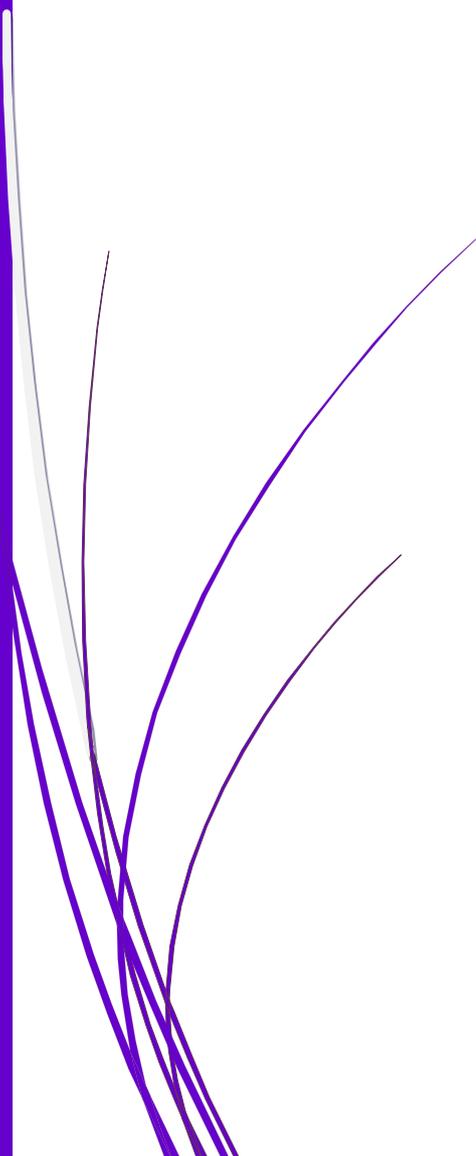
### 3.3 REFERENCIAS

1. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B*. 2015;3:6117-6147. doi:10.1039/C5TB00664C.
2. Peng H, Cheng Y, Dai C, et al. A Fluorescent Probe for Fast and Quantitative Detection of Hydrogen Sulfide in Blood \*\*. 2011:9672-9675. doi:10.1002/anie.201104236.
3. Bloemen M, Brullot W, Luong TT, Geukens N, Gils A, Verbiest T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Nanopart Res*. 2012;14(9):1100. doi:10.1007/s11051-012-1100-5.
4. Wang W, Vaughn MW. Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning*. 2008;30(2):65-77. doi:10.1002/sca.20097.
5. Liu J, He W, Zhang L, et al. Bifunctional nanoparticles with fluorescence and magnetism via surface-initiated AGET ATRP mediated by an iron catalyst. *Langmuir*. 2011;27(20):12684-12692. doi:10.1021/la202749v.
6. Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderón M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym Chem*. 2014;5:6909-6913. doi:10.1039/C4PY01186D.
7. Roller S, Zhou H, Haag R. High-loading polyglycerol supported reagents for Mitsunobu- and acylation-reactions and other useful polyglycerol derivatives. *Mol Divers*. 2005;9(4):305-316. doi:10.1007/s11030-005-8117-y.
8. Fan Q-L, Neoh K-G, Kang E-T, Shuter B, Wang S-C. Solvent-free atom transfer radical polymerization for the preparation of poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: synthesis, characterization and cellular uptake. *Biomaterials*. 2007;28:5426-5436. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.039.



## **SECCIÓN 3**

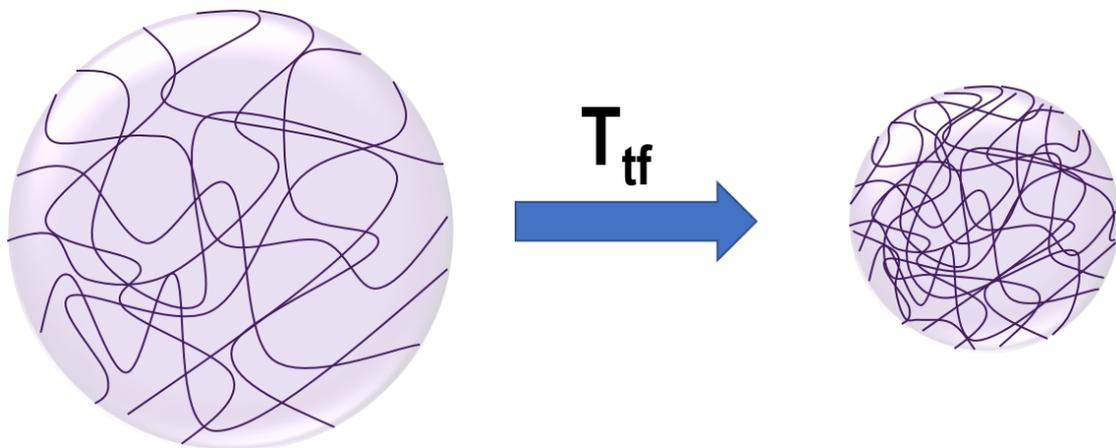
# **NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES**





# Capítulo 4

## NANOGELES TERMOSENSIBLES MEDIANTE POLIMIERIZACIÓN RADICALARIA NO CONTROLADA





## 4.1 INTRODUCCIÓN

Durante la última década, los nanogeles han captado el interés como transportadores de droga para aplicaciones biológicas y biomédicas en el área de la nanomedicina debido a la gran versatilidad desde el punto de vista físico y/o químico.<sup>1-4</sup> Los nanogeles son matrices tridimensionales entrecruzadas en sus tres dimensiones en la nanoescala. Además, su empleo como nanodispositivos se debe a que estos sistemas ofrecen muchas ventajas en comparación a los dispositivos convencionales de liberación controlada basados en polímeros: una síntesis simple, un control del tamaño de micro a nanómetros presentando así efecto EPR, una estructura interna de red que permite la incorporación de distintos tipos de moléculas y, potencialmente, biocompatibilidad.<sup>5,6</sup>

Asimismo, los nanogeles pueden sufrir cambios conformacionales en respuesta a estímulos externos como son el pH, la temperatura, la fuerza iónica o la irradiación.<sup>7-10</sup> Por ejemplo, los nanogeles termosensibles que presentan una temperatura de transición de fase en medios acuosos, son materiales que tienen un gran potencial para desarrollarse en diversas bioaplicaciones como la bioadhesión controlada, la ingeniería de tejidos, la liberación de drogas inducidas por hipertermia, etc. Dichos polímeros, como se ha descrito anteriormente, son dispersables en agua por debajo de la  $T_{ff}$  pero precipitan a temperaturas mayores.<sup>11,12</sup>

Dentro de los nanodispositivos poliméricos termosensibles, el poli-N-isopropilamida (PNIPA) y sus derivados, han sido unos de los más estudiados para su uso en nanomedicina,<sup>13-15</sup> con una  $T_{ff}$  de 32 °C. Sin embargo, estos polímeros presentan varias desventajas a saber; propiedades de biocompatibilidad pobres,<sup>16</sup> una transición de fase irreversible<sup>17,18</sup> y una gran dependencia de la  $T_{ff}$  en función de los grupos terminales del monómero,<sup>19</sup> entre otras.

En los últimos años, se han estudiado polímeros termosensibles basados en oligoetilenglicoles de cadena corta (OEG) como grupos pendientes del polímero.<sup>20</sup> Existen distintos reportes de la síntesis de polímeros basados en OEG. Los mismos han demostrado distintas ventajas como una síntesis sencilla y versátil a partir de monómeros comercialmente disponibles, la posibilidad de incorporar al sistema una amplia gama de materiales incluyendo compuestos biológicos, y además presentan propiedades atractivas tales como la posibilidad de ser dispersables en agua, biocompatibilidad, la termosensibilidad y eventualmente su biodegradabilidad.<sup>20-24</sup>

En particular, uno de los pioneros en investigar este tipo de polímeros es Jean-François Lutz. Él junto a sus colaboradores han reportado la síntesis de los copolímeros de 2-(2-metoxietoxi) etil metacrilato y oligo(etilenglicol)metacrilato (P(MEO<sub>2</sub>MA-co-OEGMA)) demostrando que exhiben

un comportamiento termosensible que es comparable al de PNIPA y, por lo tanto, se presentan como una alternativa prometedora a los polímeros convencionales de PNIPA para la obtención de diferentes materiales poliméricos con potenciales aplicaciones en el área de la medicina.<sup>25,26</sup> Adicionalmente, comprobaron que la transición de fase obtenida para estos polímeros es reversible y no varía frente a parámetros importantes como la concentración del polímero en agua, la fuerza iónica y la longitud de la cadena pendiente.<sup>27</sup> Además, se puede tener un control fino de la  $T_{ff}$  del sistema variando el largo de la cadena pendiente y los monómeros utilizados.<sup>26</sup>

Recientemente, Cai y colaboradores<sup>28</sup> sintetizaron microgeles de (MEO<sub>2</sub>MA-co-OEGMA) vía polimerización radicalaria convencional y a través de la metodología de termoprecipitación, donde los monómeros son inicialmente dispersados en agua pero el copolímero formado precipita debido a que la temperatura supera la  $T_{ff}$  y así se forman las partículas. La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera inerte. El mecanismo mediante el cual se obtienen estos nanogeles es similar al propuesto para los NGs de PNIPAM.<sup>29-31</sup>

La ultrasonificación es un proceso en el que las ondas de ultrasonido (mayores a 20 kHz) se utilizan para agitar las partículas en solución. Las ondas de ultrasonido se propagan al medio líquido dando lugar a ciclos alternantes de alta presión (compresión) y de baja presión (rarefacción). Durante la rarefacción, las ondas sónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío en el líquido, que luego colapsan violentamente (cavitación) durante la compresión, creando temperaturas locales muy altas.<sup>32,33</sup> Los equipos de ultrasonificación pueden producir ondas de ultrasonido en un baño de agua, donde se colocan muestras, o pueden ser sondas las que se introducen directamente en la muestra para ser sonicada.

En la actualidad existen diversas aplicaciones de la ultrasonificación. La misma se puede utilizar para desintegrar el material fibroso y celulósico en partículas finas y romper las paredes de la estructura celular. Este efecto se puede utilizar para procesos de fermentación, digestión y de conversión de materia orgánica como también para la extracción de enzimas y otras moléculas orgánicas de las células. Además, este método se utiliza para la desgasificación de solventes y limpieza de distintos materiales.<sup>34</sup>

Por un lado, la metodología de ultrasonificación es ampliamente utilizada para la homogenización. Este término refiere a un proceso mecánico para reducir el tamaño de las partículas en un líquido para que se vuelvan uniformemente pequeñas y distribuidas. En los últimos años, se ha empleado la homogenización para la preparación de emulsiones. El ultrasonido proporciona la energía necesaria para dispersar una fase líquida (fase dispersa) en pequeñas gotas en una segunda fase (fase continua) formando así la emulsión.<sup>35-37</sup> Esta es una técnica que

permite sintetizar una amplia gama de nanodispositivos como vesículas,<sup>38</sup> liposomas,<sup>39,40</sup> nanogeles,<sup>41,42</sup> nanopartículas,<sup>43</sup> etc.

Por otro lado, la ultrasonificación proporciona la energía requerida para iniciar distintas reacciones químicas. Este campo de aplicación se denomina sonoquímica. Esta metodología presenta varias ventajas como el aumento de la velocidad de reacción e incrementa la reactividad tanto de los sustratos como de los catalizadores, etc.<sup>44,45</sup> Se ha reportado la utilización de esta técnica para la síntesis de grafeno,<sup>46</sup> distintas nanopartículas,<sup>47</sup> nanorvarillas,<sup>48</sup> etc. como también para la transesterificación de distintos aceites<sup>44</sup> y para la modificación superficial de nanopartículas.<sup>49</sup> No obstante, al principio de esta tesis, no se encontraban antecedentes que refirieran al empleo de esta técnica para la síntesis directa de nanogeles, lo que evitaría así el empleo de grandes cantidades de surfactante como sucede al utilizar el método de miniemulsión.

## **4.2 OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, se planteó como objetivo estudiar la factibilidad de utilizar la ultrasonificación para la síntesis de nanogeles termosensibles utilizando monómeros basados en OEG. Se eligió como sistema de estudio nanogeles de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA, usando como co-monómero el 2-hidroxietil éter metacrilato (HEMA) y tetra (etilenglicol) dimetacrilato como agente entrecruzante.

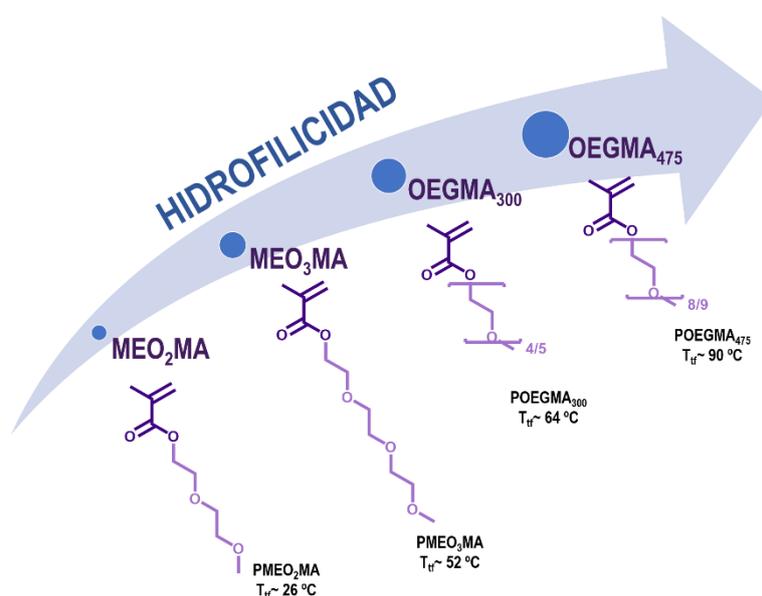
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar la síntesis asistida por ultrasonificación de nanogeles termosensibles analizando los parámetros que permiten la optimización de las condiciones de síntesis.
- Caracterizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de los nanogeles.
- Realizar estudios de las propiedades de los nanogeles en medios biológicos para analizar su potencial aplicación en nanomedicina.

## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1 Síntesis de nanogeles termosensible

Para realizar la síntesis de nanogeles asistida por ultrasonificación se eligieron como monómeros MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA. Los mismos son monómeros derivados del oligoetilenglicol. Como ya se ha mencionado, tanto Lutz y colaboradores<sup>21</sup> como Ishizone y colaboradores<sup>50</sup> encontraron que la  $T_{tr}$  de los polímeros poli[oligo(etilenglicol) alquil éter metacrilatos] puede variar cambiando el largo de la cadena del oligo(etilenglicol). Como se observa en la Figura 4.1, a medida que aumenta la hidrofiliicidad del monómero, aumenta la  $T_{tr}$  del polímero siendo la  $T_{tr}$  del polímero de MEO<sub>2</sub>MA puro de 26° C mientras que la  $T_{tr}$  de los polímeros de OEGMA puro es 93 °C (Figura 4.1).<sup>21,50</sup>

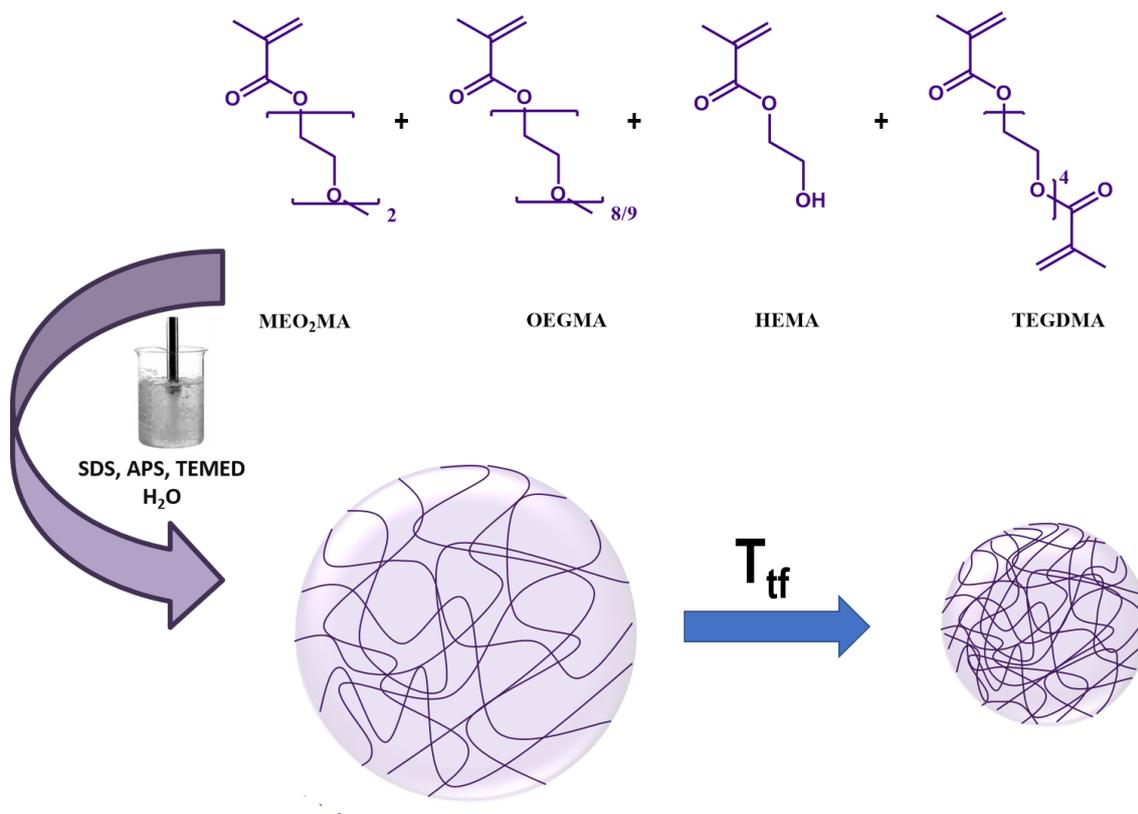


**Figura 4.1.** Distintos monómeros basados en OEG ordenados según su hidrofiliicidad y la  $T_{tr}$  correspondiente a cada homopolímero.

Además, como co-monómero se utilizó HEMA. Esta molécula posee un grupo hidroxilo que resulta de gran interés para la posterior modificación del nanogel. Este grupo funcional permite ya sea de manera covalente o por interacciones puente hidrógeno anclar alguna molécula de interés como un fármaco, una sonda fluorescente, un grupo *targeting*, etc.

Los diferentes nanogeles basados en MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA, utilizando como co-monómero HEMA y agente entrecruzante TEGDMA fueron sintetizados como se muestra en el esquema de reacción de la Figura 4.2 (Materiales y métodos 3.2.6.1). De manera general, se coloraron todos los reactivos junto con el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS) y el activador tetrametiletilendiamina (TEMED) en agua para luego calentarla a una temperatura dada. Finalmente,

se ultrasonicó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia durante el tiempo de reacción y se purificó mediante diálisis.



**Figura 4.2** Esquema general de síntesis de nanogel asistida por ultrasonificación y su eventual transformación física de transición de fase.

En una primera etapa, se evaluaron distintas variables como el tiempo, la temperatura de reacción, y la presencia del agente reductor TEMED con el fin de optimizar una nueva metodología de síntesis de nanogel asistida por ultrasonificación. Para ello, la relación molar MEO<sub>2</sub>MA: OEGMA se mantuvo constante 9:1. En la Tabla 4.1 se presenta un resumen de las variables estudiadas junto con el tamaño de los nanogel y su  $T_{tf}$ .

**Tabla 4.1** Resumen de las variables estudiadas para la optimización de la síntesis.

Muestra	Relación molar MEO <sub>2</sub> MA:OE GMA	HEMA	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	TEMED	T <sub>ff</sub> (°C)	Tamaño DLS (nm) 25 °C
1	9:1	4 %	180	60	SI	37,3	(14±4) x10 <sup>1</sup>
2			120			36,9	(14±4) x10 <sup>1</sup>
3			90			36,8	(13±4) x10 <sup>1</sup>
4			60			37,2	(21±3) x10 <sup>1</sup>
5			30			36,7	(17±3) x10 <sup>1</sup>
6			15			36,3	(15±2) x10 <sup>1</sup>
7			50	37,7		(16±3) x10 <sup>1</sup>	
8			40	36,0		(28±3) x10 <sup>1</sup>	
9			Tamb	36,7		(20±4) x10 <sup>1</sup>	
10			60	NO	-	-	

Primero, se analizó el tiempo de reacción. Los tiempos de reacción evaluados fueron 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h y 3 h. Se observó que para todos los tiempos de reacción los nanogeles fueron eficientemente sintetizados de acuerdo a los estudios de FT-IR y RMN  $^1\text{H}$ . Los tamaños de las partículas obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) variaron entre 100 nm y 300 nm. La  $T_{\text{tr}}$  para todos los nanogeles fue alrededor de 37 °C. Se consideraron como mejores tiempos de síntesis aquellos más cortos, 15 y 30 minutos. Comparando con los resultados reportados en bibliografía, los tiempos de reacción se redujeron considerablemente de 6 horas a 15 minutos.<sup>28</sup> Cabe destacar que para todas las reacciones no fue necesaria la degasificación previa del solvente ni el empleo de atmósfera inerte, simplificando el proceso de síntesis.

En una segunda instancia, se evaluó el efecto de la temperatura en la síntesis. Las temperaturas analizadas fueron 60 °C, 50 °C, 40 °C y temperatura ambiente. Una vez más, se obtuvieron nanogeles de manera exitosa con un tamaño que variaba entre 100 nm y 300 nm. Sin embargo, la dispersión de nanogeles sintetizados a 60 °C fue la más estable en el tiempo y se eligió esta temperatura como la óptima.

Para estudiar si era necesario utilizar el agente reductor TEMED para la síntesis de los nanogeles, se llevó a cabo la síntesis de los mismos en presencia y ausencia del agente. Sólo cuando se utilizó TEMED la síntesis fue exitosa mientras que en ausencia del mismo no se observó reacción. Por lo tanto, se comprobó la necesidad de utilizar el agente reductor, con una temperatura de 60 °C y 15 minutos de reacción para la síntesis asistida por ultrasonificación de nanogeles.

### 4.3.2 Análisis de las propiedades de los nanogeles

Habiendo optimizado las variables de síntesis como tiempo y temperatura, se caracterizó el sistema y se continuó el estudio de los nanogeles analizando la influencia a los tiempos más corto de reacción, 15 y 30 minutos, la relación molar entre los monómeros y el porcentaje de HEMA en el tamaño y  $T_{\text{tr}}$  de los nanogeles.

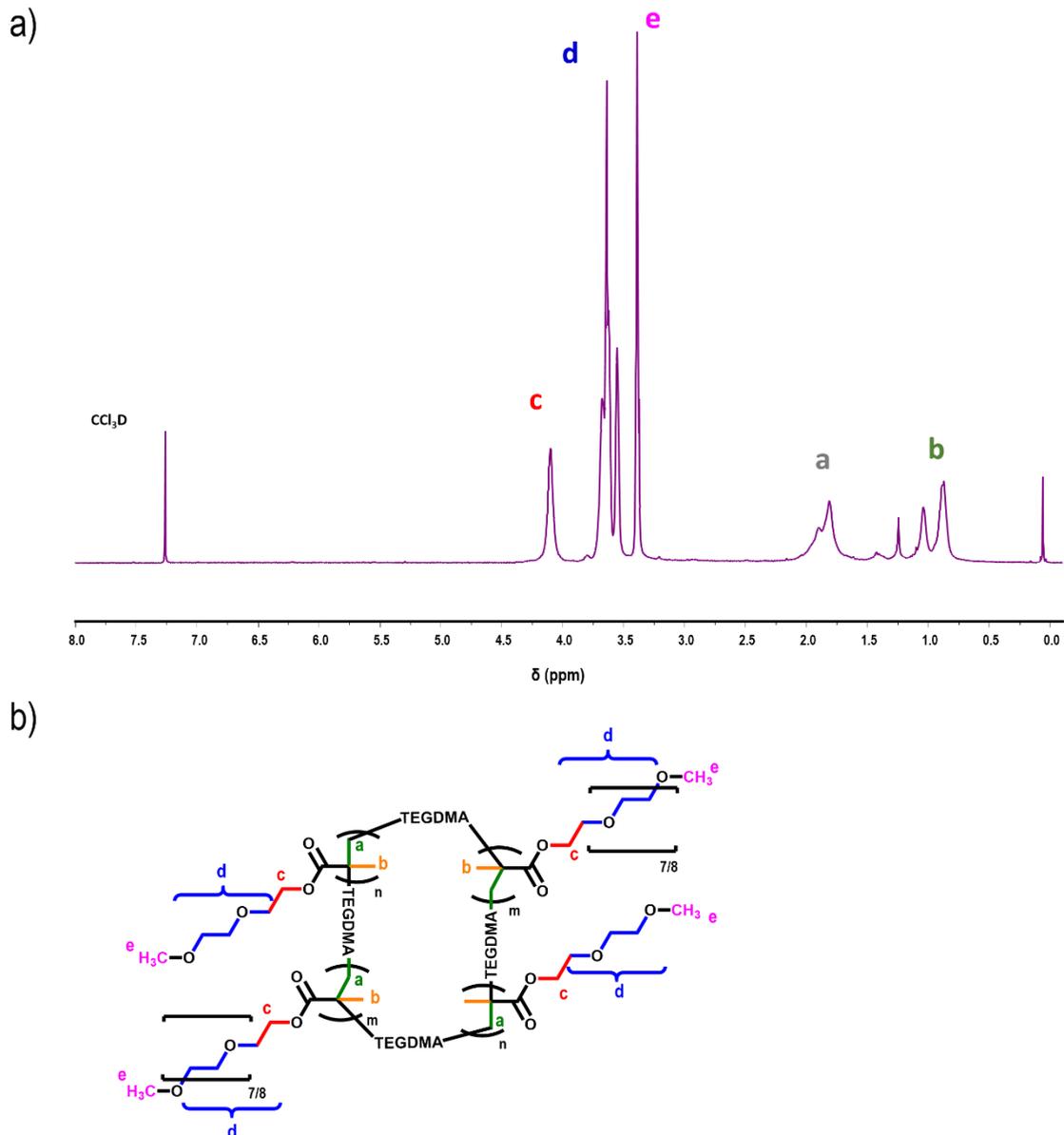
En la Tabla 4.2 se presenta un resumen de los nanogeles obtenidos, con sus  $T_{\text{tr}}$  y tamaños por encima y por debajo de la misma. Además, se informa la relación molar, porcentaje de co-monomero y tiempos empleados en cada caso.

**Tabla 4.2** Resumen de las características de los NGs.

Muestra	Relación molar MEO <sub>2</sub> MA:OEGMA	HEMA	Tiempo (min)	T <sub>ff</sub> (°C)	Tamaño DLS (nm) 25 °C	Tamaño DLS (nm) 60 °C
NG 1	6 : 4	4 %	15	62,0	(17±3) x10 <sup>1</sup>	(31±7) x10 <sup>1</sup>
NG 2	7 : 3	4 %	30	57,3	(14±1) x10 <sup>1</sup>	(35±2) x10 <sup>1</sup>
NG 3	7 : 3	4 %	15	57,4	(13±1) x10 <sup>1</sup>	(25±3) x10 <sup>1</sup>
NG 4	8 : 2	4 %	30	49,2	(14±1) x10 <sup>1</sup>	(23±1) x10 <sup>1</sup>
NG 5	8 : 2	4 %	15	47,9	(11±1) x10 <sup>1</sup>	(17±3) x10 <sup>1</sup>
NG 6	8 : 2	8 %	15	52,5	149±5	(25±1) x10 <sup>1</sup>
NG 7	9 : 1	4 %	15	37,7	(14±1) x10 <sup>1</sup>	(52±6) x10 <sup>1</sup>

## 4.3.2.1 Caracterización de los nanogeles

Para llevar a cabo la caracterización estructural del sistema, se realizaron espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los nanogeles obtenidos. En la Figura 4.3 puede observarse el espectro obtenido para el NG 5 junto con un esquema de la red polimérica del mismo.



**Figura 4.3.** a) Espectro RMN  $^1\text{H}$  del nanogel NG 5 y b) esquema de la red polimérica del NG 5.

En el espectro se pudieron identificar las distintas señales características del nanogel teniendo mayor desplazamiento químico aquellos átomos de hidrógenos unidos al carbono de la cadena unida directamente al grupo metacrilato (hidrógenos c), siguiendo aquellos correspondientes a las unidades repetitivas del monómero (hidrógenos d) y los hidrógenos de los

metilos terminales (hidrógenos e). Los hidrógenos correspondientes a la cadena polimérica, hidrógenos a y b se encuentran a corrimientos menores. Estos resultados coinciden con los reportados en bibliografía para copolímeros de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA.<sup>51</sup> Además, no se encuentra la señal característica de los protones vinílicos en el rango de 5,0-6,5 ppm que evidencia que la reacción fue exitosa.

Asimismo, mediante espectroscopia FT-IR se confirmaron la presencia de los grupos funcionales correspondientes al nanogel. De manera representativa, en la Figura 4.4 se encuentra el espectro FT-IR del NG 5. En el mismo, se observó la presencia de las señales características; a 2916 cm<sup>-1</sup> y 2871 cm<sup>-1</sup> del estiramiento de C-H alifático y 1735 cm<sup>-1</sup> debido al estiramiento C=O del éster permitiendo confirmar la estructura química de los nanogeles. Adicionalmente, se comprobó la reacción de polimerización debido a la ausencia de la banda característica del estiramiento C=C alrededor de 1660 cm<sup>-1</sup>.

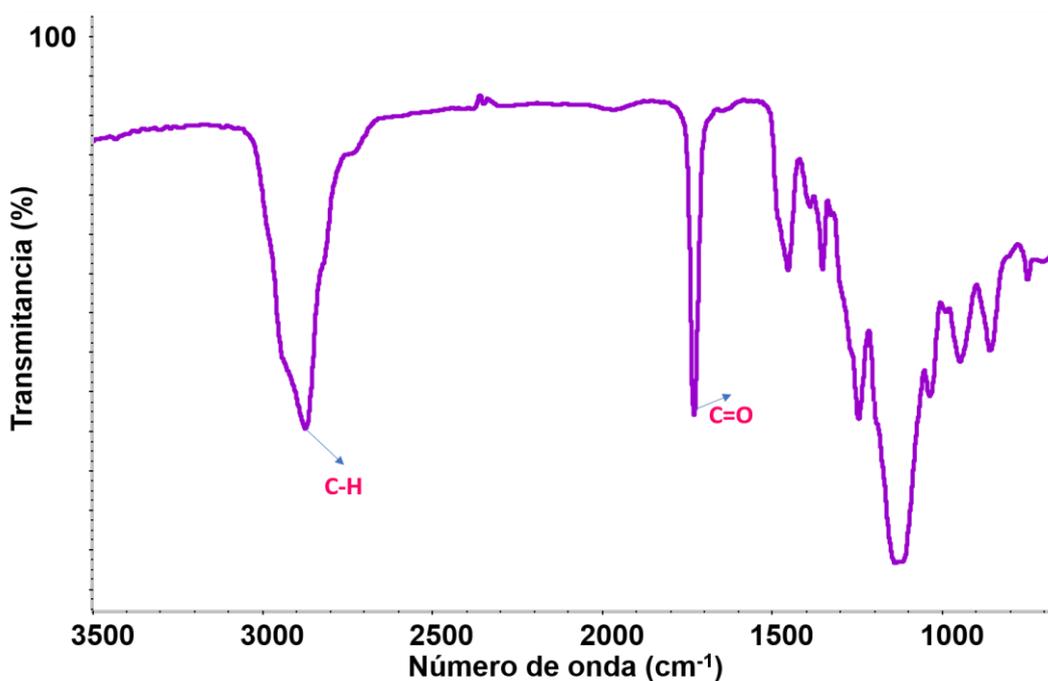
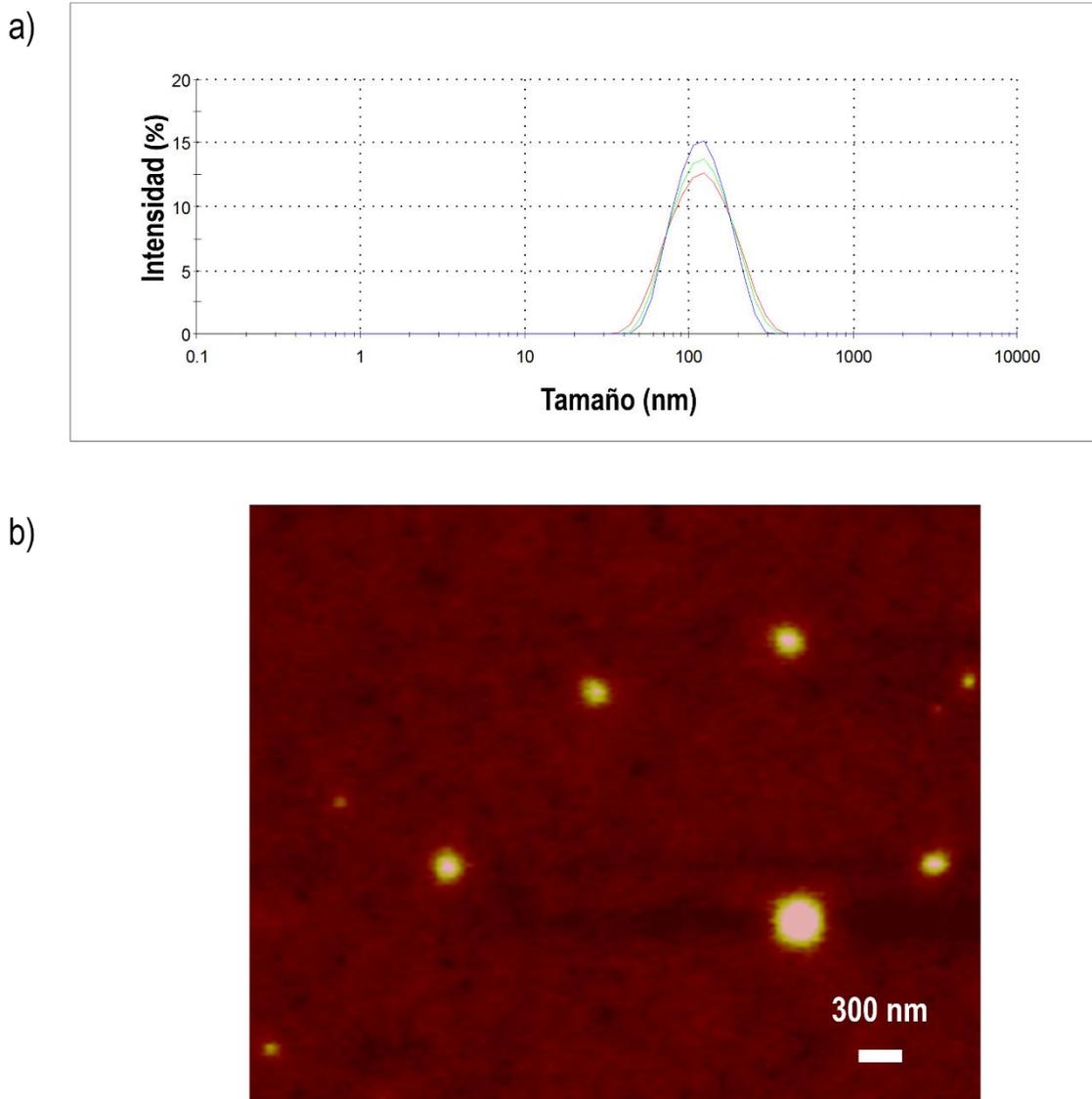


Figura 4.4 Espectro FT-IR del nanogel NG 5.

Una vez realizada la caracterización estructural del sistema, se analizó la morfología y tamaño del nanogel. Para ello, se realizaron estudios mediante dos técnicas: dispersión de luz dinámica en dispersión acuosa y microscopía de fuerza atómica (AFM) de la muestra seca. En la Figura 4.5 se encuentran la distribución de tamaños en función de la intensidad obtenida para el NG 5 (Figura 4.5 a) como también una imagen AFM del mismo. Se observó que los nanogeles tienen tamaños en el rango de 100-200 nm. En cuanto a la morfología de los nanogeles, se determinó mediante AFM que los mismos presentaban una morfología globular (Figura 4.5 b).



**Figura 4.5.** a) Distribución de tamaño en DLS (por triplicado) y b) imagen AFM del nanogel NG 5.

#### 4.3.2.2 Análisis del tamaño de los nanogeles

A los fines de comparar los tamaños de los nanogeles obtenidos para las distintas condiciones estudiadas, se realizaron medidas de dispersión de luz dinámica. De forma general, se observaron tamaños en un intervalo entre 100 y 200 nm.

Por un lado, se estudiaron los tamaños de los nanogeles empleando distintas relaciones molares MEO<sub>2</sub>MA:OEGMA en un rango de 6:4 a 9:1, los mismos se detallan en la Tabla 4.2. Los tamaños de los nanogeles observados variaba entre 100 nm y 200 nm.

Por otro lado, se determinó que al incrementar el porcentaje de co-monómero HEMA en el sistema, el tamaño aumentaba. Este comportamiento también puede ser explicado debido a que el co-monómero HEMA es hidrofílico y, por ende, un incremento de la proporción del mismo vuelve

más hidrofílico al nanogel, llevando a un mayor hinchamiento en dispersión acuosa y resultando en un aumento del tamaño. Así, comparando nanogeles con igual relación molar MEO<sub>2</sub>MA: OEGMA, se observó que el NG 5 (4% HEMA) tenía un tamaño promedio de  $(11 \pm 1) \times 10^1$  mientras que el NG 6 (8% HEMA) uno de  $149 \pm 5$  nm.

Además, se estudió la influencia del tiempo de reacción, encontrándose la siguiente relación: al aumentar el tiempo de 15 minutos a 30 minutos, también lo hacen los tamaños de los nanogeles, siendo 128 nm y 143 nm para los nanogeles con relación 7:3 (NG 2 y 3, Tabla 4.2) y 114 nm y 145 nm para los nanogeles con relación 8:2 (NG 4 y 5, Tabla 4.2). Este hecho puede ser justificado considerando que, al incrementar el tiempo de reacción, se podría obtener un crecimiento mayor de la cadena polimérica.

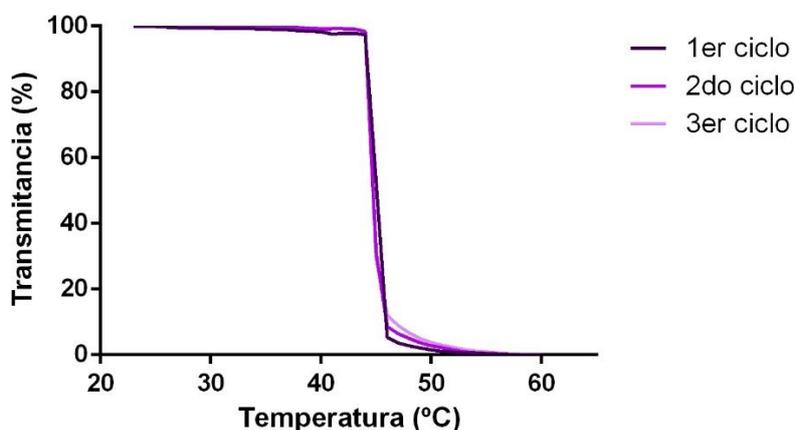
#### *4.3.2.3 Análisis del comportamiento termosensible de los nanogeles*

Para determinar la  $T_{ff}$  de los nanogeles se realizaron mediciones de turbidimetría (Materiales y métodos 3.2.9.9). Como se muestra en la Tabla 4.2, se encontró una correlación entre el incremento de la proporción de OEGMA y el aumento de la  $T_{ff}$  (NG 1,3,5,7). Como se mencionó previamente, se ha reportado que los valores de  $T_{ff}$  de copolímeros compuestos de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA pueden ser modificados variando la relación de los monómeros logrando así un control de la temperatura de transición de fase.<sup>21,52</sup> Este control de la  $T_{ff}$  se debe a que, por debajo de la misma, las interacciones entre los dominios hidrofílicos son mayores que la de los dominios hidrofóbicos mientras que por encima de la  $T_{ff}$  sucede lo inverso. Entonces, al incorporar un componente más hidrofílico, se espera que la  $T_{ff}$  incremente. Así, variando las proporciones de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA se lograría un control muy fino de la temperatura de transición de fase del nanogel.

Este hecho permite la obtención de diferentes temperaturas de transición de fase para futuras aplicaciones como sistemas de liberación controlada de drogas. Si se observan las distintas  $T_{ff}$  de los nanogeles en la Tabla 4.2, las mismas van de un intervalo de 37 °C a 62 °C. Este hecho demuestra la versatilidad de este tipo de sistemas, pudiendo ajustar la  $T_{ff}$  a una temperatura adecuada para una aplicación específica. No obstante, aquellos nanogeles obtenidos utilizando las relaciones molares más altas o más bajas (6:4, 9:1) resultaron ser suspensiones coloidales más inestables en el tiempo. Asimismo, se demostró que un incremento en el porcentaje de HEMA conduce a un aumento en la  $T_{ff}$  (NG 5 y 6) probablemente debido al carácter hidrofílico de este monómero.

Por otra parte, se analizó la reversibilidad del sistema luego de varios ciclos de calentamiento-enfriamiento. Para todos los nanogeles se demostró que la termosensibilidad del

sistema resulta reversible al menos durante tres ciclos. A modo representativo, en la Figura 4.6 se muestra la turbidimetría de NG 5. En la misma no se observan signos de histéresis en los distintos ciclos, es decir no se altera el proceso al calentarse y enfriarse y, por lo tanto, el sistema es reversible.



**Figura 4.6.** Turbidimetría de NG 5 durante tres ciclos de calentamiento-enfriamiento.

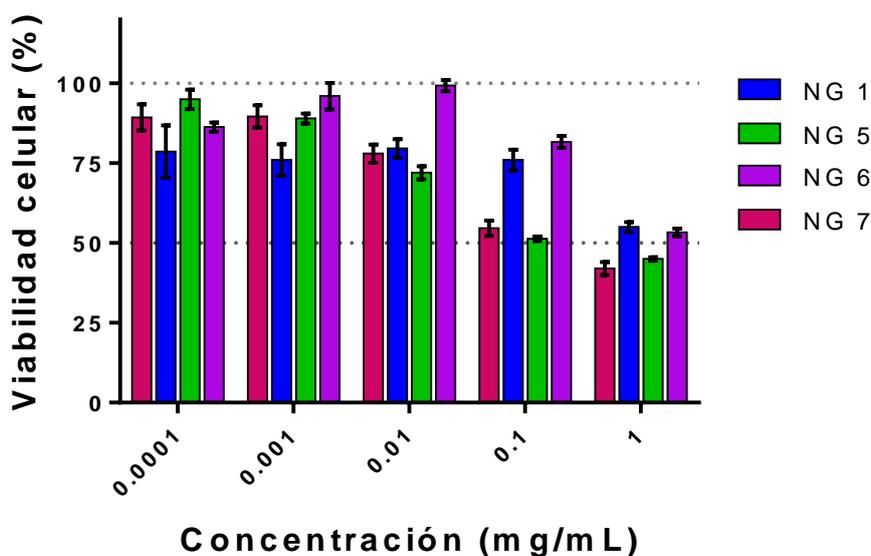
Finalmente, se demostró el comportamiento termosensible mediante DLS. Para ello, se midieron los tamaños de los nanogelés a 25 °C (por debajo de la  $T_{tf}$ ) y 60 °C (por encima de la  $T_{tf}$ ). Los mismos se informan en la Tabla 4.2. En todos los casos se observó que por encima de la  $T_{tf}$  los nanogelés poseían tamaños hidrodinámicos mayores que por debajo de la  $T_{tf}$ . Además, al calentar la dispersión que era translúcida inicialmente, se tornaba turbia. Este comportamiento puede ser atribuido a la agregación de los nanogelés colapsados por encima de la  $T_{tf}$ . Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo medidas de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) a 25 °C y 50 °C. Esta técnica permite conocer la cantidad de nanopartículas presente en una dispersión. Se encontró que el número de partículas disminuyó de  $9,1 \times 10^7$  a  $1,6 \times 10^7$  partículas por mL cuando se aumentaba la temperatura de 25 °C a 55 °C.

### 4.3.3 Estudios biológicos de los nanogelés

Con el fin de analizar la potencial aplicación de los nanogelés como nanodispositivos para liberación de fármacos, se realizaron estudios de citotoxicidad e internalización celular.

#### 4.3.3.1 Estudios de citotoxicidad de los nanogeles

Para estudiar los efectos tóxicos que podrían tener los nanogeles en células *in vitro*, los NG 1, NG 4, NG 6 y NG 7 fueron incubados con células cancerosas de pulmón A549 durante 48 h como se detalla en la Sección de Materiales y métodos 3.2.13.1. La Figura 4.7 muestra la viabilidad celular relativa de las células A549 a distintas concentraciones de los nanogeles. La misma fue determinada mediante el ensayo MTT.

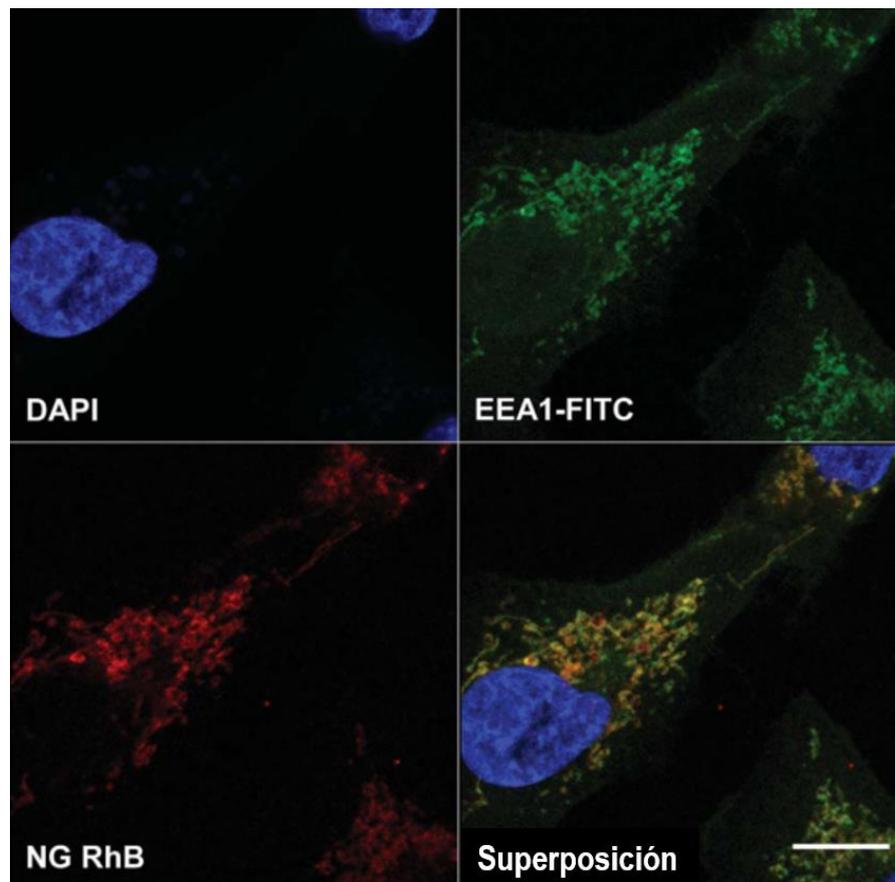


**Figura 4.7.** Viabilidad celular de células A549 con distintas concentraciones de nanogeles con sus respectivos errores.

Los valores de  $IC_{50}$  (concentración mínima necesaria para reducir la población de células al 50 %) fueron 0,3 mg/mL para NG 5 y 7 y 1,2 mg/mL para NG 1 y 6. Los resultados indicaron que aquellos nanogeles más hidrofílicos, como NG 1 con mayor proporción de OEGMA o NG 6 con un porcentaje mayor de HEMA, tienen un efecto menor en la viabilidad celular en comparación con los nanogeles más hidrofóbicos. En general, los nanogeles no causaron una reducción severa en la viabilidad celular por debajo del 50% hasta una concentración de 0,1 mg/mL o 1 mg/mL respectivamente. Estos resultados demostraron el potencial de los nanogeles basados en etilenglicol como nanodispositivos.

#### 4.3.3.2 Estudios de internalización celular de los nanogelés

Para poder llevar a cabo los estudios de internalización celular, el NG 6 fue modificado covalentemente con rodamina B a través de los grupos hidroxilo del co-monómero HEMA como se describe en Materiales y métodos 3.2.7. Se eligió este sistema debido a que es el que contiene una mayor proporción de HEMA. Una vez modificados, los mismos se incubaron junto con células A549 como se detalla en la Sección Materiales y métodos 3.2.13.2. El sistema fue analizado mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Imagen de células A549 incubadas con NG 6. Azul: núcleo, verde: marcador de endosomas tempranos, rojo: rodamina B. Escala: 100 micrones.

En las imágenes de canal único, el azul representa el núcleo de la célula y el marcador de endosoma temprano EEA1 se muestra en verde. En rojo, los nanogelés modificados con rodamina B pueden verse en los compartimientos y estructuras dentro de la célula. La imagen resultante de la colocalización (superposición), es una matriz tridimensional con tantas capas como canales tenga la imagen, en este caso de los tres canales. La imagen real que se visualiza es una suma

de todos los canales. En esta imagen, se observa que los nanogeles modificados con rodamina B se encuentran en parte colocalizados con el marcador de endosomas, dando como resultado el color amarillo en la imagen de superposición. Este estudio permitió conocer la habilidad de los nanogeles para ingresar a la célula mediante endocitosis y, por lo tanto, demostró el potencial de este sistema para ser utilizado para liberación controlada de fármacos.

#### 4.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En conclusión, se demostró la utilidad de la ultrasonificación como metodología de síntesis. Se describió una técnica novedosa y simple para síntesis de nanogelAS termosensibles basados en oligoetilenglicoles. La misma presenta numerosas ventajas frente a metodologías ya reportadas como el tiempo reducido de reacción, sin necesidad de una desoxigenación previa y temperaturas moderadas. Este trabajo presenta uno de los primeros reportes de síntesis de nanogelAS a través de la termoprecipitación asistida por ultrasonificación en el cual se logra un gran control del tamaño como de la  $T_{if}$ . Asimismo, se estudió el tamaño y morfología de los mismos encontrándose que son nanopartículas esféricas con tamaños entre 71 y 180 nm. Se logró un gran control de la  $T_{if}$  de los nanogelAS variando la relación molar MEO<sub>2</sub>MA : OEGMA o bien, incrementando el porcentaje de HEMA obteniéndose  $T_{if}$  entre 37 °C y 62 °C. Se demostró la baja toxicidad de los nanogelAS basados en etilenglicol y su habilidad para ingresar a la célula mediante endocitosis.

Los resultados obtenidos evidencian el gran potencial de estos sistemas para la liberación controlada de macromoléculas, agentes de diagnóstico por imagen o fármacos anticancerígenos de bajo peso molecular, ya que presentan tamaños y polidispersidades ideales como también adecuadas propiedades de citotoxicidad e internalización celular.

#### 4.5 REFERENCIAS

1. Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(9):836-851. doi:10.1016/j.addr.2012.02.002.
2. Faure E, Falentin-Daudré C, Lanero TS, et al. Functional nanogels as platforms for imparting antibacterial, antibiofilm, and antiadhesion activities to stainless steel. *Adv Funct Mater.* 2012;22(24):5271-5282. doi:10.1002/adfm.201201106.
3. Raemdonck K, Demeester J, Smedt S De. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Society.* 2009:707-715. doi:10.1039/b811923f.
4. Coll Ferrer MC, Dastgheyb S, Hickok NJ, Eckmann DM, Composto RJ. Designing nanogel carriers for antibacterial applications. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2105-2111. doi:10.1016/j.actbio.2014.01.009.
5. Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S. Polymer nanogels : A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(9):836-851. doi:10.1016/j.addr.2012.02.002.
6. Merino S, Martín C, Kostarelos K, Prato M, Vázquez E. Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano.* 2015;9(5):4686-4697. doi:10.1021/acsnano.5b01433.
7. Reineke TM. Stimuli-Responsive Polymers for Biological Detection and Delivery. *ACS Macro Lett.* 2016;5(1):14-18. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00862.
8. Molina M, Asadian-Birjand M, Balach J, Bergueiro J, Miceli E, Calderón M. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 2015;44:6161-6186.
9. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater.* 2013;12(11):991-1003. doi:10.1038/NMAT3776.
10. Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem Soc Rev.* 2016;45(5):1457-1501. doi:10.1039/C5CS00798D.
11. Bergueiro J, Calderón M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications. *Macromol Biosci.* 2014:1-17. doi:10.1002/mabi.201400362.
12. Zhang Q, Vancoillie G, Mees MA, Hoogenboom R. Thermoresponsive polymeric temperature sensors with broad sensing regimes. *Polym Chem.* 2015;6(13):2396-2400. doi:10.1039/C4PY01747A.
13. Molina M, Giulbudagian M, Calderón M. Positively charged thermoresponsive nanogels for anticancer drug delivery. *Macromol Chem Phys.* 2014;215(24):2414-2419. doi:10.1002/macp.201400286.
14. Jochum FD, Theato P. Temperature- and light-responsive smart polymer materials. *Chem Soc Rev.* 2013;42(17):7468-7483. doi:10.1039/C2CS35191A.
15. Cuggino JC, Álvarez I. Cl, Strumia MC, et al. Thermosensitive nanogels based on dendritic

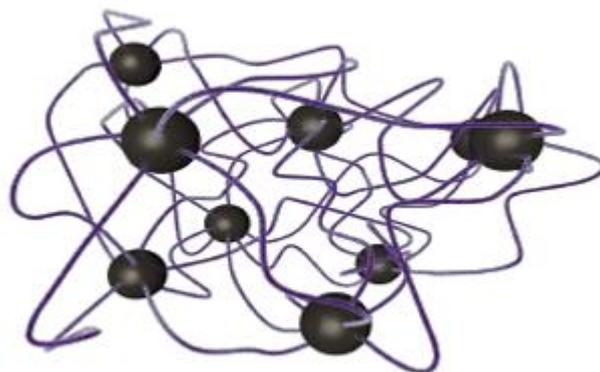
- polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications. *Soft Matter*. 2011;7(23):11259. doi:10.1039/c1sm06357j.
16. Vihola H, Laukkanen A, Valtola L, Tenhu H, Hirvonen J. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly (N -isopropylacrylamide), poly (N -vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly (N -vinylcaprolactam). *Biomacromolecules*. 2005;26:3055-3064. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.008.
  17. Wang X, Wu C. Light-scattering study of coil-to-globule transition of a poly(N-isopropylacrylamide) chain in deuterated water. *Macromolecules*. 1999;32(13):4299-4301. doi:10.1021/ma9902450.
  18. Wang X, Qiu X, Wu C. Comparison of the Coil-to-Globule and the Globule-to-Coil Transitions of a Single Poly( N -isopropylacrylamide) Homopolymer Chain in Water. *Macromolecules*. 1998;31(9):2972-2976. doi:10.1021/ma971873p.
  19. Xia Y, Burke NAD, Stöver HDH. End group effect on the thermal response of narrow-disperse poly(N-isopropylacrylamide) prepared by atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*. 2006;39(6):2275-2283. doi:10.1021/ma0519617.
  20. Vancoillie G, Frank D, Hoogenboom R. Thermoresponsive poly(oligo ethylene glycol acrylates). *Prog Polym Sci*. 2014;39(6):1074-1095. doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.02.005.
  21. Lutz J-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *J Polym Sci Part A Polym Chem*. 2008;46(11):3459-3470. doi:10.1002/pola.22706.
  22. Ali MM, Stoeber HDH. Well-Defined Amphiphilic Thermosensitive Copolymers Based on Poly(ethylene glycol monomethacrylate) and Methyl Methacrylate Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. [ Erratum for Volume 37, Number 14, July 13, 2004, pp 5219-5227. ]. *Macromolecules*. 2004;37(23):8812. doi:10.1021/ma0481151.
  23. Sugihara S, Kanaoka S, Aoshima S. Double thermosensitive diblock copolymers of vinyl ethers with pendant oxyethylene groups: Unique physical gelation. *Macromolecules*. 2005;38(5):1919-1927. doi:10.1021/ma048409m.
  24. Zhao B, Li D, Hua F, Green DR. Synthesis of thermosensitive water-soluble polystyrenics with pendant methoxyoligo(ethylene glycol) groups by nitroxide-mediated radical polymerization. *Macromolecules*. 2005;38(23):9509-9517. doi:10.1021/ma0514572.
  25. Lutz J-F. Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform. *Adv Mater*. 2011;23(19):2237-2243. doi:10.1002/adma.201100597.
  26. Lutz JF, Weichenhan K, Akdemir Ö, Hoth A. About the phase transitions in aqueous solutions of thermoresponsive copolymers and hydrogels based on 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*. 2007;40(7):2503-2508. doi:10.1021/ma062925q.
  27. Hoth A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST : Is the Age of Poly ( NIPAM ) Over ? 2006:13046-13047. doi:10.1021/ja065324n.
  28. Cai T, Marquez M, Hu Z. Monodisperse thermoresponsive microgels of poly(ethylene

- glycol) analogue-based biopolymers. *Langmuir*. 2007;23(17):8663-8666. doi:10.1021/la700923r.
29. McPhee W, Tam KC, Pelton R. Poly(N-isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium DodecylSulfate. *J Colloid Interface Sci*. 1993;156:24-30. doi:10.1006/jcis.1993.1075.
  30. Montoro SR, Medeiros S de F, Alves GM. *Nanostructured Hydrogels*. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-1-4557-3159-6.00010-9.
  31. Varaprasad K, Sadiku ER, Ramam K, Jayaramudu J, Reddy GSM. *Significances of Nanostructured Hydrogels for Valuable Applications*. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-1-4557-3159-6.00008-0.
  32. Kaboorani A, Riedl B, Blanchet P. Ultrasonication technique: A method for dispersing nanoclay in wood adhesives. *J Nanomater*. 2013;2013(1). doi:10.1155/2013/341897.
  33. Karthikeyan S, Sijbesma RP. Addendum: Mechanochemistry: Forcing a molecule's hand. *Nat Chem*. 2015;7(5):463-463. doi:10.1038/nchem.2246.
  34. Ultrasonics: Applications and Processes. <https://www.hielscher.com/technolo.htm#91493>.
  35. Cao Z, Ziener U. Synthesis of nanostructured materials in inverse miniemulsions and their applications. *Nanoscale*. 2013;5(21):10093-10107. doi:10.1039/c3nr03190j.
  36. Antonietti M, Landfester K. Polyreactions in Miniemulsions. *Prog Polym Sci*. 2002;27(4):689-757. doi:10.1016/S0079-6700(01)00051-X.
  37. Myers D. *Surfactant Science and Technology*; 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
  38. Kowalczyk A, Trzcinska R, Trzebicka B, Müller AHE, Dworak A, Tsvetanov CB. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. *Prog Polym Sci*. 2014;39(1):43-86. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.10.004.
  39. Di Corato R, Béalle G, Kolosnjaj-Tabi J, et al. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. *ACS Nano*. 2015;9(3):2904-2916. doi:10.1021/nn506949t.
  40. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93(March):52-79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
  41. Peng J, Qi T, Liao J, et al. Synthesis and characterization of novel dual-responsive nanogels and their application as drug delivery systems. *Nanoscale*. 2012;4(8):2694. doi:10.1039/c2nr30147d.
  42. Kietzke T, Neher D, Landfester K, Montenegro R, Güntner R, Scherf U. Novel approaches to polymer blends based on polymer nanoparticles. *Nat Mater*. 2003;2(6):408-412. doi:10.1038/nmat889.
  43. Schiller R, Weiss CK, Geserick J, Hüsing N, Landfester K. Synthesis of mesoporous silica particles and capsules by miniemulsion technique. *Chem Mater*. 2009;21(21):5088-5098. doi:10.1021/cm901858v.
  44. Singh AK, Fernando SD, Hernandez R. Base-catalyzed fast transesterification of soybean

- oil using ultrasonication. *Energy and Fuels*. 2007;21(2):1161-1164. doi:10.1021/ef060507g.
45. Jenifer AC, Sharon P, Prakash A, Sande PC. A Review of the Unconventional Methods Used for the Demetallization of Petroleum Fractions over the Past Decade. *Energy and Fuels*. 2015;29(12):7743-7752. doi:10.1021/acs.energyfuels.5b00826.
  46. Arvidsson R, Kushnir D, Sandén BA, Molander S. Prospective life cycle assessment of graphene production by ultrasonication and chemical reduction. *Environ Sci Technol*. 2014;48(8):4529-4536. doi:10.1021/es405338k.
  47. Küçük B, Özkan N, Volkan M. Influence of ultrasonically assisted synthesis on particle size of magnetic nanoparticles. *J Phys Chem Solids*. 2013;74(10):1426-1432. doi:10.1016/j.jpcs.2013.04.027.
  48. Zhang JL, Han BX, Liu MH, et al. Ultrasonication-induced formation of silver nanofibers in reverse micelles and small-angle X-ray scattering studies. *J Phys Chem B*. 2003;107(16):3679-3683. doi:10.1021/jp026738f.
  49. Bloemen M, Brullot W, Luong TT, Geukens N, Gils A, Verbiest T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Nanopart Res*. 2012;14(9):1100. doi:10.1007/s11051-012-1100-5.
  50. Ishizone T, Han S, Okuyama S, Nakahama S. Synthesis of water-soluble polymethacrylates by living anionic polymerization of trialkylsilyl-protected oligo(ethylene glycol) methacrylates. *Macromolecules*. 2003;36:42-49. doi:10.1021/ma021257f.
  51. Dong H, Matyjaszewski K. Thermally Responsive P(M(EO)<sub>2</sub> MA- co -OEOMA) Copolymers via AGET ATRP in Miniemulsion. *Macromolecules*. 2010;43(10):4623-4628. doi:10.1021/ma100570s.
  52. Lutz JF, Hoth A. Preparation of ideal PEG analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*. 2006;39(2):893-896. doi:10.1021/ma0517042.

# Capítulo 5

## NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES MEDIANTE POLIMERIZACIÓN RADICALARIA NO CONTROLADA





## 5.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han desarrollado diversos dispositivos para liberación controlada de fármacos con usos potenciales en el tratamiento del cáncer.<sup>1</sup> Dentro de estos sistemas se encuentran los nanogeles inteligentes.<sup>2</sup> En particular, los nanogeles termosensibles son de gran interés ya que, con temperaturas de transición de fase alrededor de 39-40 °C, podrían circular por los vasos sanguíneos sanos cuya temperatura es de 37 °C para posteriormente colapsar en el tejido tumoral donde las temperaturas son sensiblemente más elevadas (42 °C).<sup>3</sup>

Asimismo, la incorporación de nanopartículas magnéticas (MNP) a la red polimérica presentaría distintas ventajas tales como aumentar la estabilidad de las nanopartículas en solución y combinar las propiedades intrínsecas del nanogel como el alto contenido de agua, buenas propiedades mecánicas y biocompatibilidad sumado al comportamiento superparamagnético de las nanopartículas. Por ello, estos sistemas pueden ser utilizados como agentes de contraste para diagnóstico por imagen, terapia guiada, para liberación controlada de fármacos o para hipertermia resultando de gran interés la síntesis de nanomateriales híbridos magneto-poliméricos.<sup>4</sup>

En este contexto es que la investigación de estos sistemas ha atraído el interés de la comunidad científica. Así, en la actualidad existen distintos nanodispositivos que combinan las MNPs con una capa polimérica termosensible. Estos han demostrado ser sistemas de liberación de fármacos activados tanto mediante la aplicación de un campo magnético alternante (CMA) como por efecto de la temperatura. El calor generado por las MNPs bajo un CMA aumenta la temperatura de los nanogeles por encima de su  $T_{tr}$ , generando el colapso de la red y, por lo tanto, mejora la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica.<sup>5</sup> Algunos ejemplos son las nanopartículas tipo “*core-brush*”, los nanocompuestos, los liposomas magnéticos y los nanogeles magnéticos.<sup>6</sup>

Para obtener nanogeles magnéticos, las MNPs pueden incorporarse de distintas maneras a la matriz polimérica. De manera general, pueden mencionarse cuatro formas. La incorporación más simple es la inmersión de la matriz polimérica seca en una suspensión magnética para que al hincharse, absorba las MNPs.<sup>7</sup> Otras formas de incorporar las MNPs de manera física son mediante la síntesis *in situ* del nanogel en presencia de una solución de MNPs<sup>8,9</sup> o la síntesis *in situ* de las MNPs en una dispersión del nanogel.<sup>10</sup> El inconveniente principal de este enfoque es que las MNPs se pueden desorber bastante fácilmente. Para superar esta desventaja, las MNPs pueden incorporarse de manera covalente permitiendo así una unión más estable.<sup>11,12</sup>

Hasta el momento, pueden encontrarse algunos reportes de nanogeles híbridos donde las MNPs de óxido de hierro son incorporadas de manera física, ya sea cargando las MNPs en el

nanogel o bien realizando la síntesis *in situ* de las mismas. Para la obtención de estos sistemas, se han utilizados distintos monómeros tales como NIPA,<sup>9,13,14</sup> VCL,<sup>15</sup> AM,<sup>16</sup> quitosano<sup>17,18</sup>. En particular, Liu y colaboradores<sup>9</sup> sintetizaron un NG de PNIPA cargado con MNPs de magnetita y demostraron la potencial capacidad del sistema para la liberación controlada de fármacos utilizando como estímulo la irradiación NIR. Sin embargo, existen pocos antecedentes de la incorporación covalente de MNPs a la matriz polimérica. Chen y colaboradores<sup>11</sup> modificaron las MNPs de magnetita con un agente silano con terminales vinilos para utilizarlo como entrecruzante de nanogeles de PNIPA. Los mismos fueron obtenidos a través de la metodología de termoprecipitación convencional con un tiempo de reacción mayor a 12 h. Los tamaños de los nanogeles variaban entre 100 y 500 nm teniendo un grado de polidispersidad y estos sistemas presentaron un comportamiento termosensible con una  $T_{tr}$  alrededor de 35 °C siendo esta temperatura menor a la temperatura en que se encuentra las células de un tejido enfermo que como ya se ha mencionado, se encuentra alrededor de los 42 °C.<sup>19</sup> Estas características como largo tiempo de reacción, poco control del tamaño y una temperatura de transición de fase baja presentarían una desventaja a la hora de utilizarlos como nanodispositivos.

Por otro lado, se han encontrado pocos antecedentes del uso de monómeros derivados del OEG, tales como MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA para la síntesis de nanogeles híbridos.<sup>20</sup> Boullaras y su equipo de investigación<sup>21,22</sup> demostraron la exitosa formación de microgeles con estos monómeros junto con la incorporación física de MNPs de magnetita. Los mismos se sintetizaron mediante polimerización por precipitación convencional y sus tamaños fueron de aproximadamente 500 nm. Los nanogeles presentaron un comportamiento termosensible y estabilidad a lo largo del tiempo hasta 100 h. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado antecedentes de la incorporación covalente de MNP de magnetita como entrecruzante en nanogeles de OEG.

En este contexto es que en esta tesis se planteó la síntesis de nanogeles de OEG incorporando de manera covalente las nanopartículas magnéticas. Se estudió el alcance sintético de la metodología de síntesis de precipitación asistida por ultrasonificación desarrollada anteriormente para nanogeles en la obtención de nanogeles híbridos. Algunas de las principales motivaciones para el empleo de esta técnica para la obtención de nanogeles magnéticos es el control de su tamaño, el tiempo breve de reacción y la simplicidad del método. Hasta el momento, no hay ningún otro antecedente sobre el empleo de la ultrasonificación para la síntesis de nanogeles híbridos y su influencia en la polidispersidad.

## 5.2 OBJETIVOS

A partir del análisis de los antecedentes, se plantea el empleo de nanopartículas magnéticas (MNPs) como agente entrecruzante del sistema y el uso de ultrasonificación para la síntesis del mismo.

Luego de optimizar la síntesis por termoprecipitación asistida por ultrasonificación para nanogeles derivados del OEG (Capítulo 4), logrando un estricto control tanto en el tamaño como en la temperatura de transición de fase del NG,<sup>23</sup> se planteó el estudio de esta técnica para la síntesis de nanogeles híbridos. Para ello, se utilizó como sistema de estudio nanogeles de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA usando como co-monómero el 2-hidroxietil éter metacrilato (HEMA) y MNPs de óxido de hierro como agente entrecruzante.

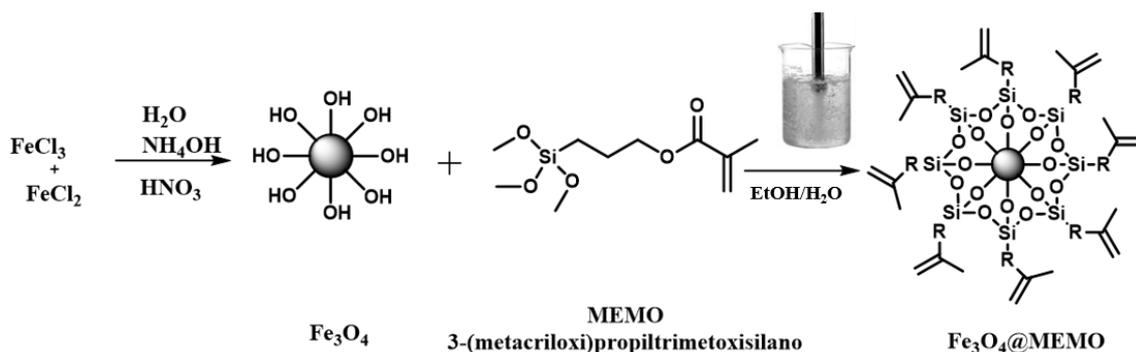
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar y modificar superficialmente nanopartículas magnéticas para su empleo como agente entrecruzante.
- Sintetizar mediante ultrasonificación nanogeles magnéticos y termosensibles. Analizar diversos parámetros para la optimización de las condiciones de síntesis.
- Caracterizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de los sistemas.
- Estudiar las propiedades de los nanogeles en medios biológicos
- Estudiar la liberación controlada de fármacos.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

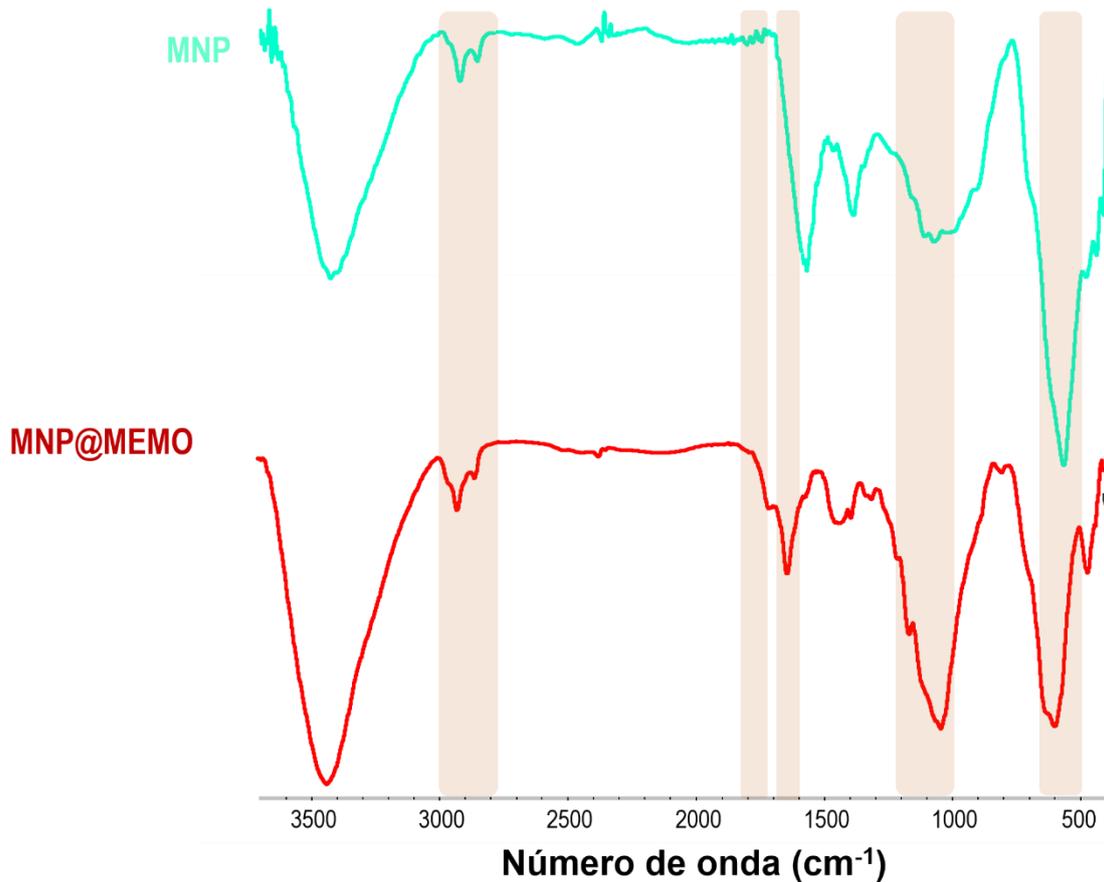
### 5.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas

Considerando que un agente entrecruzante debe tener al menos dos grupos vinílicos, se planificó la síntesis y modificación de las mismas con el agente silano 3-(metacriloxi)propil trimetoxisilano (MEMO) con dobles enlaces en su cadena carbonada. Así, al silanizar las nanopartículas, la superficie de las MNPs tendría grupos vinílicos.



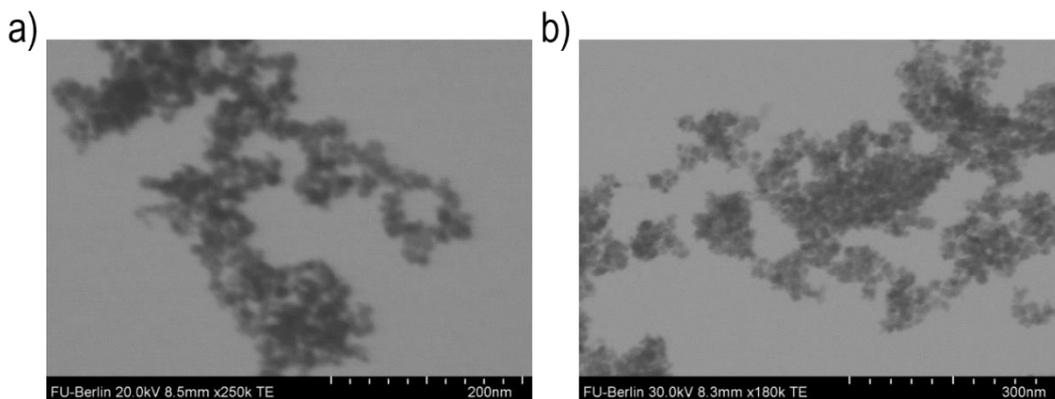
**Figura 5.1** Esquema de síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas.

En la Figura 5.1 se encuentra un esquema de la síntesis y modificación de las nanopartículas magnéticas. En una primera etapa se realizó la síntesis de las MNPs en base a una modificación de una metodología de coprecipitación de sales de hierro ya reportada (Materiales y métodos 3.2.1) a partir de  $\text{FeCl}_2$  y  $\text{FeCl}_3$ .<sup>24</sup> Mediante espectroscopia FT-IR se demostró la presencia de magnetita debido a la aparición de la banda a  $560\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión Fe-O de la magnetita como se observa en la Figura 5.2.<sup>25,26</sup>



**Figura 5.2** Espectros FT-IR de MNP (verde) y MNP@MEMO (rojo) las bandas destacadas en rosa indican las señales relevantes en el espectro.

Para evaluar la morfología y tamaño de las nanopartículas sintetizadas se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes se muestran en la Figura 5.3. Puede observarse que se obtuvieron partículas esféricas y con poca polidispersidad con un tamaño promedio de  $10 \pm 3$  nm (Figura 5.3 a).



**Figura 5.3** Imágenes TEM de a) MNP y b) MNP@MEMO.

Para la modificación superficial de las MNP con grupos vinilos se llevó a cabo la silanización de las mismas con MEMO mediante una metodología ya reportada, aunque se mejoró la misma mediante el uso de ultrasonificación (Materiales y métodos 3.2.3.1).<sup>27</sup> Se utilizó un ultrasonificador de punta para incrementar la energía para el proceso de modificación superficial y para prevenir el agregado de las MNPs. Esta nueva metodología permitió una modificación exitosa a muy corto tiempo de reacción (10 minutos). Se confirmó mediante TEM que el tamaño de las nanopartículas no se vio alterado por la modificación con el silano (Figura 5.3 b).

La incorporación del agente silano MEMO en las MNPs se corroboró mediante espectroscopia FT-IR. En la Figura 5.2 se encuentran tanto el espectro IR de las nanopartículas sin modificar como las silanizadas.

El espectro correspondiente a las MNPs silanizadas, muestra las señales características de la tensión Fe-O de la magnetita, y además aparecen cuatro señales nuevas, denotadas con una banda rosa. Alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda correspondiente a la tensión Si-O de los silanos. Asimismo, pueden observarse las señales características de la cadena carbonada del silano: a  $2916\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento C-H alifático, a  $1735\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento C=O del éster y alrededor de  $1680\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al enlace C=C. A partir del análisis, puede concluirse que la nanopartícula ha sido exitosamente silanizada. El hecho de poder observar la señal característica del doble enlace permite afirmar que la nanopartícula ha sido modificada con terminales vinilos para su posterior utilización como agente entrecruzante.

Con el fin propuesto, se estudió la potencial aplicación de las nanopartículas para el tratamiento por hipertermia. Para ello, se realizaron medidas de magnetización a distintas temperaturas (300 K, 310 K, 318 K, 323 K) para las MNPs y para las MNP@MEMO. Todos los estudios de magnetización se realizaron en colaboración con el Dr. Bastian Klemke del Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie de Berlín, Alemania. De manera representativa, en la Figura 5.4 se encuentran los resultados obtenidos para la magnetización en función de un campo magnético externo a 300 K.

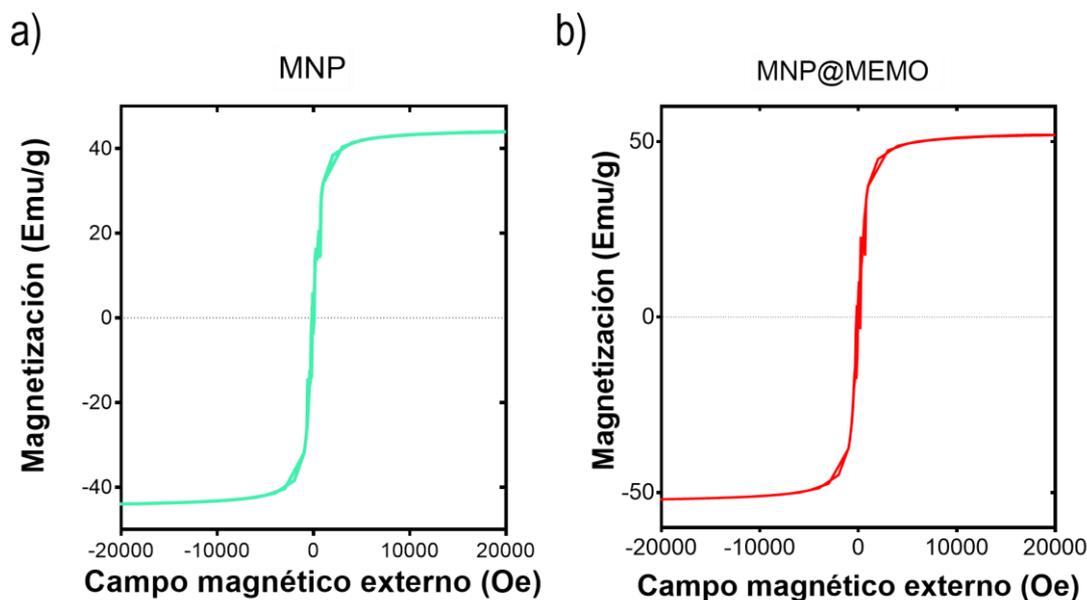
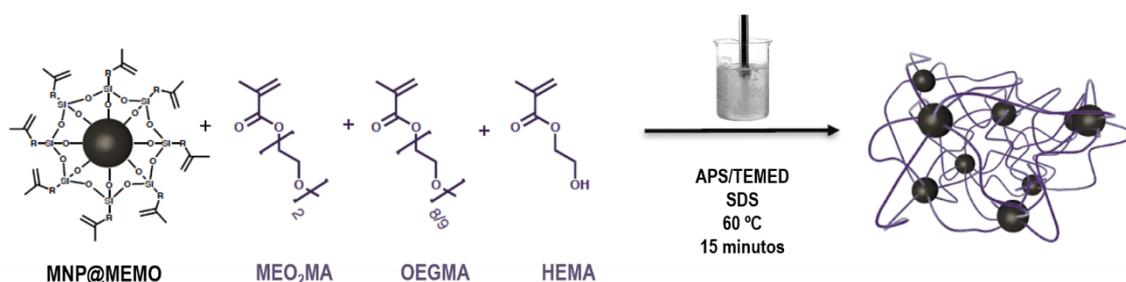


Figura 5.4 Medidas de magnetización de a) MNP y b) MNP@MEMO a 300 K.

En ambos casos, no se observaron ciclos de histéresis a ninguna de las temperaturas ya que la coercitividad y magnetización remanente son nulas. Esto se debe al carácter superparamagnético de las MNPs ya que, al ser tan pequeñas, la energía de anisotropía que mantiene la magnetización alineada es comparable con  $kT$  por lo que la energía térmica puede superar la “fuerza anisotrópica” y revertir la magnetización de la partícula de una dirección a otra, inclusive en ausencia de un campo magnético.

### 5.3.2 Síntesis de nanogeles magnéticos y termosensibles

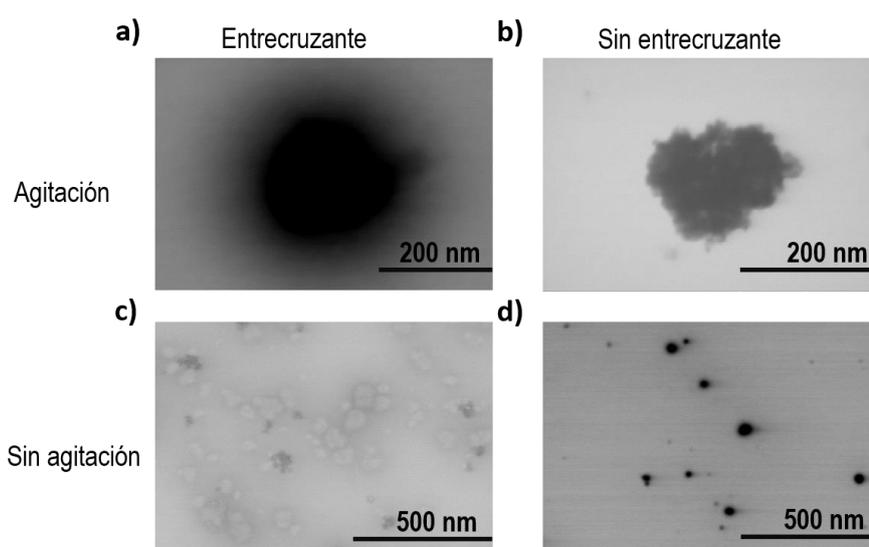
Una vez funcionalizadas las MNPs, y habiendo comprobado la modificación de las nanopartículas con los grupos vinilos, se evaluó la capacidad de las mismas para actuar como agente entrecruzante. Para ello, se estudió la síntesis de nanogeles híbridos. Considerando que en el capítulo anterior se obtuvieron exitosamente nanogeles derivados de OEG utilizando como co-monomero HEMA con un gran control del tamaño y de la  $T_{tf}$ , se decidió estudiar nanogeles magnéticos (MNGs) utilizando nuevamente como monómeros el MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA, co-monomero HEMA y entrecruzante MNP@MEMO (Materiales y métodos 3.2.6.2). El esquema de reacción se indica en la Figura 5.5.



**Figura 5.5** Esquema general de síntesis de nanogel magnético y termosensible asistida por ultrasonificación.

En una primera instancia, se evaluó la función de las MNP@MEMO como entrecruzante del nanogel, estudiando la síntesis de los MNGs con las MNP@MEMO en presencia y ausencia de TEGDMA como segundo entrecruzante. Asimismo, se analizó la influencia de la agitación magnética para cada caso. La relación molar MEO<sub>2</sub>MA: OEGMA 8:2 y 4 mol% de HEMA se mantuvieron constante. Los nanogel fueron sintetizados mediante la metodología de ultrasonificación explicada en el capítulo anterior.<sup>23</sup> De forma general, se colocaron todos los reactivos junto con el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS) y el activador tetrametiletilendiamina (TEMED) y las MNP@MEMO en agua para luego calentarla a 60 °C. Finalmente, se ultrasonificó 6 veces (1 min) discontinuamente al 70% de potencia durante 15 minutos y se purificó mediante separación magnética y posterior diálisis.

Las imágenes TEM de los nanogel obtenidos bajo las diferentes condiciones se muestran en la Figura 5.6.



**Figura 5.6** Imágenes TEM de nanogel magnéticos a) con TEGDMA y agitación, b) sin TEGDMA y agitación, c) con TEGDMA y sin agitación, d) sin TEGDMA y sin agitación.

Al analizar aquellos MNGs sintetizados sin emplear agitación magnética, se observó que independientemente que se utilizara TEGDMA o no, se obtuvieron nanogeles polidispersos. Para el caso del empleo de TEGDMA (Figura 5.6 c) se observaron dos poblaciones de nanogeles que se observan en la diferencia de contraste, uno con nanopartículas magnéticas (oscuros) y otros compuestos puramente por polímero (claros) y para los MNGs sintetizados solo con las MNP@MEMO como agente entrecruzante se observó la presencia de MNGs de distintos tamaños. Por otro lado, analizando los MNGs sintetizados bajo agitación magnética con o sin TEGDMA (Figura 5.6 a y b), no se observó ninguna diferencia siendo en ambos casos monodispersos. Por lo tanto, al no observarse ninguna ventaja en el empleo de TEGDMA como agente entrecruzante adicional se decidió emplear solamente las nanopartículas magnéticas silanizadas. Esto permite concluir que el empleo solo de MNP@MEMO como entrecruzante es suficiente para la síntesis exitosa de los MNGs y confirmar la función de las mismas como entrecruzante covalente del nanogel.

Los MNGs obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopia FT-IR. Como se observa en la Figura 5.7, el espectro FT-IR confirma la síntesis exitosa de los mismos debido a la presencia de las bandas características a  $2916\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento de C-H alifático y  $1735\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento C=O del éster, así como la tensión Fe-O alrededor de  $560\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la magnetita y la banda alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del enlace Si-O del silano. Alrededor de  $1680\text{ cm}^{-1}$  una señal que corresponde a la vibración C=C que puede atribuirse a la presencia de grupos vinilos en la nanopartícula que no reaccionaron.

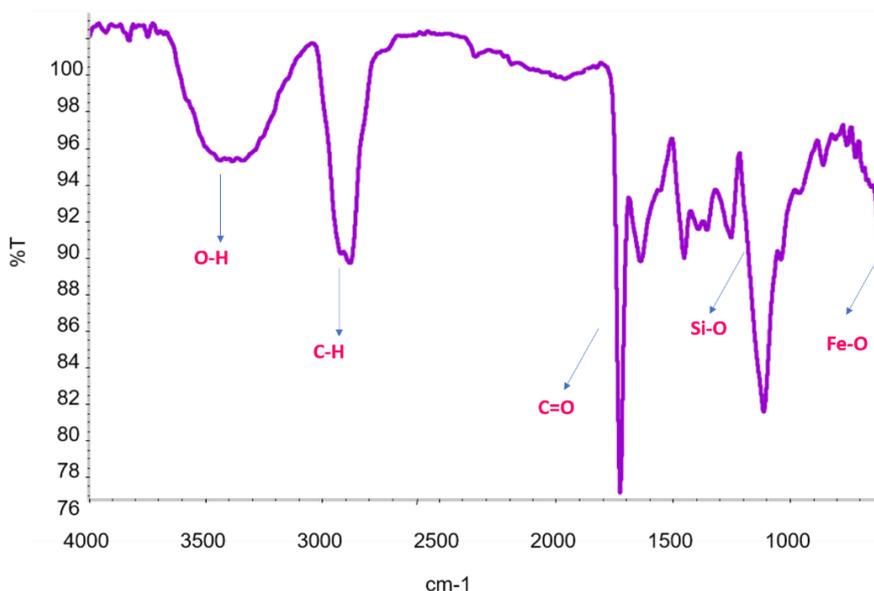


Figura 5.7 Espectro FT-IR del MNG.

Para comprobar el comportamiento termosensible del sistema, se realizó una turbidimetría mediante espectrofotometría UV-Vis. En la Figura 5.8 se puede observar los resultados obtenidos. Se demostró la termosensibilidad del MNG encontrándose una  $T_{tf}$  de 46,5 °C. Ahora bien, teniendo en cuenta el valor obtenido para el nanogel compuesto por MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA (Capítulo 4, Tabla 4.2, NG 5), de 47,9 °C, no se observa un gran cambio en la  $T_{tf}$  debido a la incorporación de las MNP@MEMO en la matriz polimérica.

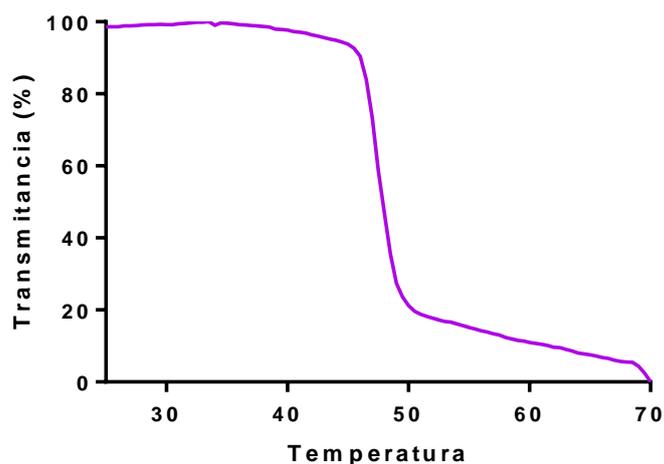


Figura 5.8 Turbidimetría del MNG.

### 5.3.3 Análisis de las propiedades de los nanogelés magnéticos y termosensibles

Para continuar optimizando las condiciones de síntesis, se estudió la síntesis de nanogelés magnéticos y termosensibles analizando tanto la influencia de la cantidad de nanopartículas utilizadas como la relación molar entre los monómeros en el tamaño y  $T_{tf}$  de los nanogelés. Con este estudio se analizan las variables que afectan directamente en el tamaño y comportamiento termosensible del sistema para así lograr un mayor control en la síntesis de los mismos.

En la Tabla 5.1 se presenta un resumen de los nanogelés obtenidos, con sus  $T_{tf}$  y tamaños. Además, se informa la relación molar y cantidad de MNP@MEMO empleados en cada caso.

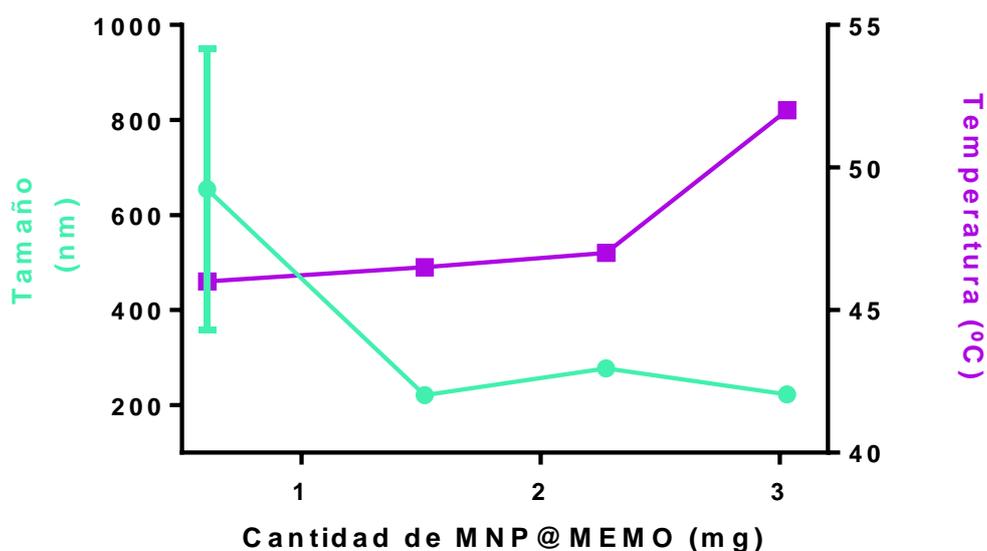
**Tabla 5.1** Resumen de las características de los MNGs sintetizados.

Muestra	Relación molar MEO <sub>2</sub> MA:OEGMA	MNP@MEMO (mg)	T <sub>tf</sub> (°C)	Tamaño DLS (nm) 25 °C
MNG 1	8 : 2	0,6	46	(6±3) x10 <sup>2</sup>
MNG 2	8 : 2	1,5	46,5	221±6
MNG 3	8 : 2	2,3	47	(28±1) x10 <sup>1</sup>
MNG 4	8 : 2	3,0	52	222±3
MNG 5	7 : 3	1,5	60	253±2
MNG 6	9 : 1		40	(28±2) x10 <sup>1</sup>
MNG 7	9,5 : 0,5		36	(35±9) x10 <sup>1</sup>
MNG 8	10:0		30	(18±5) x10 <sup>1</sup>

### 5.3.3.1 Análisis del efecto de las MNP@MEMO en el tamaño y T<sub>tf</sub> de los MNG

Considerando la hipótesis de que la nanopartícula actúa como entrecruzante, se analizó la influencia de la cantidad utilizada en el tamaño obtenido del nanogel. Para tal fin, se evaluaron 4 valores de MNP@MEMO utilizada: 0,6 mg; 1,5 mg; 2,3 mg y 3 mg (Tabla 5.1, MNG 1-4). Además, siendo las MNP@MEMO hidrofílicas, se evaluó el efecto de la misma en la T<sub>tf</sub> del nanogel.

En la Figura 5.9 se encuentra un gráfico de la variación del tamaño y de la T<sub>tf</sub> en función de la cantidad de MNP@MEMO. En línea violeta representa la tendencia de la temperatura de transición de fase mientras que, en la verde, el tamaño.



**Figura 5.9** Gráfico de tamaño y  $T_{tr}$  en función de la cantidad de MNP@MEMO con sus respectivos errores.

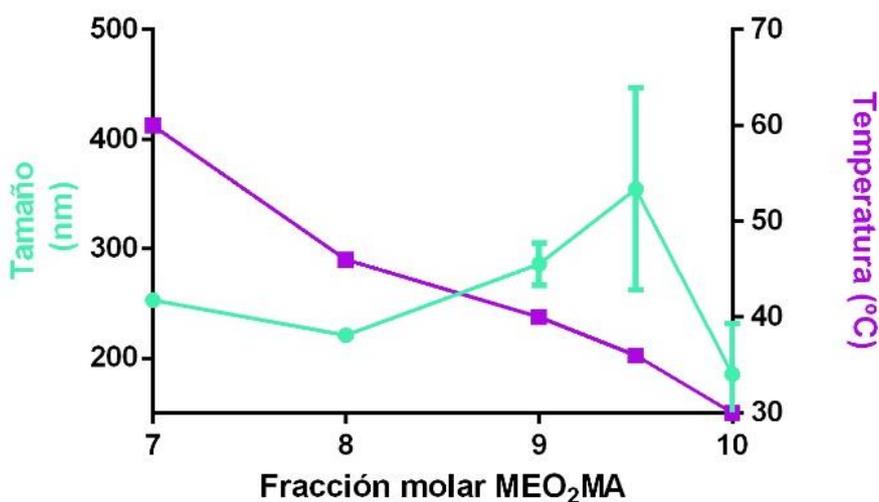
Los tamaños de los nanogelés obtenidos con distinta cantidad de MNP@MEMO en dispersión acuosa fueron determinados mediante DLS. Los mismos se encontraron en un rango entre 200 y 600 nm. Se observó como tendencia general que al aumentar la cantidad de MNP@MEMO utilizada en la síntesis, el tamaño del MNG disminuye (línea verde). Este comportamiento es el esperado ya que, en una matriz polimérica al aumentar los sitios de unión de las cadenas poliméricas (agente entrecruzante), la red se contrae. Entonces, al comportarse la nanopartícula como entrecruzante, si se incrementa su porcentaje, se espera que el tamaño de los nanogelés disminuya. Este hecho presentaría una primera evidencia de que MNP@MEMO han sido incorporadas de manera covalente al sistema. Asimismo, se encontró una muy baja estabilidad del sistema para MNG 1. Cabe destacar que la solución de MNG 2 presentó una gran estabilidad coloidal siendo aún estable por más de un año.

Por otro lado, se determinó mediante turbidimetría el comportamiento termosensible de los MNGs. Aquellos nanogelés con mayor cantidad de nanopartículas presentaron una  $T_{tr}$  más alta (MNG 4  $T_{tr}$ = 52 °C) mientras que aquellos sintetizados con menores cantidades mostraron una  $T_{tr}$  menor (MNG 1  $T_{tr}$ = 46 °C). Esta tendencia puede ser explicada debido a la naturaleza hidrofílica de las MNP@MEMO.

Para continuar con el análisis de los MNGs, se eligió 1,5 mg como cantidad óptima de MNP@MEMO ya que ésta presenta buenas propiedades tales como su tamaño,  $T_{tr}$  y su estabilidad coloidal.

### 5.3.3.2 Análisis del efecto de la relación molar de los monómeros en el tamaño y $T_{tr}$ de los MNG

Una vez establecida la cantidad óptima de nanopartículas, se prosiguió con el análisis de la relación molar utilizada (Tabla 6.1, MNG 2,5-8). En la Figura 5.10 se muestra el gráfico de las  $T_{tr}$  (violeta) y los tamaños (verde) obtenidos para los MNGs sintetizados.



**Figura 5.10** Gráfico de tamaño y  $T_{tr}$  en función de la fracción molar de MEO<sub>2</sub>MA con sus respectivos errores.

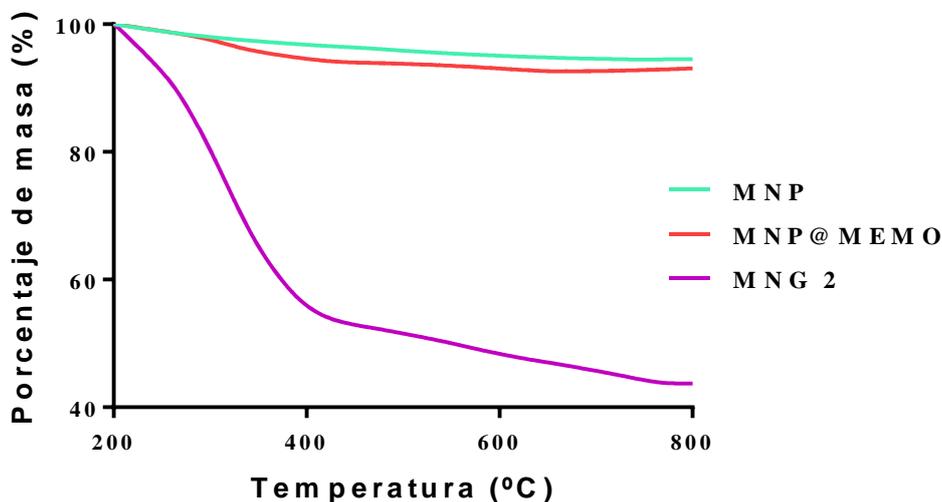
Nuevamente, los tamaños en dispersión acuosa de los nanogel magnéticos y termosensibles obtenidos con distintas relaciones molares fueron determinados mediante DLS. Los tamaños se encontraron entre 200 nm y 400 nm. No se encontró ninguna tendencia en cuanto al tamaño. Asimismo, se observó que al aumentar la fracción molar del monómero hidrofóbico, MEO<sub>2</sub>MA, la estabilidad coloidal del sistema se veía disminuida.

Los resultados para las  $T_{tr}$  demostraron la correlación previamente observada: el aumento de OEGMA y el incremento de la  $T_{tr}$ . Cabe destacar que, en estos sistemas híbridos, las temperaturas obtenidas son mayores que las de los nanogel sin nanopartículas debido a la naturaleza hidrofílica de las nanopartículas. Las  $T_{tr}$  se encontraron en el rango de 30 °C (MNG 8) a 60 °C (MNG 5).

A partir del análisis realizado, se concluyó que el MNG 2 presentaba las mejores condiciones tanto de  $T_{tr}$ , tamaño y gran estabilidad coloidal para su empleo en terapia combinada.

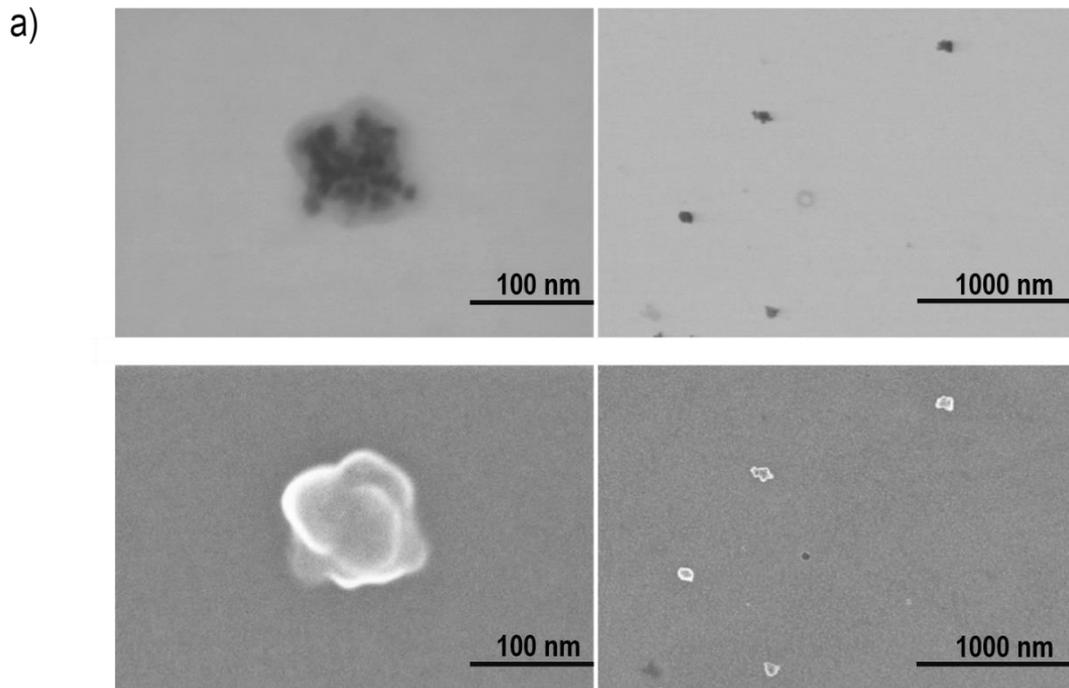
Con el propósito de estudiar el porcentaje polimérico presente en el MNG, se realizaron estudios de termogravimetría (TGA, por sus siglas en inglés) comparando los MNGs con las MNPs y MNP@MEMO. La Figura 5.11 muestra que el porcentaje de pérdida de masa de las MNPs sin

modificar (rojo) fue menor al 5 % cuando se las calentó desde temperatura ambiente hasta 800 °C, dicha pérdida se atribuyó principalmente a la presencia de impurezas. En cambio, para las nanopartículas ya silanizadas (verde) se observó una pérdida ligeramente mayor alrededor de un 7 % entre 230 y 400 °C que corresponde a la descomposición térmica progresiva del contenido orgánico que ocurre en varias etapas estrechamente relacionadas e indistinguibles. La misma puede ser atribuida a la pérdida de la cadena carbonada del silano. Por último, el perfil termogravimétrico del MNG (violeta) muestra también una pérdida entre 200 y 400 °C que puede ser atribuida a la descomposición térmica del contenido orgánico. En este caso, la pérdida es del 45 %. Por lo tanto, se evidenció que el 45 % en peso del sistema estudiado corresponde a la masa polimérica mientras que el 55 % corresponde a las nanopartículas de magnetita.

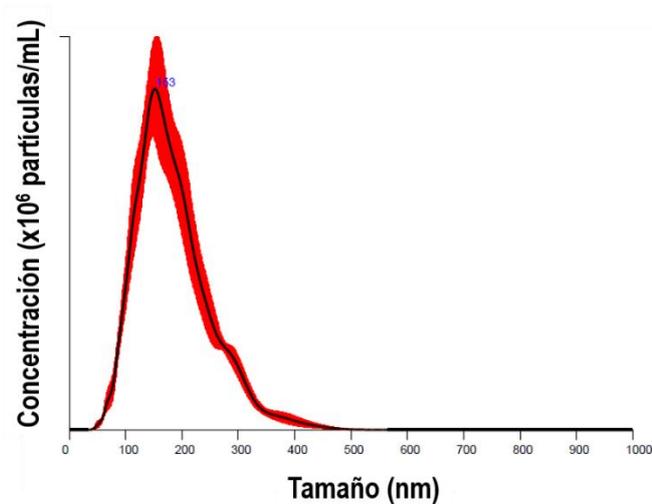


**Figura 5.11** Análisis termogravimétrico de MNP, MNP@MEMO y MNG 2.

Con el objetivo de analizar la morfología y el tamaño de los MNGs, los mismos se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM). Además, se determinó el tamaño hidrodinámico del MNG a través de medidas de NTA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.12.



b)

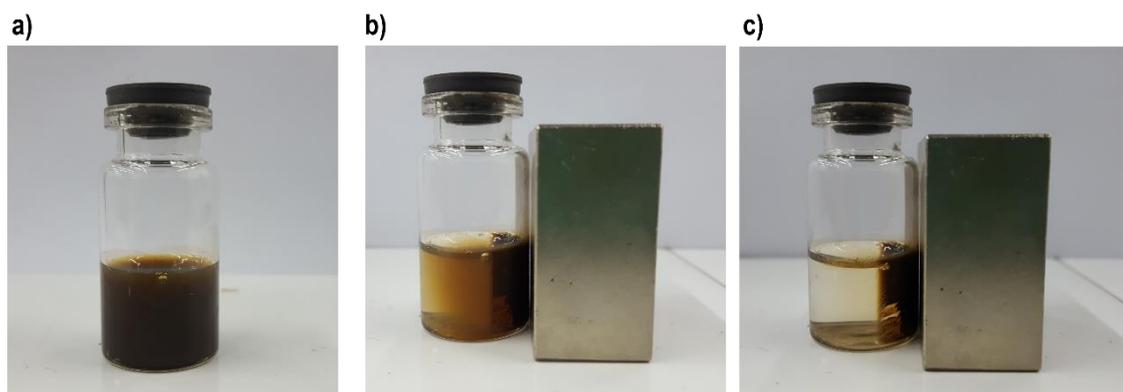


**Figura 5.12** a) Micrografías TEM (arriba)/SEM (abajo) y b) distribución de tamaños obtenidos por NTA de MNG 2.

Las imágenes de TEM y SEM (Figura 5.12 a) muestran que el nanogel presenta una morfología globular con una capa alrededor que puede atribuirse al material polimérico, y con tamaños alrededor de 150 nm. Asimismo, se puede observar en la distribución de tamaños una polidispersidad muy baja evidenciando la gran ventaja de utilizar ultrasonificación en la síntesis ya

que permite un gran control del tamaño de los MNGs. De manera similar, los tamaños obtenidos mediante NTA coincidieron con los tamaños obtenidos mediante TEM/SEM.

Asimismo, se analizó la estabilidad de los MNGs en dispersión acuosa y la separación magnética del mismo de la solución. En la Figura 5.13 se encuentran las fotografías de una solución de MNG sometida a un campo magnético a distintos tiempos.



**Figura 5.13** Fotografía de una dispersión de MNG 2 (1,6 mg/mL) en exposición a un campo magnético a tiempo a) 0 s, b) 30 s y c) 60 s.

Como se muestra en la Figura 5.13 a), la dispersión acuosa del MNG 2 es homogénea y resultó estable en el tiempo; con una estabilidad mayor a un año. Además, se demostró la fácil separación magnética del nanogel con un imán comercial tardando tan sólo 60 segundos en su total separación a esta concentración. Esta propiedad resulta de gran interés ya que permitiría la potencial aplicación del nanogel para la captura selectiva de alguna célula cancerosa y su posterior separación magnética.

#### 5.3.4 Respuesta del nanogel magnético y termosensible a estímulos externos

Para analizar el potencial uso de los MNGs como nanodispositivos con respuesta a estímulo (Figura 5.14), se realizaron estudios de magnetización e irradiación con infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés).

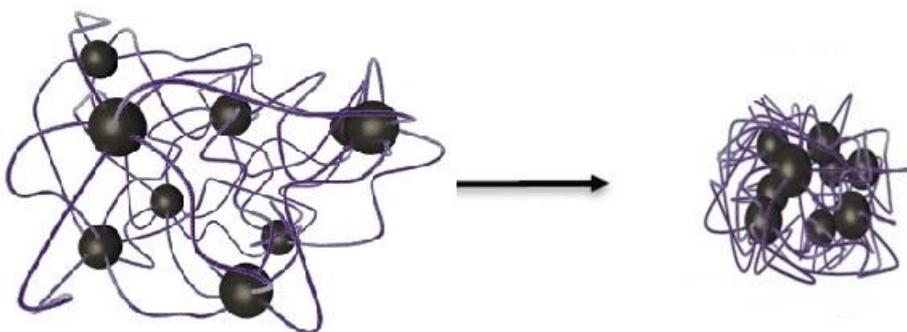


Figura 5.14 Esquema del cambio conformacional esperado del MNG en respuesta a un estímulo.

### 5.3.5.1 Estudios de magnetización

Para demostrar el comportamiento superparamagnético tanto de las MNPs como de los MNGs, se realizaron nuevamente medidas de magnetización en función del campo externo a distintas temperaturas (300 K, 310 K, 318 K, 323 K). En ambos sistemas se demuestra un comportamiento superparamagnético ya que no se observaron ciclos de histéresis a ninguna de las temperaturas estudiadas. De manera representativa, en la Figura 5.15 a) se observan los resultados obtenidos a 300 K. Además, se encontró que las MNPs presentaron una magnetización mayor que el MNG. Este resultado puede explicarse debido a que en la masa total medida para MNG, el 45 % corresponde al polímero, el cual no presenta propiedades magnéticas.

Asimismo, como el sistema contiene un polímero termosensible, se analizó el efecto de la temperatura en el comportamiento magnético del MNG (Figura 5.15b). La magnetización disminuye linealmente con la temperatura y no se vio afectada cerca de la  $T_{tf}$  del sistema.

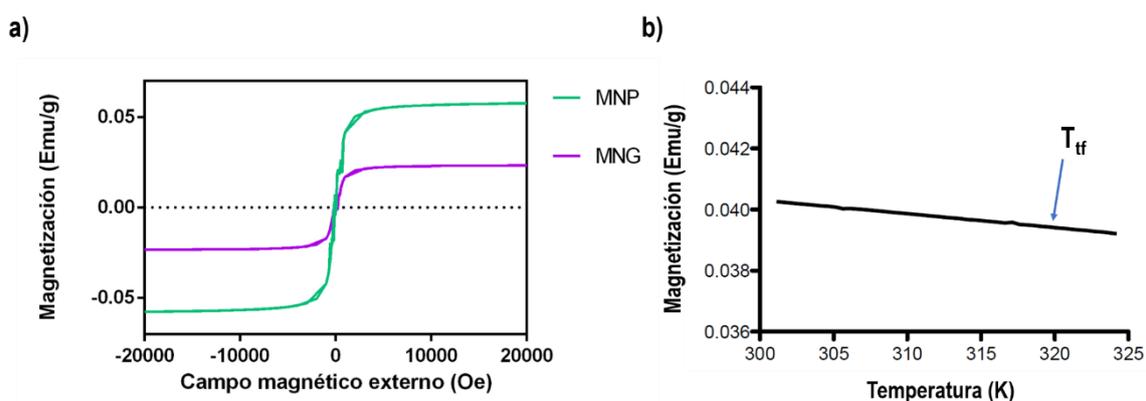
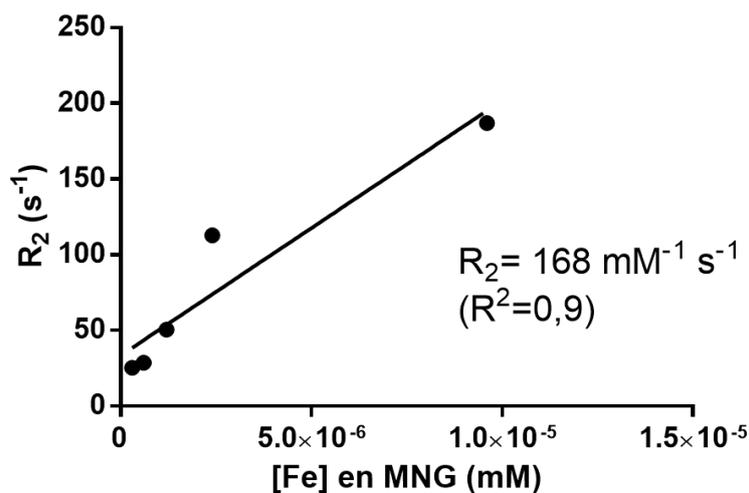


Figura 5.15 a) Magnetización vs campo magnético externo de MNPs (verde) y MNG (violeta) a 300 K, b) Magnetización del MNG vs temperatura.

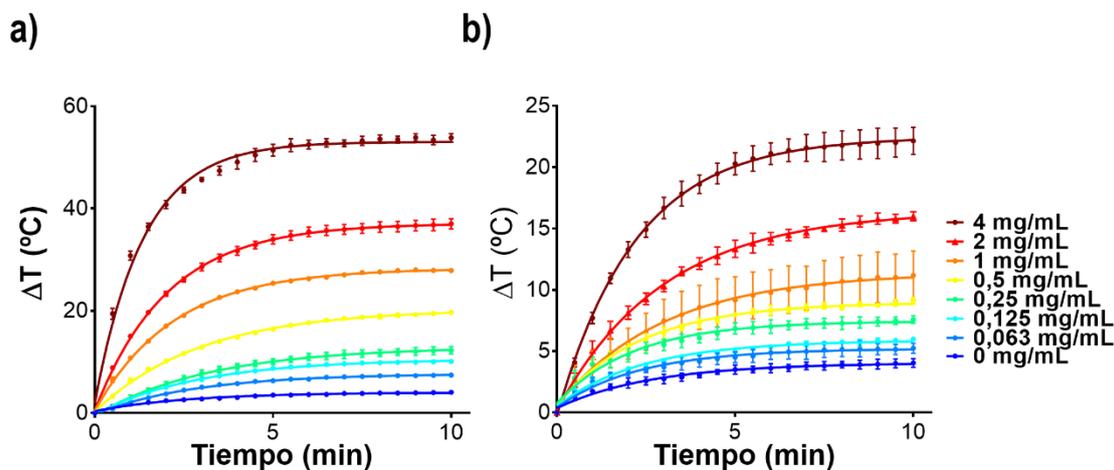
Por otra parte, para analizar el potencial uso del sistema como agente de contraste, se midieron los tiempos de relajación del sistema y se tomaron imágenes de resonancia magnética (IRM). Como se muestra en la Figura 5.16, se midieron los tiempos de relajación transversal ( $R_2 = 1 / T_2$ ) de distintas concentraciones de MNG 2. El valor de relajación  $R_2$  obtenido fue  $(17 \pm 3) \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , el cual cae en el rango en el que se encuentran los agentes de contrastes comerciales tales como el Feridex ( $120 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y el Resovist ( $189 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>28</sup>



**Figura 5.16** Imágenes de IRM y tiempos de relajación transversal  $R_2$  a distintas concentraciones de hierro.

### 5.3.5.1 Estudios de irradiación de infrarrojo cercano (NIR)

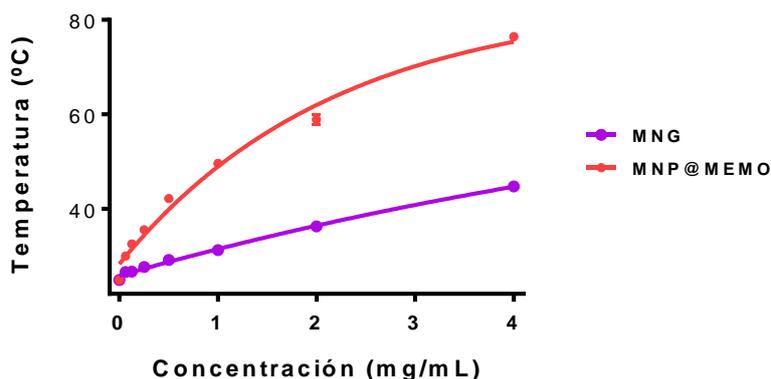
Para analizar la posibilidad de utilizar infrarrojo cercano como estímulo, se estudió la capacidad de generar calor mediante irradiación NIR tanto de las MNP@MEMO como los MNGs. El experimento se realizó irradiando la muestra con un láser de 785 nm según lo explicado en la Materiales y métodos 3.2.10. En la Figura 5.17 pueden observarse los resultados obtenidos.



**Figura 5.17** Incremento de temperatura alcanzada por la irradiación en función del tiempo a distintas concentraciones de a) MNP@MEMO y b) MNG al irradiar con un láser de 785 nm.

Se irradiaron continuamente dispersiones con distintas concentraciones de MNP@MEMO y MNG en un intervalo entre 0 y 4 mg/mL. Para las nanopartículas silanizadas se encontró una capacidad de calentamiento de 7 °C para la solución más diluida (0,063 mg/mL) y una máxima de 53 °C para la concentración mayor (4 mg/mL). Por otro lado, para los MNGs se encontró una capacidad de calentamiento de 5 °C para la solución más diluida (0,063 mg/mL) y una máxima de 22 °C para la concentración mayor (4 mg/mL). Este resultado puede explicarse porque en la masa total medida para MNG, como se demostró mediante medidas de TGA, el 45 % corresponde al polímero que no tiene capacidad de calentamiento mientras que en el caso de las MNP@MEMO alrededor del 93 % es nanopartícula magnética que si tiene capacidad de calentamiento.

Por otro lado, se analizó la relación entre la temperatura generada (T) y la concentración del sistema. En la Figura 5.18 se encuentra el gráfico del T en función de la concentración de MNP@MEMO (rojo) y MNG (violeta). Ambos sistemas presentan una dependencia en función de concentración; al aumentar la concentración tanto de las nanopartículas silanizadas como del nanogel magnético, se observa un aumento en la temperatura.



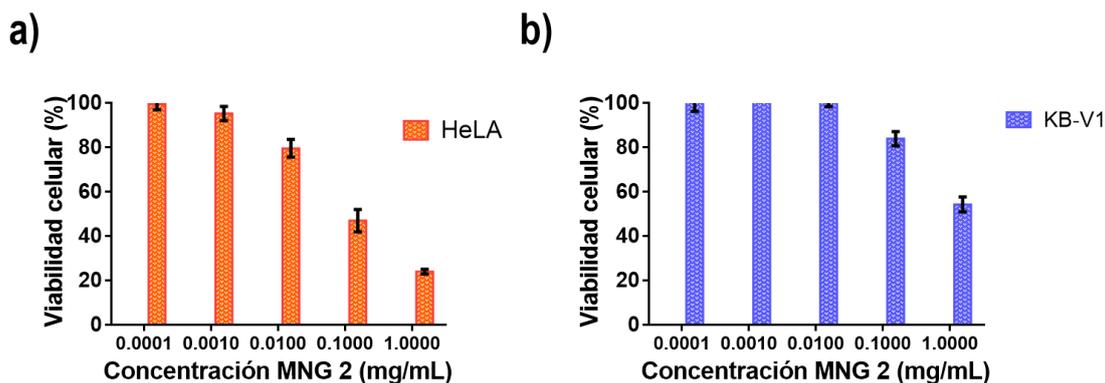
**Figura 5.18** Dependencia de la temperatura en función de la concentración de MNP@MEMO (rojo) y MNG (violeta)

Luego del calentamiento de los MNG, éstos se estudiaron mediante distintas técnicas como DLS, TEM y SEM encontrándose que no había alteración alguna en su estructura ni signo de daño o destrucción del sistema. Por lo tanto, se obtuvieron capacidades de calentamiento considerablemente altas a bajos tiempos de irradiación y moderadas concentraciones. Los resultados aquí expuestos permiten considerar la posibilidad de utilizar la irradiación NIR tanto como potencial estímulo para liberación controlada de fármacos como para realizar un tratamiento por hipertermia.

### 5.3.5 Estudios de citotoxicidad de los nanogeles magnéticos y termosensibles

Una vez evaluada la capacidad del sistema para responder a distintos estímulos como un campo magnético alternante o irradiación NIR, se prosiguió con la investigación de su toxicidad en distintas líneas celulares.

Para ello, los MNG 2 fueron incubados con la línea celular HeLA y la multiresistente KB-V1, ambas células cancerosas, durante 48 h como se detalla en Materiales y métodos 3.2.13.1. La Figura 5.19 muestra la viabilidad celular relativa de ambas líneas celulares a distintas concentraciones de los nanogeles. La misma fue determinada mediante el ensayo MTT.

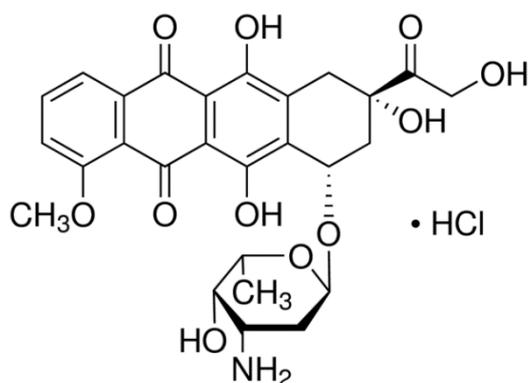


**Figura 5.18** Viabilidad celular de las células a) HeLa y b) KB-V1 con distintas concentraciones de MNG2 con sus respectivos errores.

Los valores de IC<sub>50</sub> (concentración mínima necesaria para reducir la población de células al 50 %) encontrados son 0,1mg/mL para la línea celular HeLa y 1,2 mg/mL para la línea celular multiresistente KB-V1. Como tendencia general, se observó que los MNG resultaron menos tóxicos para la línea celular cancerosa multiresistente. Este resultado demuestra el gran potencial de utilizar este sistema para el tratamiento de células cancerígenas multiresistente ya que se podría utilizar una mayor concentración del MNG en una dosis. Estos valores reflejan la baja toxicidad de los nanogeles magnéticos basados en etilenglicol y nanopartículas de magnetita silanizadas.

### 5.3.6 Estudios de liberación controlada de fármacos

Al obtener resultados tan prometedores en cuanto a los distintos estímulos que pueden ser utilizados para la liberación específica de un fármaco y en los estudios de citotoxicidad, en una segunda etapa se continuó con los estudios preliminares de encapsulación. En este caso, se utilizó como fármaco anticancerígeno modelo clohidrato de doxorubicina (DOX.HCl). La estructura química de la misma se muestra en la Figura 5.20.



**Figura 5.20** Estructura química del fármaco modelo clohidrato de doxorubicina.

Para llevar a cabo la incorporación, se siguió el protocolo detallado en la Materiales y métodos 3.2.11.1. Los MNGs se pusieron en contacto con soluciones de distintas concentraciones de DOX.HCl en buffer acetato pH 5,5 que variaban entre 0,5 mM y 2,5 mM. Las mismas se mantuvieron bajo agitación mecánica durante 16 hs para luego separar magnéticamente los nanogel y cuantificar la incorporación mediante espectrofotometría UV-vis. Todos los estudios se realizaron por triplicado.

Analizando los resultados obtenidos, en ninguno de los casos se encontró una incorporación del fármaco al sistema siendo la concentración de la solución de DOX.HCl remanente igual a la concentración inicial. Probablemente, en este ensayo preliminar el fármaco elegido no haya sido el indicado dado a su alto carácter hidrofílico por estar en la forma de clorhidrato. Por esta razón, se presume que al ser el clorhidrato de doxorubicina hidrofílica, permanece en la solución, desfavoreciendo la incorporación del fármaco en la red del nanogel. Frente a este hecho, se propone realizar en el futuro como alternativa estudios de encapsulación o bien con fármacos más hidrofóbicos o con moléculas más voluminosas como son las proteínas.

## 5.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se extendió exitosamente el empleo de la ultrasonicación para la síntesis de nanogeles magnéticos y termosensibles. Siendo éste el primer reporte de un nanogel basado en OEG que incorporó de forma covalente nanopartículas magnéticas en la matriz polimérica mediante una síntesis asistida por ultrasonicación.

Se realizó la síntesis de MNPs de magnetita mediante coprecipitación de sales de hierro con su posterior silanización para la obtención de grupos funcionales vinilo en la superficie, evidenciando la exitosa modificación mediante FT-IR.

Luego se sintetizaron los diferentes MNGs utilizando a la MNP como entrecruzante. Se confirmó que la metodología empleada permite un gran control del tamaño de los MNGs. Una vez más, se comprobó la versatilidad de la técnica de ultrasonicación para la obtención de nanogeles.

Por otro lado, los MNGs presentaron un comportamiento termosensible y se ha demostrado que variando los distintos monómeros y cantidad de entrecruzante se puede modificar la  $T_{ff}$ . También, se encontró una alta estabilidad del sistema en dispersión, demostrando ser factible la separación magnética del mismo con un simple imán comercial.

Adicionalmente, se evaluaron posibles estímulos para el tratamiento combinado por hipertermia y diagnóstico por imágenes de resonancia magnética. Por un lado, se analizaron las propiedades magnéticas del sistema demostrándose el comportamiento superparamagnético del mismo confirmando así, el potencial uso de los MNGs para el tratamiento del cáncer por hipertermia. Por otra parte, para los MNGs se obtuvieron valores de relajación similares al de los agentes de contraste comerciales de IRM ( $170 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), garantizando también su empleo como nanodispositivo en teragnosis. Para analizar la toxicidad de los nanogeles se realizaron estudios de citotoxicidad, encontrándose muy buenos resultados en cuanto a la viabilidad celular de los mismos.

Por último, se evaluó la incorporación de un fármaco anticancerígeno modelo como clohidrato de doxorrubicina. Para el protocolo utilizado, no se incorporó la doxorrubicina. Se propone para futuras investigaciones, realizar la incorporación de fármacos más hidrofóbicos como proteínas.

## 5.5 REFERENCIAS

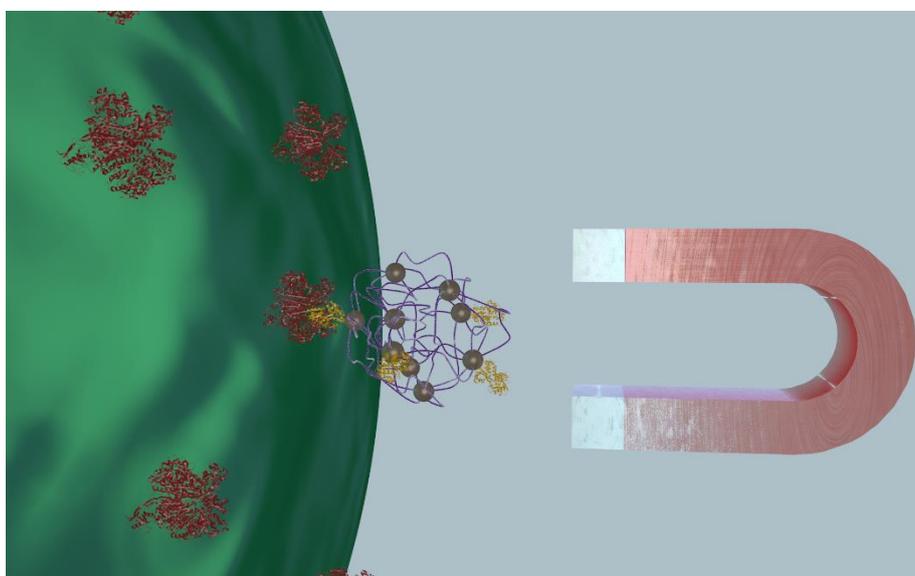
1. Sailor MJ, Park J-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv Mater.* 2012;24(28):3779-3802. doi:10.1002/adma.201200653.
2. Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Prog Polym Sci.* 2010;35(1-2):174-211. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.10.004.
3. Bergueiro J, Calderón M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications. *Macromol Biosci.* 2014:1-17. doi:10.1002/mabi.201400362.
4. Dürr S, Janko C, Lyer S, et al. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Nanotechnol Rev.* 2013;2(4):395-409. doi:10.1515/ntrev-2013-0011.
5. Merino S, Martín C, Kostarelos K, Prato M, Vázquez E. Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano.* 2015;9(5):4686-4697. doi:10.1021/acsnano.5b01433.
6. Banerjee R. Trigger-responsive nanoparticles: control switches for cancer therapy. *Nanomedicine.* 2011;6(10):1657. doi:10.2217/nnm.11.161.
7. Bock N, Riminucci A, Dionigi C, et al. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomater.* 2010;6(3):786-796. doi:10.1016/j.actbio.2009.09.017.
8. Zhou A, Luo H, Wang Q, Chen L, Zhang TC, Tao T. Magnetic thermoresponsive ionic nanogels as novel draw agents in forward osmosis. *RSC Adv.* 2015;5(20):15359-15365. doi:10.1039/C4RA12102C.
9. Liu G, Cai M, Wang X, Zhou F, Liu W. Magnetite-Loaded Thermosensitive Nanogels for Bioinspired Lubrication and Multimodal Friction Control. *ACS Macro Lett.* 2016;5(1):144-148. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00860.
10. Ozay O, Ekici S, Baran Y, Aktas N, Sahiner N. Removal of toxic metal ions with magnetic hydrogels. *Water Res.* 2009;43(17):4403-4411. doi:10.1016/j.watres.2009.06.058.
11. Chen T, Cao Z, Guo X, et al. Preparation and characterization of thermosensitive organic-inorganic hybrid microgels with functional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as crosslinker. *Polymer (Guildf).* 2011;52(1):172-179.
12. Messing R, Frickel N, Belkoura L, et al. Cobalt ferrite nanoparticles as multifunctional cross-linkers in PAAm ferrohydrogels. *Macromolecules.* 2011;44(8):2990-2999. doi:10.1021/ma102708b.
13. Zhou A, Luo H, Wang Q, Chen L, Zhang TC, Tao T. Magnetic thermoresponsive ionic nanogels as novel draw agents in forward osmosis. *RSC Adv.* 2015;5(20):15359-15365. doi:10.1039/C4RA12102C.
14. Socoliuc V, Vékás L, Turcu R. Magnetically induced phase condensation in an aqueous dispersion of magnetic nanogels. *Soft Matter.* 2013;9(11):3098. doi:10.1039/c2sm27262h.
15. Liu J, Detrembleur C, Debuigne A, et al. Glucose-, pH- and thermo-responsive nanogels

- crosslinked by functional superparamagnetic maghemite nanoparticles as innovative drug delivery systems. *J Mater Chem B*. 2014;2(8):1009-1023. doi:10.1039/c3tb21272f.
16. Sun H, Yu J, Gong P, Xu D, Zhang C, Yao S. Novel core-shell magnetic nanogels synthesized in an emulsion-free aqueous system under UV irradiation for targeted radiopharmaceutical applications. *J Magn Magn Mater*. 2005;294(3):273-280. doi:10.1016/j.jmmm.2004.12.023.
  17. Demarchi CA, Debrassi A, Buzzi FDC, et al. A magnetic nanogel based on O-carboxymethylchitosan for antitumor drug delivery: synthesis, characterization and in vitro drug release. *Soft Matter*. 2014;10(19):3441-3450. doi:10.1039/c3sm53157k.
  18. Wang X, Niu D, Li P, et al. Dual-Enzyme-Loaded Multifunctional Hybrid Nanogel System for Pathological Responsive Ultrasound Imaging and T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *ACS Nano*. 2015;9(6):5646-5656. doi:10.1021/nn5068094.
  19. Xiong W, Wang W, Wang Y, et al. Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;84(2):447-453. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.01.040.
  20. Dong H, Mantha V, Matyjaszewski K. Thermally responsive PM(EO)2MA magnetic microgels via activators generated by electron transfer atom transfer radical polymerization in miniemulsion. *Chem Mater*. 2009;21(17):3965-3972. doi:10.1021/cm901143e.
  21. Boullaras M, Gombart E, Tranchant J-F, Billon L, Save M. Design of Smart Oligo(ethylene glycol)-Based Biocompatible Hybrid Microgels Loaded with Magnetic Nanoparticles. *Macromol Rapid Commun*. 2015;36(1):79-83. doi:10.1002/marc.201400578.
  22. Boullaras M, Deniau-Lejeune E, Alard V, Tranchant J-F, Maud Save, Laurent Billon. Dual stimuli-responsive oligo(ethylene glycol)-based microgels: insight into the role of internal structure in volume phase transitions and loading of magnetic nanoparticles to design stable thermoresponsive hybrid microgels. *Polym Chem*. 2015;7:350-363. doi:10.1039/C5PY01078K.
  23. Biglione C, Sousa-Herves A, Menger M, Wedepohl S, Calderón M, Strumia MC. Facile ultrasonication approach for the efficient synthesis of ethylene glycol-based thermoresponsive nanogels. *RSC Adv*. 2015;5(20):15407-15413. doi:10.1039/C4RA15784B.
  24. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B*. 2015;3:6117-6147. doi:10.1039/C5TB00664C.
  25. Jubb AM, Allen HC. Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2010;2(10):2804-2812. doi:10.1021/am1004943.
  26. Márquez F, Campo T, Cotto M, et al. Synthesis and Characterization of Monodisperse Magnetite Hollow Microspheres. *Soft Nanosci Lett*. 2011;1(2):25-32. doi:10.4236/sn1.2011.12005.

27. Wang W, Vaughn MW. Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning*. 2008;30(2):65-77. doi:10.1002/sca.20097.
28. Gonçalves C, Silva JP, Antunes IF, et al. Dextrin-Based Nanomagnetogel: In Vivo Biodistribution and Stability. *Bioconjug Chem*. 2015. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00024.

# Capítulo 6

## NANOGELES MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES MEDIANTE QUÍMICA CLICK





## 6.1 INTRODUCCIÓN

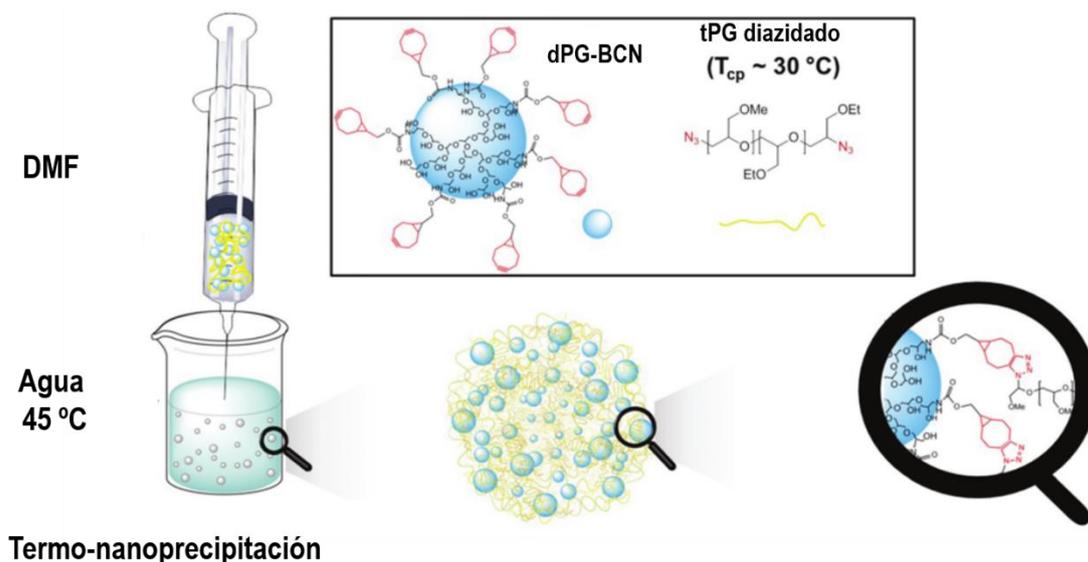
El término *click* se refiere a las transformaciones químicas fáciles, eficientes, selectivas y versátiles que conducen a un solo producto y son utilizadas ampliamente en síntesis orgánica.<sup>1</sup> En particular, debido a su alta reactividad, excelente selectividad y condiciones de reacción suaves, esta técnica se ha transformado en una de las estrategias más prometedoras para la síntesis de hidrogeles, microgeles y nanogeles, siendo éstos altamente compatibles con los bioactivos encapsulados incluyendo células vivas, proteínas y fármacos.<sup>2</sup> La química *click*, especialmente la cicloadición azida-alquino, permite la preparación de hidrogeles y nanogeles con estructuras moleculares bien definidas y propiedades mecánicas sorprendentemente mejoradas, debido a la especificidad y los rendimientos cuantitativos que se obtienen.<sup>3</sup>

En los últimos años, se han reportado distintos antecedentes de síntesis de nanogeles mediante química *click* con una amplia variedad de polímeros, ya sean de origen natural como sintético. Unos de los sistemas más estudiados son los nanogeles compuestos por ácido hialurónico. Chen y colaboradores<sup>4</sup> sintetizaron nanogeles fluorescentes de ácido hialurónico (HA) para la encapsulación y la administración intracelular de proteínas apoptóticas dirigidas al tumor. Dos fármacos proteínicos intracelulares, citocromo C (CC) y granzima B (GrB), se incorporaron en los nanogeles preservando su bioactividad. Los nanogeles de HA con carga de CC y GrB fueron dirigidos eficazmente y liberaron las proteínas a células de cáncer MCF-7 y A549 positivas para CD44, produciendo efectos antitumorales sorprendentes con una concentración inhibitoria medio-máxima miles de veces menor que los quimioterápicos clínicos. De igual manera, Li y su grupo de investigación<sup>5</sup> diseñaron nanogeles de ácido hialurónico a partir HA-g-oligoetilenglicol-tetrazol a través de nanoprecipitación inversa y química fotoclick de "tetrazol-alqueno" con L-cistina dimetacrilamida (MA-Cys-MA). Estos sistemas exhibieron una incorporación altamente eficiente de citocromo C y una administración dirigida del mismo al tumor de mama MCF-7 xenoinjertado en ratones.

Por otro lado, Zhang y su grupo de investigación<sup>6</sup> sintetizaron nanogeles mediante química *click* basados en metoxi poli(etilenglicol)-b-poli( $\gamma$ -propargil-L-glutamato) con grupos alquinos terminales, utilizando como entrecruzante una molécula diazidada que contenía un enlace disulfuro. A su vez, se conjugó DOX a través de un enlace hidrazona sensible a pH ácidos. Los nanogeles fueron internalizados de manera exitosa por las células cancerosas permitiendo liberar la DOX en el ambiente ácido y reductor de la célula. Además, Heller *et al.*<sup>7</sup> presentaron un método fácil para producir nanogeles utilizando química *click* a partir del biopolímero dextrano que fue modificado con grupos alquinos y azida a través de emulsión inversa. Estos nanogeles presentaron

grupos funcionales libres para la posterior modificación superficial con grupos *targeting* para distintos tejidos, incluyendo el óseo mediante química *click*. Los nanogelés resultaron biodegradables, exhibieron una citotoxicidad extremadamente baja *in vitro* y se toleraron a altas dosis *in vivo*.

También, el grupo de Haag<sup>8</sup> sintetizó nanogelés de poliglicerol dendrítico mediante química *click* y nanoprecipitación. Los nanogelés presentaron tamaño definido, con diámetros ajustables entre 100 y 1000 nm y se encapsuló exitosamente la enzima asparaginasa con una eficacia de casi el 100%. Al liberar la enzima mediante degradación en ambientes ácidos, no se observaron cambios estructurales de la misma y se retuvo la actividad enzimática completa. En esta misma línea, el grupo de Calderón<sup>9</sup> estudió nanogelés termosensibles basados en poliglicerol lineal y dendrítico obteniéndose un sistema que podía incorporar de forma *in situ* doxorubicina con una eficiencia de incorporación muy buena. En la Figura 6.1 se muestra el esquema de síntesis estos nanogelés.



**Figura 6.1** Representación esquemática de la síntesis de nanogel por termonanoprecipitación. Reproducido de la referencia 9.

Sin embargo, hasta el momento hay muy pocas publicaciones acerca de nanogelés híbridos sintetizados a partir de química *click*. En particular, no se encuentran reportes de nanogelés magnéticos y termosensibles obtenidos empleando esta metodología.

## 6.2 OBJETIVOS

Por las razones anteriormente expuestas, se planteó estudiar otra metodología sintética para el diseño racional de nanogeles magnéticos. La técnica elegida para el estudio fue química *click* libre de cobre, promovida por tensión anular.

En este capítulo, se presenta el desarrollo de una novedosa metodología basada en la termonanoprecipitación asistida por ultrasonificación. En este caso, para el sistema elegido, se seleccionó la técnica *grafting to* mediante química *click* promovida por tensión anular. Para obtener el nanogel se requieren previamente bloques constructores, el polímero ya sintetizado y la nanopartícula magnética como entrecruzante. En particular, los bloques constructores fueron nanopartículas magnéticas modificadas con grupos funcionales biclonoonino (BCN) y poliglicerol lineal termosensible diazidado ( $N_3$ -tPG- $N_3$ ). Se planteó comparar esta estrategia de síntesis con la utilizada en los capítulos anteriores donde la síntesis de los nanogeles se realizaba a partir de los monómeros y entrecruzantes.

A fin de corroborar esta hipótesis, se desprenden los siguientes objetivos específicos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y modificar nanopartículas magnéticas con grupos alquinos.
- Sintetizar poliglicerol lineal termosensible.
- Sintetizar y caracterizar nanogeles magnéticos y termosensibles mediante química *click*.
- Realizar estudios de aplicación en nanomedicina:
  - Evaluar los nanogeles para liberación controlada de fármacos.
  - Evaluar los nanogeles como nanodispositivos de captura de células circulantes de metástasis.

### 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

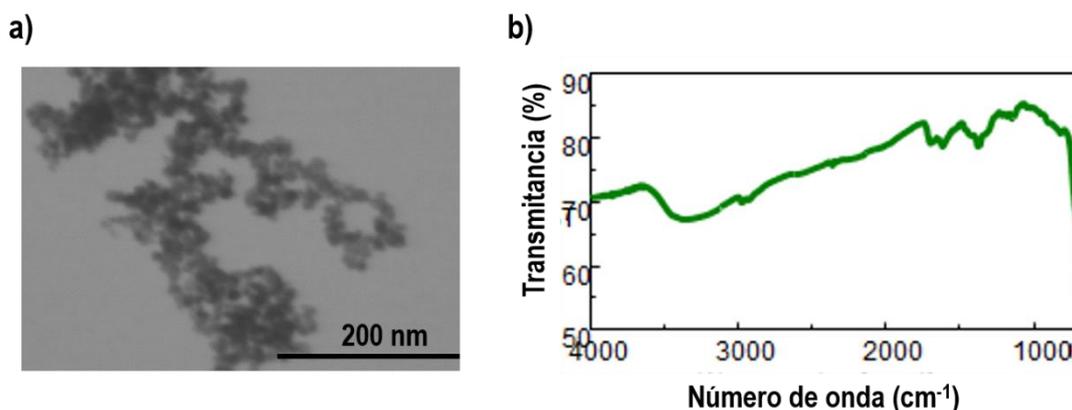
En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se analizaron dos rutas sintéticas para la obtención de los nanogeles magnéticos mediante química *click*.<sup>10</sup> Por un lado, la utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos azidas y tPG con grupos BCN terminales o bien, nanopartículas magnéticas decoradas con BCN y el tPG con grupos azidas. Se demostró que al utilizar la última vía mencionada, se obtuvieron mejores resultados en lo que refiere a tamaños de partículas y polidispersidad.

Por lo tanto, en esta tesis se planteó el empleo de estos bloques constructores para la síntesis del nanogel.

#### 6.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas

Uno de los bloques constructores elegidos fue la nanopartícula magnética modificada con grupos BCN (MNP@BCN). La utilización de las mismas confiere propiedades únicas como el superparamagnetismo que resultan interesantes para el estudio del nanogel híbrido ya sea como agente de contraste o como dispositivo de captura de CTCs debido a su fácil separación magnética del medio.

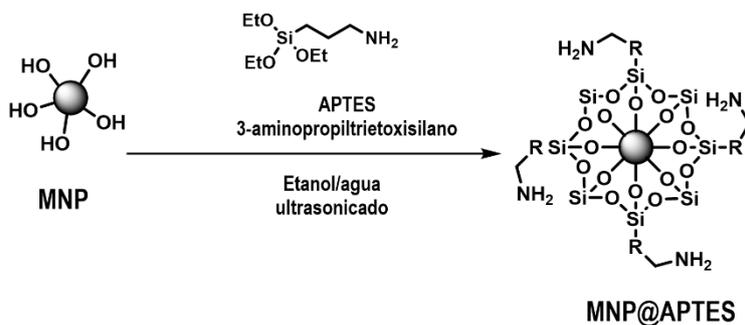
En una primera etapa se realizó la síntesis de las MNPs nuevamente con la metodología de coprecipitación de sales de hierro.<sup>11</sup> En la Figura 6. 2 se muestran los resultados obtenidos en microscopía de transmisión electrónica y espectroscopia infrarroja.



**Figura 6. 2** a) Imagen TEM y b) espectro FT-IR de las MNPs.

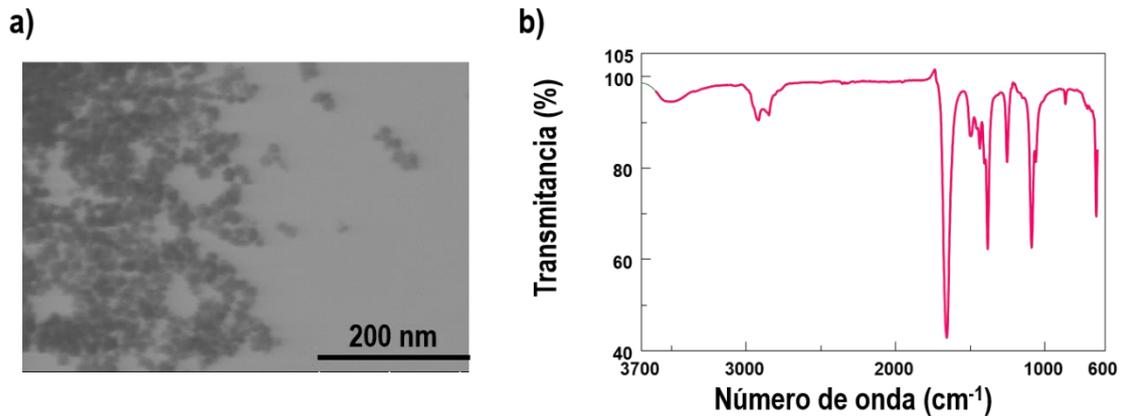
En la Figura 6. 2 a) se observa la imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La misma denota que se obtuvieron partículas esféricas y de poca polidispersidad con un tamaño promedio de  $5 \pm 2$  nm. A su vez, en el espectro de FT-IR, la banda a  $590 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión Fe-O de la magnetita indica la exitosa síntesis de las nanopartículas (Figura 6. 2 b).

Posteriormente, para la modificación superficial de las MNPs con grupos amino se llevó a cabo la silanización de las mismas con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) mediante una metodología ya reportada por Bloemen y colaboradores<sup>12</sup> (Materiales y métodos 3.2.3.2), aunque se mejoró la misma mediante el uso de ultrasonificación reduciendo los tiempos de reacción a 10 minutos y utilizando solventes amigables con el medio ambiente como el agua y el etanol. En la Figura 6.3 se detalla el esquema de modificación superficial.



**Figura 6.3** Esquema de modificación de las MNPs con el agente silano APTES.

Para verificar la funcionalización de las MNP@APTES se caracterizaron mediante distintas técnicas. Como se observa en la Figura 6. 4 a), se observó mediante TEM que el tamaño de las nanopartículas se mantiene constante luego de la modificación con el silano con un valor promedio de  $5 \pm 2$  nm. Asimismo, la incorporación del agente silano APTES en las MNP se corroboró mediante espectroscopia FT-IR (Figura 6. 4 b). Además de contener las señales características de la tensión Fe-O de la magnetita, aparecen principalmente 3 señales nuevas. Por un lado, alrededor de  $1200 \text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda característica de la tensión Si-O de los silanos. Adicionalmente, pueden distinguirse las señales características de la cadena carbonada del silano: a  $2916 \text{ cm}^{-1}$  y  $2871 \text{ cm}^{-1}$  propias del estiramiento C-H alifático, y alrededor de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  una banda correspondiente al estiramiento N-H de aminas primarias.



**Figura 6. 4** a) Imagen TEM y b) espectro FT-IR de las MNP@APTES

Para analizar la modificación superficial de las MNPs, se efectuó una estimación de los grupos amino disponibles para reaccionar en la nanopartícula. Para ello, se realizó una titulación colorimétrica mediante la formación de la sal correspondiente entre el ácido pícrico y los grupos amino disponibles de la nanopartícula siguiendo la metodología reportada por Gisin y su grupo de investigación<sup>13</sup> y Wang y colaboradores<sup>14</sup> (Materiales y métodos 3.2.3.2). Para calcular el número de nanopartículas se realizaron medidas de NTA.

Para realizar dicha aproximación, se consideraron los siguientes parámetros:

- Las nanopartículas tienen un tamaño alrededor de 5 nm.
- El resultado obtenido mediante la titulación colorimétrica fue  $3,177 \times 10^{-8}$  mol de grupos amino por mL de solución de MNP@APTES.
- El número de nanopartículas obtenidos mediante NTA fue  $2.823 \times 10^{-12}$  mol/mL pero se encontró un tamaño promedio de 100 nm por lo que las nanopartículas se encuentran en agregados de este tamaño.

Si se calcula el coeficiente de grupos aminos por nanopartícula considerando nanopartículas de 5 nm, el valor obtenido es 11254 ( $3,177 \times 10^{-8}$  mol de grupos amino/ $2.823 \times 10^{-12}$  mol de nanopartículas). Sin embargo, el diámetro real en solución de las nanopartículas medido por NTA es de 100 nm y por lo tanto ese valor es el correspondiente a los aminos disponibles en el agregado. Entonces, para realizar una primera aproximación de la cantidad de grupos amino disponibles, se calculó el volumen de una esfera hueca de 100 nm de diámetro (el diámetro del agregado) y 5 nm de espesor (el diámetro de una nanopartícula aislada). Así, se calculó el volumen como la resta de los volúmenes de una esfera de 50 nm de radio y otra de 45 nm de radio en función de la siguiente ecuación:

$$V = \frac{4}{3}\pi(50 \text{ nm})^3 - \frac{4}{3}\pi(45 \text{ nm})^3 \quad \text{Ec. 6.1}$$

El volumen calculado fue 14200 nm<sup>3</sup>. Con este valor, se calculó la cantidad de nanopartículas de 5 nm que entran en esta esfera hueca sabiendo el volumen de las NP pequeñas ( $V = \frac{4}{3}\pi 2.5^3 = 65 \text{ nm}^3$ ) obteniendo como resultado un valor de 2185. Finalmente, se dividió por este factor el coeficiente obtenido previamente (11254/2185), encontrando que el número de grupos amino por nanopartícula es por lo menos 5.

Con el fin de obtener grupos alquinos en la superficie de la nanopartícula, se prosiguió con una segunda modificación para la obtención final de grupos BCN. Para tal propósito, se modificaron los grupos amino de las MNP@APTES con BCN-*p*-nitrofenil carbonato (BCN-PNP) (Materiales y métodos 3.2.3.3), mediante un ataque nucleofílico del grupo amino terminal del APTES al carbonilo de la molécula BCN-PNP, obteniéndose una unión carbamato entre el MNP@APTES y el BCN como se esquematiza en la Figura 6.5.

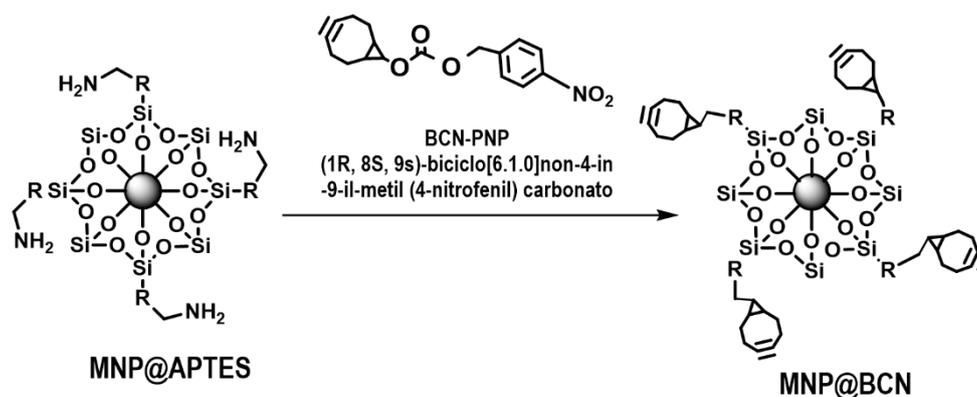


Figura 6.5 Modificación superficial de las MNPs con los grupos BCN.

Como se muestra en la Figura 6.6 a), el tamaño de las nanopartículas se mantiene. Asimismo, se confirmó la reacción mediante FT-IR (Figura 6.6 b) debido a la presencia de la señal característica a 2100 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento C-C<sub>sp</sub> del grupo alquino y la desaparición de la banda alrededor de 3500 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento N-H de aminas primarias, además de las bandas características del silano y la nanopartícula. También se realizó por espectrofotometría UV-Vis los grupos BCN mediante la conjugación de las nanopartículas con el colorante dansilazida (previamente sintetizado a partir del cloruro de dansilo) a través de química *click* y posterior separación magnética de las MNP@BCN. Para este cálculo se procedió de manera análoga para la estimación de grupos amino disponible. Se determinó la presencia de 5 grupos BCN disponibles por nanopartícula.

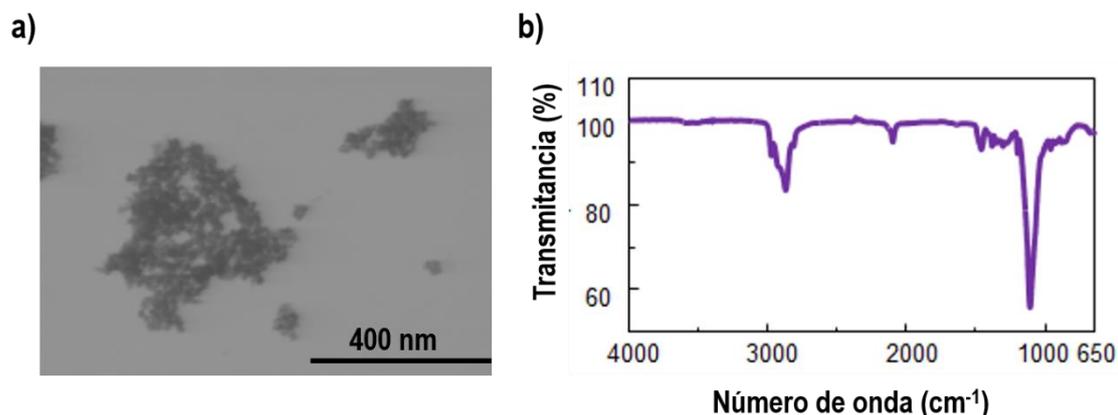


Figura 6.6 a) Imagen TEM y b) espectro FT-IR de las MNP@BCN.

### 6.3.2 Síntesis de políglicerol lineal termosensible diazidado ( $N_3$ -tPG- $N_3$ )

Una vez sintetizada la nanopartícula magnética modificada superficialmente con grupos BCN, se prosiguió con la síntesis del polímero. Los poliéteres como el políglicerol lineal termosensible (tPG) son buenos candidatos para el diseño de nanodispositivos debido a su biocompatibilidad<sup>15,16</sup> y versatilidad<sup>17-19</sup>. En particular, los tPG, a base de glicidil metil éter (GME) y éter etílico de glicidilo (EGE) presentan un comportamiento termosensible y su  $T_f$  puede ser ajustada entre 15-57 °C variando la relación molar entre GME/EGE.<sup>16,20</sup> Por estas razones es que se eligió el tPG como bloque constructor para los nanogel híbridos.

Para la obtención del polímero diazidado se siguió el protocolo publicado por Giulbudagian y colaboradores<sup>9</sup>. Primero se realizó una polimerización aniónica por apertura de anillo como se muestra en la Figura 6.7 para obtener así el políglicerol lineal termosensible con un bromo y un hidroxilo terminal.

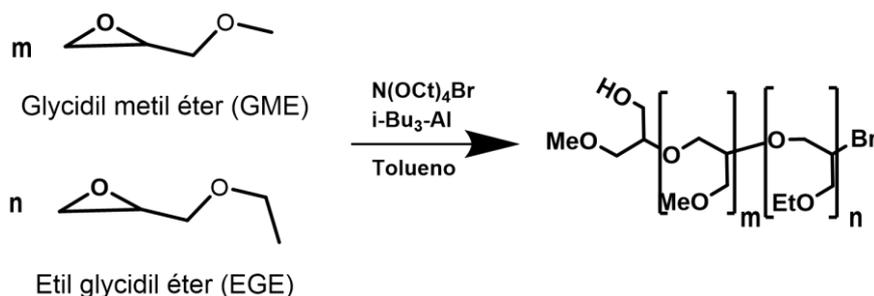


Figura 6.7 Esquema de polimerización por apertura de anillo para la obtención de tPG.

Este polímero sólo cuenta con solo un buen grupo saliente, el bromuro, por lo tanto, para realizar una diazidación primero hay que modificar el grupo hidroxilo para que sea un buen grupo saliente. Para ello, se llevó a cabo una mesilación utilizando cloruro de mesilo como se esquematiza en la Figura 6.8.

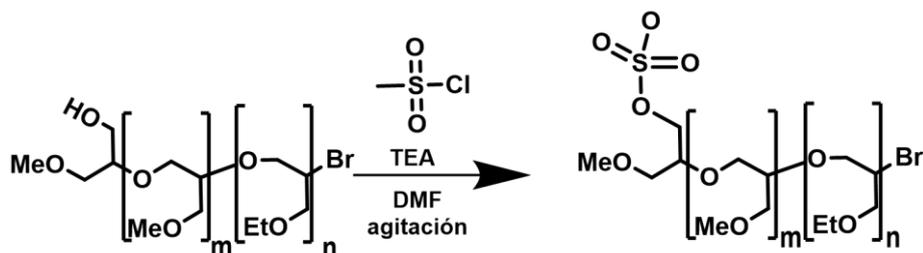


Figura 6.8 Esquema de mesilación del tPG.

Finalmente, se realizó una diazidación con azida de sodio para la obtención del tPG diazidado ( $N_3$ -tPG- $N_3$ ) como se muestra en la Figura 6.9. La modificación con los grupos azida se confirmó mediante FT-IR debido a la aparición de la señal característica del grupo azida a  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Se sintetizaron  $N_3$ -tPG- $N_3$  de distintos pesos moleculares, 5 kDa, 10 kDa y 15 kDa y se caracterizaron mediante RMN  $^1\text{H}$  obteniendo las señales características del polímero (Materiales y métodos 3.2.4). El PM se corroboró mediante cromatografía de permeación de geles. Para analizar el comportamiento termosensible de los distintos polímeros sintetizados, se realizó una turbidimetría obteniéndose una  $T_{\text{tr}}$  de  $40\text{ }^\circ\text{C}$ .

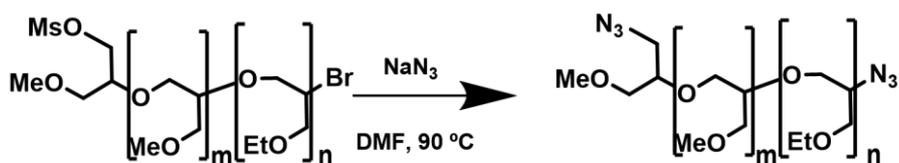
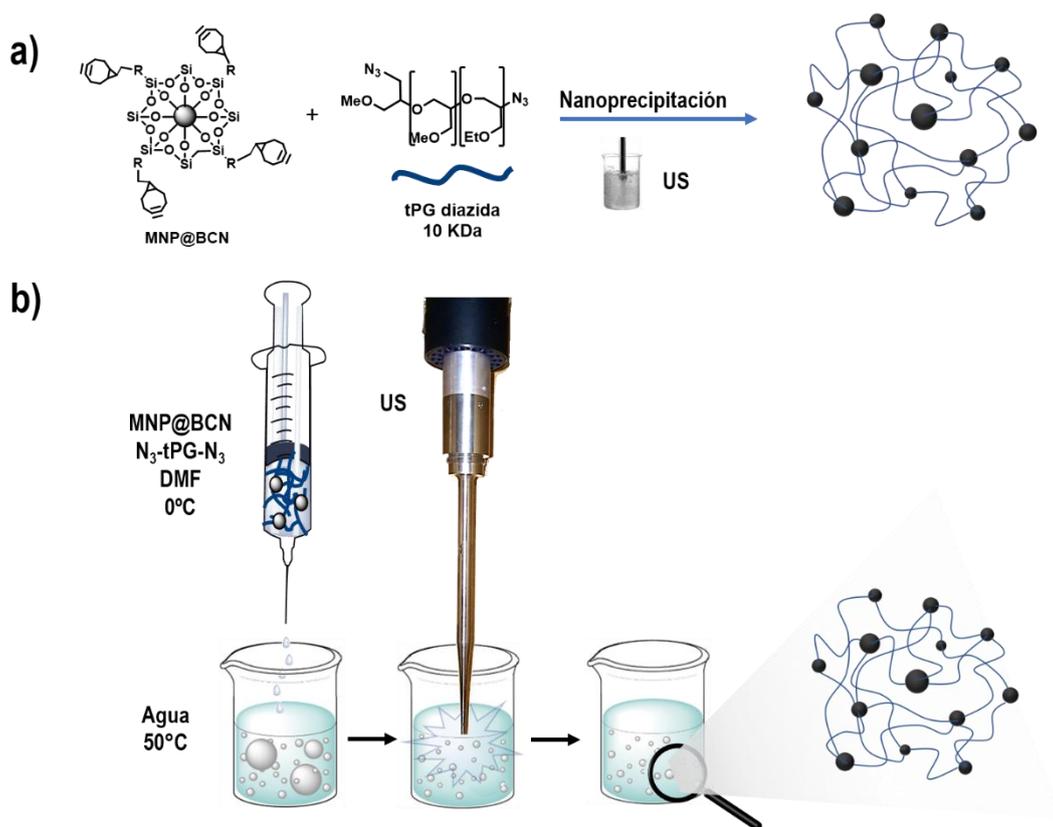


Figura 6.9 Azidación del poliglicerol termosensible.

### 6.3.3 Síntesis y caracterización de nanogeles magnéticos y termosensibles

Una vez finalizada la síntesis y caracterización de los distintos bloques constructores, se continuó con el estudio de la síntesis de los nanogeles híbridos. En la síntesis de los MNGs se utilizan las  $\text{MNP@BCN}$  como agente entrecruzante. A su vez, el tPG diazidado se utilizó como la red polimérica termosensible, se emplearon diferentes tPG de 5, 10 y 15 kDa. La Figura 6. 10 muestra el esquema de reacción para la obtención de los MNGs. Los mismos se sintetizaron a través de una cicloadición de Huisgen azida-alquino promovida por tensión anular entre los grupos azida del polímero y los grupos BCN de la nanopartícula. Cabe destacar que, para este tipo de reacción, al ser promovida por tensión anular, no se necesita utilizar cobre resultando una vía más limpia y amigable con el medioambiente. Los mismos se sintetizaron mediante la metodología de nanoprecipitación asistida por ultrasonificación (Materiales y métodos 3.2.6.3).



**Figura 6. 10** a) Síntesis de nanogeles magnéticos mediante nanoprecipitación asistida por ultrasonificación, b) Esquema de formación de los MNG@Tf.

Mediante esta metodología se obtuvieron MNGs con tamaños controlados y de manera rápida, tan solo en 15 minutos y sin utilizar surfactante. El empleo de un ultrasonicador de punta permitió un gran control de la agregación del sistema en comparación con la síntesis, ya sea con agitación convencional como con un baño de ultrasonificación.

Mediante espectroscopia FT-IR se confirmó la reacción de entrecruzamiento entre el grupo azida del polímero y los grupos BCN debido a la desaparición de la señal característica del grupo azida a 2099  $\text{cm}^{-1}$  e indicando la formación de triazol a través de la cicloadición de Huisgen promovida por tensión anular. El espectro del nanogel magnético se muestra en la Figura 6.11.

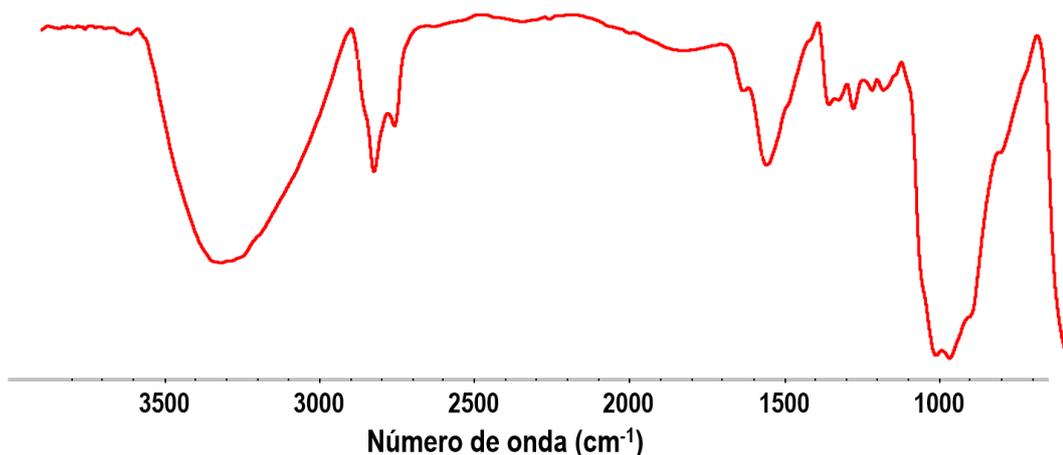


Figura 6.11 Espectro FT-IR de los MNGs.

Para analizar la morfología de los nanogeles magnéticos obtenidos se realizaron estudios de microscopía TEM y SEM. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 6.12.

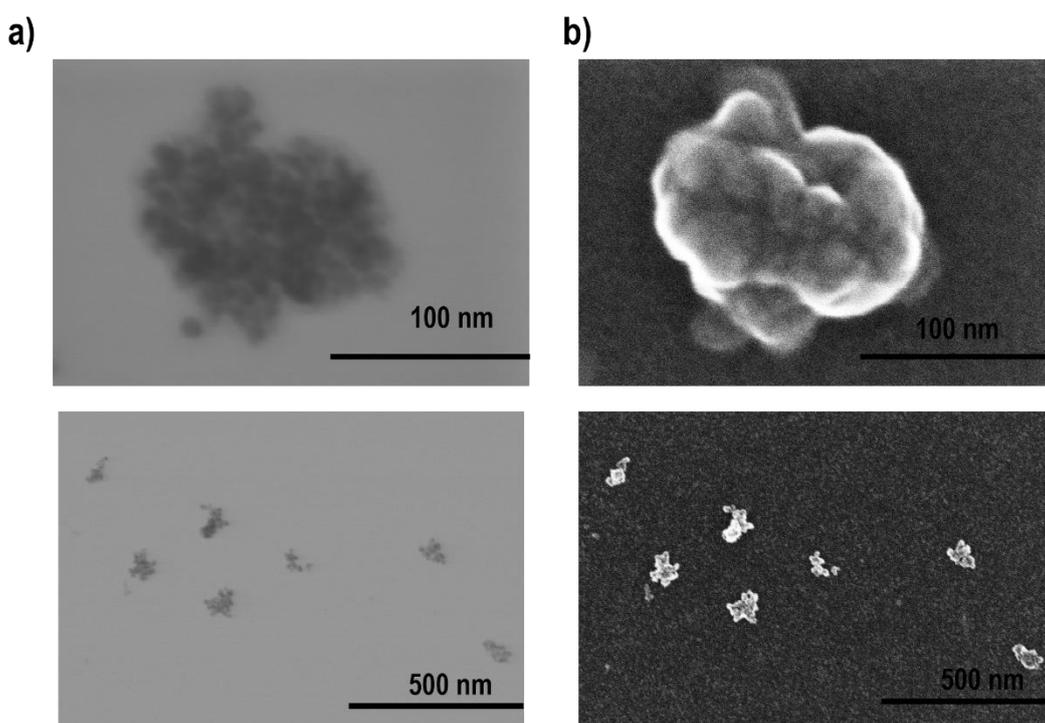
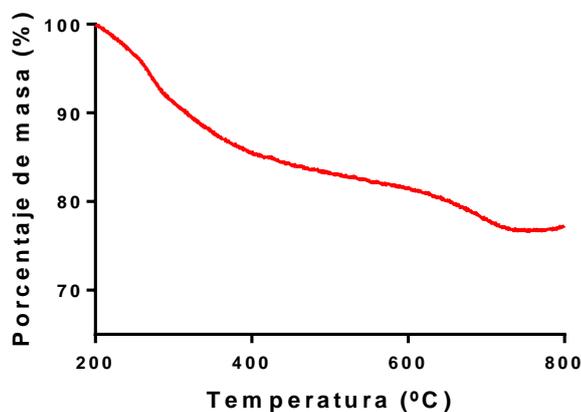


Figura 6.12 Imágenes a) TEM y b) SEM de los MNGs.

Como se observa en las imágenes, el nanogel presentó una morfología globular con tamaños alrededor de 150 nm similares a los obtenidos en el Capítulo 5. Los tamaños obtenidos mediante NTA, 177 nm, coincidieron con los tamaños obtenidos mediante microscopía TEM. Además, para corroborar el comportamiento termosensible se realizaron turbidimetrías encontrándose que el MNG tenía una  $T_{tr}$  alrededor de 42 °C.

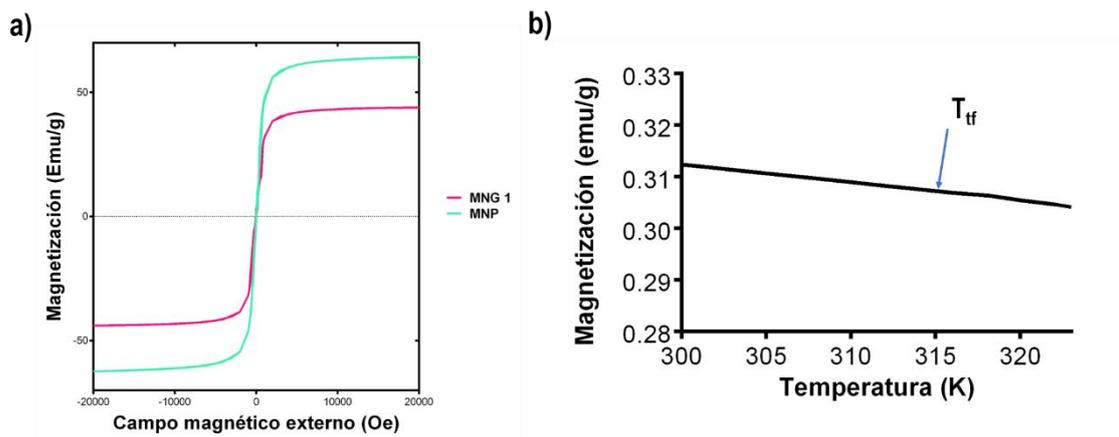
A su vez, para analizar la composición de los nanogelés se realizaron estudios de termogravimetría. En la Figura 6.13 se muestra que el porcentaje de pérdida de masa de los nanogelés es del 17 % entre 200 y 400 °C. La misma es atribuida a la descomposición térmica del contenido orgánico, es decir, al polímero.



**Figura 6.13** Análisis termogravimétrico de los MNGs sintetizados con tPG de 10 kDa.

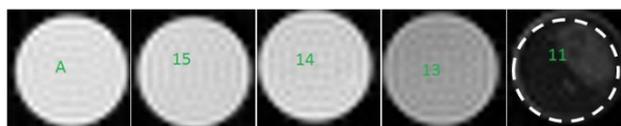
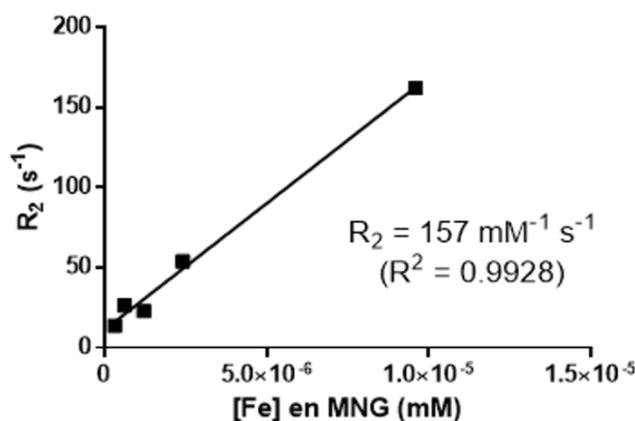
Por otro lado, se estudiaron las propiedades magnéticas del sistema. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Bastian Klemke del Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie de Berlín, Alemania. En la Figura 6.14 se observan medidas de magnetización tanto en función al campo externo aplicado (Figura 6.14 a) como en función de la temperatura (Figura 6.14 b). Se demostró el comportamiento superparamagnético tanto de las MNPs como de los MNGs ya que no se observaron ciclos de histéresis.

Además, se encontró que las MNPs presentaron una magnetización mayor que el MNG. Este resultado puede explicarse debido a que, en la masa total medida para el MNG, parte de la misma corresponde a polímero el cual no tiene propiedades magnéticas. Asimismo, como el sistema contiene un polímero termosensible, se analizó el efecto de la temperatura en el comportamiento magnético del MNG (Figura 6.14 b). La magnetización disminuye linealmente con la temperatura y no se vio afectada cerca de la  $T_{if}$  del sistema (42 °C).



**Figura 6.14** a) Magnetización vs campo magnético externo de MNPs (verde) y MNG (violeta) a 300 K, b) Magnetización vs temperatura de MNG@Tf.

Por otra parte, para demostrar el potencial uso del sistema como agente de contraste, se tomaron imágenes de resonancia magnética (IRM). Como se muestra en la Figura 6. 15, se midieron los tiempos de relajación transversal ( $R_2 = 1 / T_2$ ) de distintas concentraciones de MNG. El valor de relajación  $R_2$  obtenido fue  $(16 \pm 1) \times 10^1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , dentro del rango en el que se encuentran los agentes de contrastes comerciales como el Feridex ( $120 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y el Resovist ( $189 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>21</sup>



**Figura 6. 15** Tiempos de relajación transversal  $R_2$  e imágenes de IMR a distintas concentraciones de hierro.

### 6.3.4 Potenciales aplicaciones de los nanogeles magnéticos en nanomedicina

#### 6.3.4.1 Estudio de liberación controlada de fármacos

Para evaluar la aplicación de los nanogeles como sistemas de liberación controlada de fármacos se prosiguió con los estudios preliminares de encapsulación y liberación de fármacos. En este caso, nuevamente se utilizó como fármaco anticancerígeno modelo, clohidrato de doxorubicina (DOX.HCl).

Para llevar a cabo dicha incorporación, se siguió el protocolo detallado en la Sección de Materiales y métodos 3.2.11.2. De manera general, 5 mg del MNG se pusieron en contacto con 2,5 mL de una solución de DOX.HCl 0,2 mM en buffer acetato pH 5. Los MNGs se mantuvieron bajo agitación mecánica durante 16 h para luego separar magnéticamente los sistemas y lavarlos dos veces con buffer acetato. Luego se procedió a cuantificar el sobrenadante mediante espectrofotetría UV-Vis para poder calcular el porcentaje de fármaco incorporado. Todos los estudios se realizaron por triplicado.

Para evaluar la cantidad de doxorubicina incorporada en los sistemas, se analizaron dos parámetros. El primer parámetro se denomina eficiencia de encapsulación (EE%) y hace referencia a la cantidad de fármaco incorporado en función de la cantidad total a la que se expuso el sistema y se calcula en función de la ecuación 6.2.<sup>22,23</sup>

$$EE\% = \frac{n_{totalDOX} - n_{DOX libre}}{n_{total DOX}} \times 100\% \quad Ec. 6.2$$

Donde  $n_{totalDOX}$  es el número de moles de DOX.HCl presentes en la solución inicial y  $n_{DOX libre}$  el número de moles presentes en la solución remanente.

Por otro lado, otro parámetro es el contenido del fármaco en el nanodispositivo (DLC, por sus siglas en inglés *Drug Loading Content*). El mismo refleja la cantidad de fármaco incorporado en el nanodispositivo y se obtiene a partir de la ecuación 6.3.<sup>22,24</sup>

$$DLC\% = \frac{m_{DOX incorporada}}{m_{total nanodispositivo}} \times 100\% \quad Ec. 6.3$$

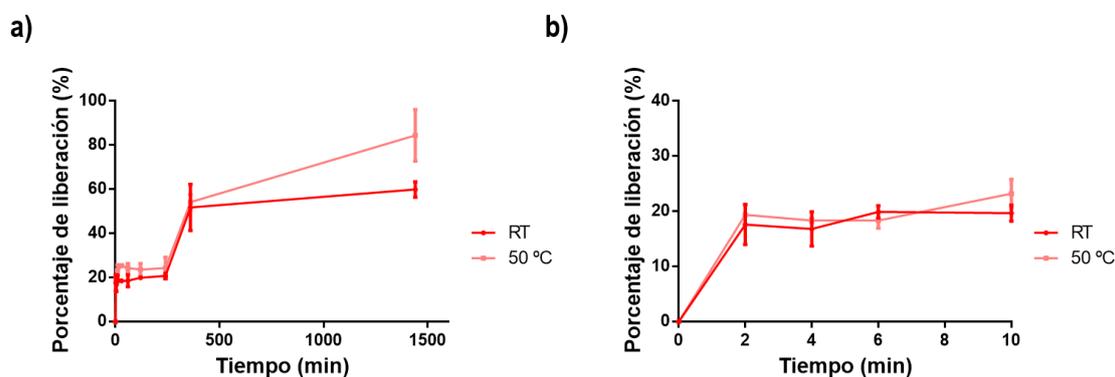
Donde  $m_{DOX incorporada}$  es la masa de DOX.HCl incorporada en el sistema y  $m_{total del nanodispositivo}$  la masa total del nanodispositivo.

Los valores encontrados para la incorporación de DOX.HCl al MNG fueron una EE% = (10 ± 2) % y una DLC% = (6 ± 1) %. Estos valores son ligeramente menores a los esperados para nanogeles, pero puede deberse principalmente a que se utiliza como entrecruzante una nanopartícula rígida como son las nanopartículas de magnetita y a su vez, al ser magnéticas, pueden agregarse disminuyendo el tamaño del poro del nanogel y por consecuencia, reducir el

porcentaje de incorporación del fármaco. De igual manera, también queda pendiente el análisis a distintas condiciones para poder optimizar así la encapsulación del fármaco.

En los estudios de liberación, al ser el polímero utilizado termosensible, se analizó la influencia de la temperatura en el proceso de liberación. Para ello se realizaron 2 experimentos análogos, uno a temperatura ambiente y el otro a 50 °C, por encima de la  $T_{tf}$ . De manera general, el MNG cargado se colocó en buffer fosfato pH 7,5 y se midió la liberación de DOX.HCl a distintos tiempos mediante espectrofotometría UV-Vis como se indica en la Sección Materiales y Métodos 3.2.12. Cada experimento se realizó por triplicado.

Los perfiles de liberación se muestran en la Figura 6. 16 . Se observó una liberación en dos etapas, una liberación rápida en los primeros minutos y luego otra a las 6 h. Este comportamiento puede ser atribuido a la difusión del fármaco de la capa de superficial del nanogel debido a la diferencia en el gradiente de concentración con el entorno exterior como se ha reportado para otros sistemas.<sup>25-27</sup> En este sentido, se puede presumir que primero se libera el fármaco que está interactuando con la capa más superficial del sistema. En una primera aproximación, este comportamiento podría ser justificado debido a que luego de 6 h, las interacciones entre las moléculas del fármaco y las nanopartículas magnéticas como también la red polimérica que componen el nanodispositivo pueden romperse y, liberar así la DOX.HCl. Sin embargo, restan realizar más estudios analizando distintas condiciones de liberación para observar si este comportamiento se mantiene. Este perfil de liberación es realmente alentador ya que podría realizar una liberación a partir de las 6 h, dando tiempo al nanodispositivo para llegar a la zona que ha de ser tratada. Además, se observó que la liberación era sostenida al menos hasta 24 h.



**Figura 6. 16** Perfil de liberación de DOX.HCl de los MNG a temperatura ambiente y 50 °C. a) tiempo total y b) primeros 10 minutos de liberación con sus respectivos errores.

Analizando el efecto de la temperatura, se observó que, a temperatura ambiente (línea roja), luego de las 6 h la liberación del fármaco fue lenta llegando a un 55 % a las 24 h mientras que, a altas temperaturas, 50 °C (línea rosa), se observó una mayor liberación llegando al 80 % liberado luego de las 24 h. Este comportamiento puede atribuirse al carácter termosensible del nanogel: al estar por encima de la temperatura de transición de fase, el sistema colapsa y libera así, más fácilmente el fármaco.

Por lo tanto, debido a que los resultados obtenidos para la liberación de DOX.HCl son muy alentadores, se plantea continuar en el futuro con el estudio y optimización de la liberación de fármacos para luego realizar estudios biológicos analizando este efecto.

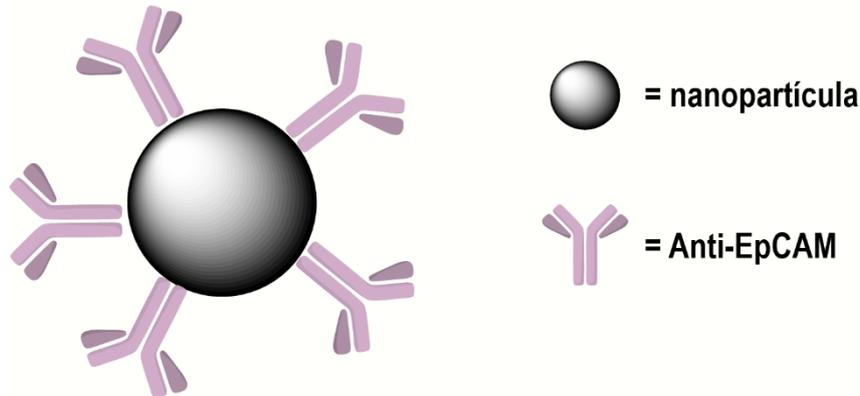
#### 6.3.4.2 Estudios de eficiencia de captura de células circulantes de metástasis (CTCs)

En los últimos años, una amplia rama de la medicina y de la nanomedicina se ha dedicado a la búsqueda de un tratamiento para la cura del cáncer principalmente porque éste puede no sólo afectar localmente a un tejido específico, sino que puede extenderse por todo el cuerpo comprometiendo la vida del paciente. Cuando esto sucede, las células cancerosas se separan del tumor original (primario), viajan a través del sistema sanguíneo y/o linfático y forman un tumor nuevo en otros órganos o tejidos del cuerpo, así ocurre la metástasis.<sup>28-30</sup> Es ésta y no el tumor primario, la responsable de alrededor del 90 % de las muertes causadas por el cáncer.<sup>31,32</sup> Por este motivo resulta sumamente importante la identificación de las células cancerosas que viajan por el organismo, llamadas células circulantes de metástasis (CTCs por sus siglas en inglés). Esto permitiría la optimización de los tratamientos así como el índice de supervivencia de los pacientes.<sup>33</sup> Considerando que las CTCs son extremadamente raras en el torrente sanguíneo, es un gran desafío la detección de las mismas diferenciándolas de las células hematológicas.<sup>34</sup>

En la actualidad, se han desarrollado distintas estrategias para mejorar tanto el aislamiento como la detección de CTCs de muestras en sangre e *in vivo*.<sup>34,35</sup> Entre ellas, las metodologías utilizadas para su aislamiento y detección están basadas en dispositivos del tipo Velcro,<sup>36</sup> dispositivos microfluídicos como CTC-chips,<sup>37</sup> sistemas DEPArray<sup>38</sup> o métodos de enriquecimiento de CTCs, dispositivos electrocinéticos de enriquecimiento<sup>39</sup> y CellCollector.<sup>40</sup> Además, nanopartículas basadas en inmunquímica como CellSearch<sup>41</sup> y MagSweeper pueden identificar y captar CTCs del torrente sanguíneo.<sup>42</sup>

Principalmente, estos sistemas constan de nanopartículas (NPs) recubiertas con anticuerpos (Figura 6. 17) que se interactúan con las moléculas de adhesión pertenecientes a las células epiteliales (EpCAM, por sus siglas en inglés). Las mismas están frecuentemente sobreexpresadas en los carcinomas. Sin embargo, estos experimentos de captura de CTCs

basados en anticuerpos presentan varias desventajas, tales como la baja capacidad de captar las CTCs que carecen de la proteína EpCAM ya que esta glicoproteína no se expresa en los cánceres de origen no epitelial. Asimismo, en las células cancerosas, la EpCAM se expresa de forma heterogénea siendo que algunas células en un tumor tienen más EpCAM que otras células en el mismo tumor.<sup>43,44</sup>



**Figura 6. 17** Esquema de una nanopartícula conjugada con el anticuerpo que reconoce las moléculas de adhesión a las células epiteliales.

En este contexto, el empleo de la glicoproteína transferrina (Tf) como ligando modelo surge como alternativa al uso de anticuerpos para la captura de CTCs ya que se conoce que la concentración del receptor de Tf en muchas células fenotípicas tumorales es considerablemente mayor que en las células normales.<sup>51-54</sup> Banerjee y colaboradores<sup>55</sup> han reportado la síntesis de nanodispositivos magneto-dendrítico conjugados con Tf para la captura rápida y eficiente de células cancerosas sobreexpresoras del receptor de Tf (TfR +) a partir de una suspensión artificial similar a las CTCs. Los mismos aislaron y realizaron imágenes de alta resolución de las CTCs capturadas.

Así, es crucial un diseño y fabricación inteligente de nanodispositivos para mejorar la eficiencia de captura de CTCs.<sup>45</sup> El control de la elasticidad, la estabilidad, el tamaño y la forma de los nanodispositivos tiene un gran impacto en su interacción con los biomateriales tales como las células circulantes.<sup>46-50</sup>

Los nanogeles (NGs) se presentan como prometedores nanodispositivos ya que estos parámetros pueden ser controlados, sumado a la reproducibilidad de su síntesis.<sup>56,57</sup> Como ya se ha mencionado, los NGs híbridos con MNPs han brindado muchas oportunidades para ser utilizados en el campo biomédico, incluyendo las imágenes celulares, la hipertermia, y la liberación avanzada de fármacos.<sup>58,59</sup> Por lo anteriormente expuesto es que resulta de gran interés el diseño de un nanodispositivo para la captura de CTCs basados en nanogeles híbridos. No obstante, es

de suma importancia conocer cómo la MNP puede a ser incorporada al nanogel para optimizar su uso en la captura de CTCs. La incorporación covalente de las MNPs, empleándolas como entrecruzante, podría asegurar la cantidad necesaria de MNPs en el sistema para obtener una fuerza magnética óptima. Además, es de crucial importancia analizar cómo va a ser incorporada la molécula *targeting*.

Hasta el momento, no se encuentran reportes de la utilización de nanogeles magnéticos y termosensibles para la captación de células tumorales circulantes. Para analizar la potencial aplicación de los nanogeles como dispositivos de captura de CTCs los mismos fueron modificados con transferrina. La misma se incorporó de manera covalente conjugándola previamente a un espaciador con terminales azida para evaluar su posterior eficiencia como dispositivo de captura de CTCs.

#### 6.3.4.2.1 Conjugación de la transferrina al espaciador

Para unir de manera covalente la transferrina a los nanogeles magnéticos es necesario conjugar la proteína con un espaciador que tenga un grupo funcional que pueda reaccionar con el nanogel. Por esta razón, se propuso conjugar la transferrina a un espaciador derivado del PEG con un grupo funcional azida. Este grupo podrá reaccionar mediante química click con los grupos BCN de la nanopartícula que no hayan sido involucrados en la formación del nanogel.

Adicionalmente, se quiso estudiar la influencia de la distancia entre el MNG y la Tf en la eficiencia de captura de las CTCs. Para ello, distintos espaciadores con distintos largos de cadena fueron conjugados a la glicoproteína. Se utilizaron distintos espaciadores azido-PEG-N-hidroxisuccinimida ( $N_3$ -PEG<sub>n</sub>-NHS) con cadenas de polietilenglicol de diferente longitud ( $n=4, 8$  y  $12$ ) obtenidos comercialmente. La conjugación se realizó mediante la formación de enlaces amida entre las lisinas presentes en la Tf y los grupos NHS del espaciador (Materiales y métodos 3.2.5), obteniendo el grupo azida libre para la posterior unión de la proteína al nanogel (Figura 6.18). Los conjugados se purificaron mediante diálisis. Además, se estudiaron 5 relaciones de conjugación Tf-espaciador (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20).

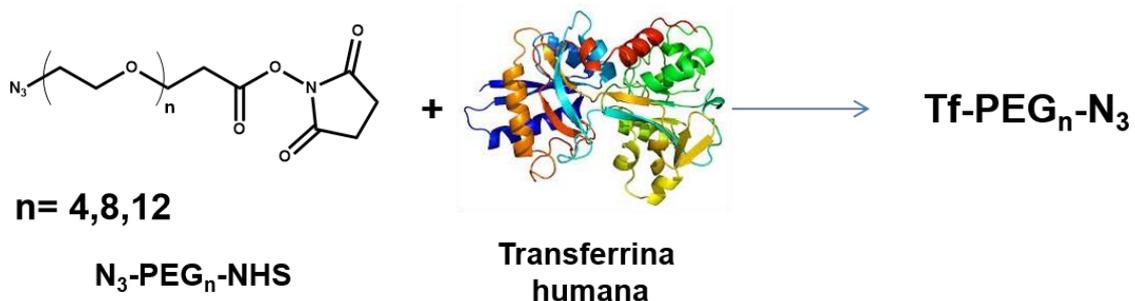


Figura 6.18 Esquema de reacción de la transferrina con el espaciador.

Los conjugados fueron caracterizados mediante RMN <sup>1</sup>H, FT-IR, espectrometría de masas MALDI-TOF y dicroísmo circular (CD). La Figura 6.19 muestra los espectros RMN <sup>1</sup>H y MALDI-TOF para cada espaciador con sus distintas relaciones.

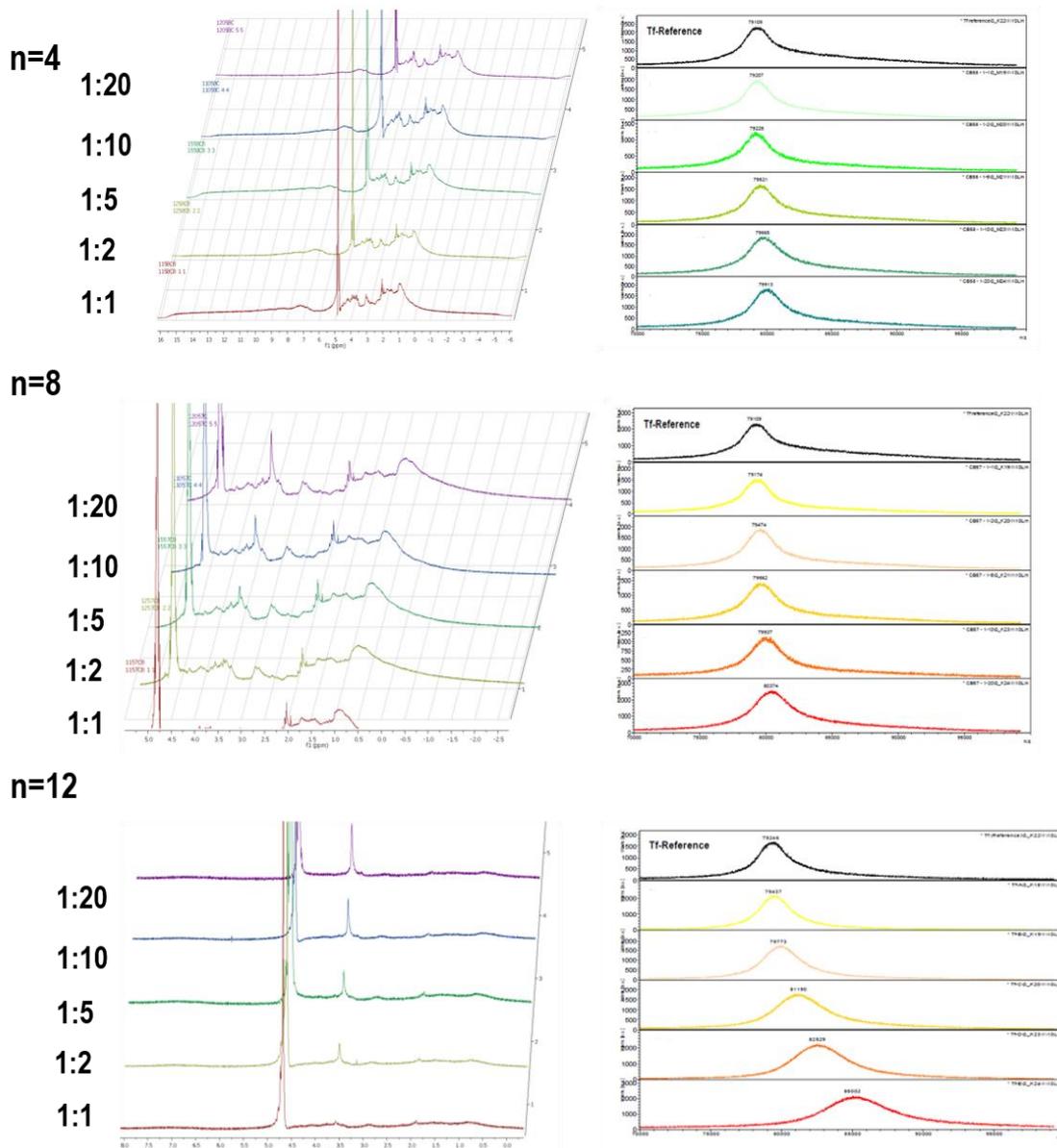


Figura 6.19 Espectro de RMN <sup>1</sup>H (izquierda) y MALDI-TOFF de los conjugados Tf-espaciador con distintas relaciones.

Puede observarse en la Figura 6.19 que en todos los casos aparece la señal alrededor de 3,5 ppm correspondiente a la cadena PEG del espaciador confirmando la conjugación exitosa del espaciador.

Para calcular la eficiencia de conjugación para cada espaciador, es decir, de la relación Tf-espaciador que se utilizó, qué cantidad realmente se conjugó, se empleó espectrometría de masas MALDI-TOF mediante la cual se obtuvo el peso molecular de cada conjugado. En la Tabla 6.1 se muestran los distintos conjugados estudiados.

**Tabla 6.1** Resumen de los resultados de conjugación de la transferrina al espaciador.

Conjugado Tf- espaciador	Largo de la cadena (n) del espaciador	Relación teórica Tf : espaciador	Relación observada Tf : espaciador
1	4	1:1	1:0,5
2		1:2	1:1
3		1:5	1:3
4		1:10	1:5
5		1:20	1:9
6	8	1:1	1:0,5
7		1:2	1:1
8		1:5	1:3
9		1:10	1:5
10		1:20	1:9
11	12	1:1	1:0,5
12		1:2	1:1
13		1:5	1:3
14		1:10	1:5
15		1:20	1:9

Se observó que los valores reales de conjugación para todos los largos de cadena fueron 1:0,5, 1:1, 1:3, 1:5, 1:9. Por lo tanto, se obtuvo que la eficiencia de conjugación fue del 50 % para todos los casos sin importar ni el largo del espaciador ni la relación Tf:espaciador empleada.

Por otro lado, mediante espectroscopia FT-IR se confirmó la conjugación debido a la presencia de la señal correspondiente al grupo azida a  $2099\text{ cm}^{-1}$ . Además, para analizar si la estructura de la proteína se ve afectada debido a la conjugación con el espaciador, se realizaron medidas de dicroísmo circular (CD) para todos los conjugados. A modo representativo, la Figura 6.20 muestra los resultados obtenidos para los conjugados utilizando el espaciador con un largo de 12 unidades de PEG. Tanto para este espaciador como para el otro, no se encontraron cambios estructurales de la transferrina luego de la conjugación ya que no se observó ningún cambio en el perfil obtenido mediante CD en el rango entre 190-240 nm. Este hecho permite afirmar que la conjugación química del espaciador no tiene influencia en la integridad estructural de la proteína.

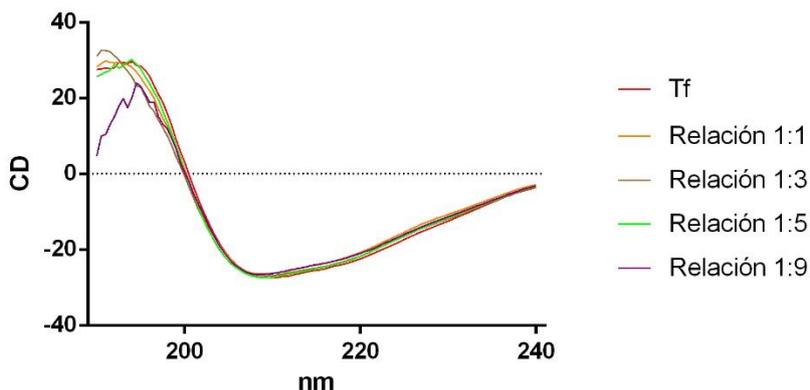


Figura 6.20 Dicroísmo circular de los conjugados Tf-PEG<sub>12</sub>-N<sub>3</sub> con distintas relaciones Tf:espaciador.

6.3.4.2.2 Síntesis de los nanogeles magnéticos funcionalizados con transferrina (MNG@Tf)

En la síntesis de los MNG@Tf, el empleo de las MNP@BCN como bloque constructor tuvo una doble función, actuar como entrecruzante y a su vez, como sitio de anclaje del conjugado Tf-espaciador. Por su parte los conjugados con diferentes largos de cadena PEG unidos químicamente se utilizaron para la posterior detección de las CTCs. Para su síntesis, se realizó un protocolo similar al informado anteriormente, pero al final de la reacción se inyectó al crudo de reacción los distintos conjugados con terminales azida para que reaccionen con los grupos BCN de la nanopartícula que quedaron sin reaccionar como puede observarse en la Figura 6.21.

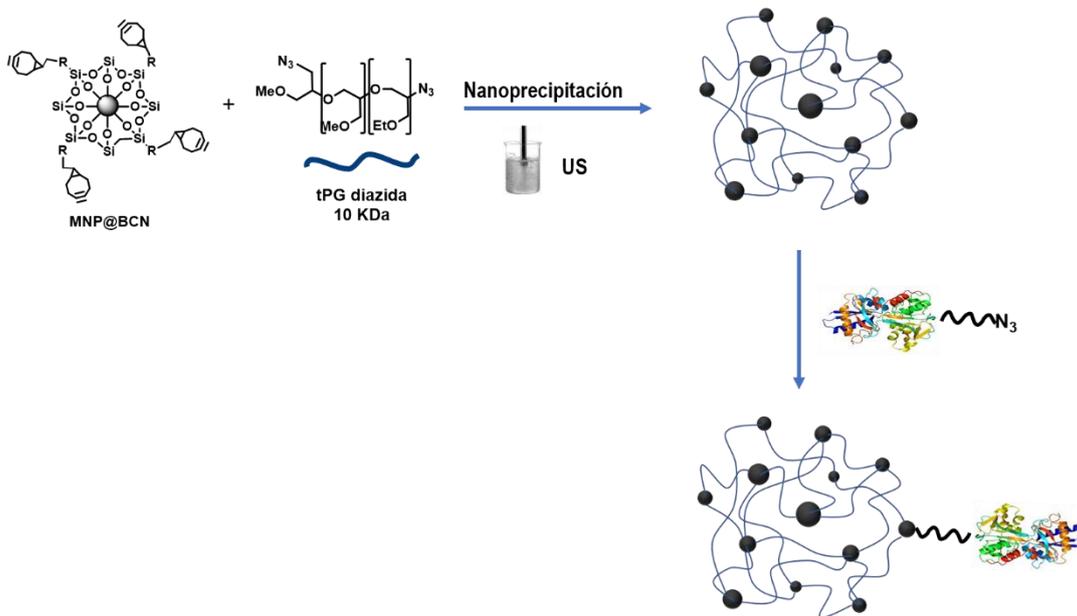


Figura 6.21 a) Metodología de nanoprecipitación asistida por ultrasonificación de punta, b) Esquema de formación de los MNG@Tf.

En la Tabla 6.2 se presenta un resumen de los MNG@Tf obtenidos bajo distintas condiciones junto con el tamaño observado.

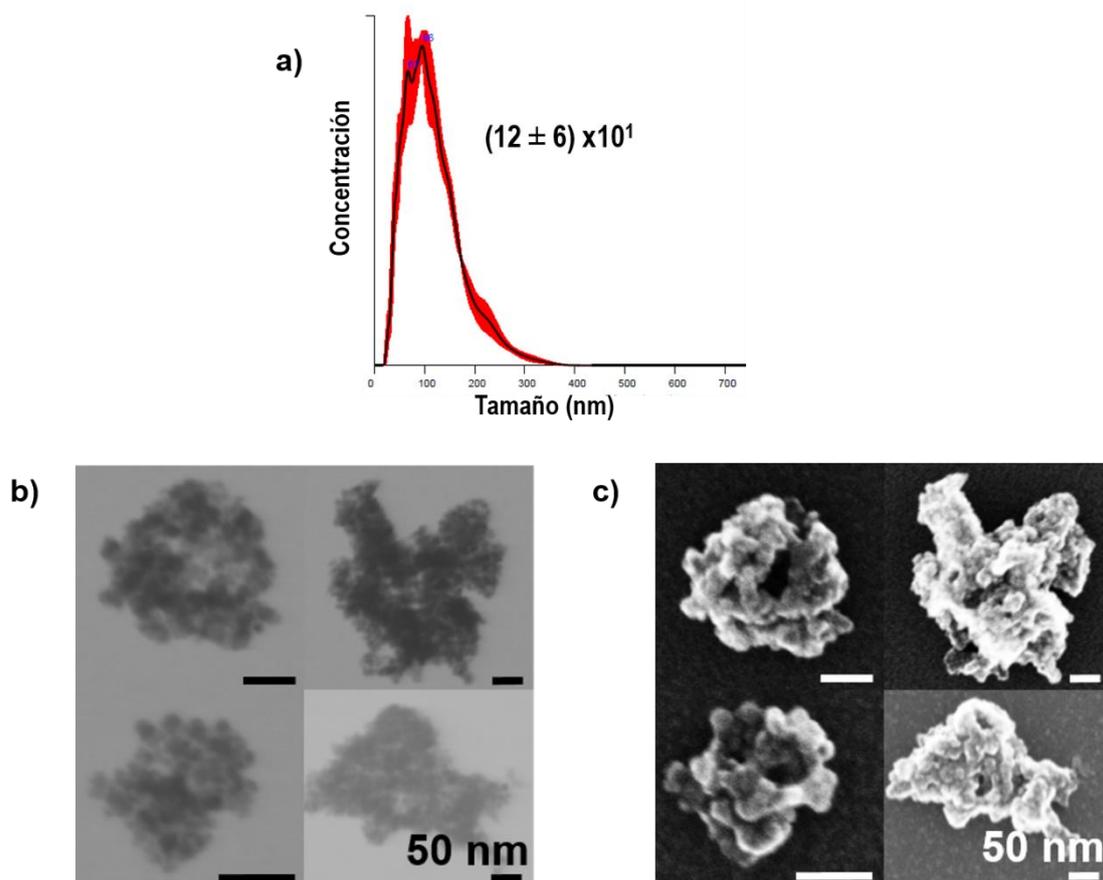
Tabla 6.2 Resultados obtenidos para los distintos MNG@Tf sintetizados.

Muestra	N <sub>3</sub> -tPG-N <sub>3</sub> (KDa)	Tf-PEG <sub>n</sub> -N <sub>3</sub>		Tamaño (nm) <sup>a</sup>	Cantidad de Tf por MNG (μg/mg) <sup>b</sup>
		n	Relación Tf- espaciador		
MNG@Tf 1	5	-	-	(23 ± 9) x10 <sup>1</sup>	-
MNG@Tf 2		4	1:1	(16 ± 9) x10 <sup>1</sup>	4
MNG@Tf 3		8		(11 ± 9) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 4		12		(12 ± 6) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 5		4	1:3	(14 ± 7) x10 <sup>1</sup>	4
MNG@Tf 6		8		(11 ± 4) x10 <sup>1</sup>	4
MNG@Tf 7		12		(13 ± 5) x10 <sup>1</sup>	6
MNG@Tf 8		4	1:5	(15 ± 8) x10 <sup>1</sup>	4
MNG@Tf 9		8		(21 ± 8) x10 <sup>1</sup>	4
MNG@Tf 10		12		(19 ± 7) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 11		4	1:9	(17 ± 9) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 12		8		(16 ± 4) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 13		12		(15 ± 9) x10 <sup>1</sup>	2
MNG@Tf 14	15	8	1:3	(14 ± 4) x10 <sup>1</sup>	2

<sup>a)</sup> Diámetro hidrodinámico por NTA; <sup>b)</sup> Concentración obtenida a través del test de Bradford.

En una primera instancia, se sintetizó el MNG 1 que fue *quencheado* sólo con azidopropanol que se utilizó como control negativo. Luego se sintetizaron los nanogelés magnéticos con distintas relaciones de Tf:espaciador y 3 largos de cadena PEG (MNG 2-MNG 13).

Todos los nanogelés decorados con transferrina (MNG@Tf) resultaron dispersables en agua con un diámetro hidrodinámico en el rango entre 100-200 nm (Tabla 6.2). La cantidad de transferrina presente en los MNGs fue determinada mediante el ensayo de Bradford resultando valores en el intervalo entre 2 y 4 μg/mg de MNG. Mediante espectroscopia FT-IR, se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo azida, este hecho indica que la reacción de cicloadición promovida por tensión anular fue exitosa. Asimismo, se determinó mediante DLS que los MNGs presentaban comportamiento termosensible con una T<sub>tr</sub> alrededor de 42 °. A modo de ejemplo, el valor de diámetro del MNG@Tf 4 observado por NTA fue (12 ± 6) x10<sup>1</sup> (Figura 6. 22 a), a su vez, se encontraron diámetros similares al realizar medidas de microscopía electrónica de transmisión y electrónica de barrido (Figura 6. 22 b y c respectivamente).



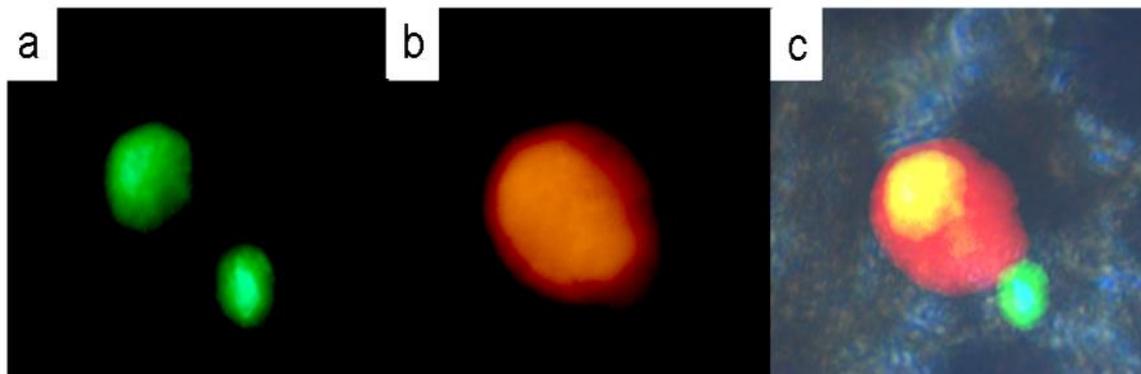
**Figura 6. 22** a) Medida de NTA, b) micrografías TEM y c) SEM de MNG@Tf 4

#### 6.3.4.2.3 Eficiencia de captura de CTCs de los distintos MNG@Tf

Luego de haber caracterizado exhaustivamente los nanogeles, se continuó con el análisis de la eficiencia de captura de células circulantes de metástasis. Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Jayant Khandare del Mahastra Institute of Pharmacy, Kothrud, Pune, India.

Para evaluar la eficiencia de captura de CTCs, los MNG@Tf se mezclaron con células de cáncer de colon humano HCT116-GFP (marcadas) de una suspensión artificial de CTCs y se aislaron después de 5 minutos mediante separación magnética. La suspensión artificial de CTCs se preparó según lo reportado por Banerjee y colaboradores<sup>55</sup>. Células mononucleares de sangre periféricas (hPBMC), ( $5 \times 10^6$  en 1 mL) y células de carcinoma colorrectal humano marcadas con proteína verde fluorescente (HCT116-GFP) en distintas relaciones hPBMC:HCT116 ( $5 \times 10^1$  :1,  $2 \times 10^2$  :1,  $1 \times 10^3$  :1,  $2 \times 10^3$  :1,  $1 \times 10^4$  :1 y  $1 \times 10^5$  :1) fueron preparadas. Se eligió la línea celular HCT116 para el estudio debido a que facilitan la identificación y el recuento basado en imágenes de las CTCs sin la necesidad del marcado adicional con una sonda o la inclusión de anticuerpo de citoqueratina (CK 18) en la suspensión. Luego de la separación magnética, se tomaron imágenes tanto las CTCs capturadas como las remanentes en la suspensión para estimar el número de

CTCs capturadas y remanentes en cada muestra. La Figura 6.23 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de las células capturadas con distintos filtros. En verde se pueden observar las células HCT11-GFP marcadas y en rojo el MNG@Tf marcado con rodamina. Por lo tanto, se comprobó la factibilidad del empleo de los nanogel para la captura de CTCs.



**Figura 6.23** Imágenes de fluorescencia de células HCT116-GFP marcadas capturadas en MNG@Tf. a) con el filtro GFP. b) con el filtro de rodamina B. (c) Imagen multicanal (fusión entre a y b)

La eficiencia de captura se estimó en función del número de células capturadas y las remanentes de acuerdo a la metodología reportada por Zheng y colaboradores<sup>60</sup>. En la Tabla 6.3 se encuentran detalladas las eficiencias de captura para cada MNG@Tf.

**Tabla 6.3** Eficiencia de captura de CTCs para los distintos MNG@Tf sintetizados.

Muestra	N <sub>3</sub> -tPG-N <sub>3</sub> (KDa)	Tf-PEG <sub>n</sub> -N <sub>3</sub>		Eficiencia de captura (%)
		n	Relación Tf- espaciador	
MNG@Tf 1	5	-	-	13
MNG@Tf 2		4	1:1	23
MNG@Tf 3		8		33
MNG@Tf 4		12		23
MNG@Tf 5		4		1:3
MNG@Tf 6		8	81	
MNG@Tf 7		12	67	
MNG@Tf 8		4	1:5	60
MNG@Tf 9		8		65
MNG@Tf 10		12		58
MNG@Tf 11		4	1:9	50
MNG@Tf 12		8		35
MNG@Tf 13		12		50
MNG@Tf 14		15	8	1:3

De manera general, puede observarse en la Tabla 6.2 que todos los sistemas diseñados presentaron una eficiencia de captura de las células circulantes de metástasis. Los porcentajes de eficiencia variaron entre 13% y 81 %.

Al iniciar el análisis de los resultados obtenidos para determinar la eficiencia de captura, se evaluó primero la influencia de la distancia entre el nanogel y la transferrina unida a través del espaciador en los nanogeles sintetizados con el políglicerol termosensible de 5 kDa. En la Figura 6. 24, en verde se muestran los resultados de eficiencia de captura para los nanogeles preparados con la relación transferrina espaciador 1:1. Se encontró que incrementando la longitud de la cadena PEG de 4 a 8, la eficiencia de captura aumenta de 23 % para MNG@Tf 2 a 33% para MNG@Tf 3; sin embargo, la eficiencia disminuyó nuevamente a 23 % al aumentar de 8 a 12 unidades PEG (MNG@Tf 4). Por ende, este comportamiento demostraría que existe una distancia óptima entre la transferrina y el nanogel para la optimización de la eficiencia de captura y esta distancia sería utilizando el espaciador con 8 unidades PEG. Se presume que si se emplea el espaciador de cadena más corta (4 unidades PEG), la transferrina no está expuesta lo suficiente

como para captar las CTCs. De manera similar, si el nanogel está compuesto por el espaciador de cadena más larga (12 unidades PEG), la transferrina podría interactuar con el espaciador como con el nanogel disminuyendo así la interacción entre ella y las CTCs.

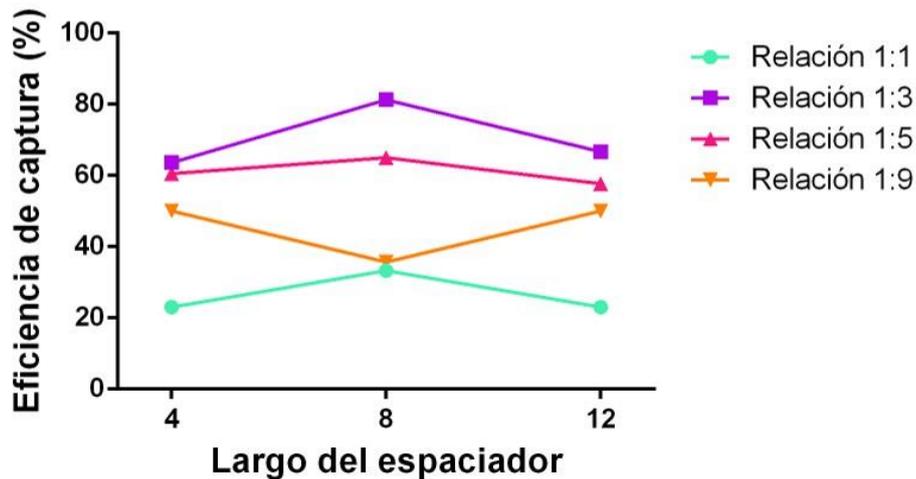


Figura 6. 24 Eficiencia de captura de CTCs en función del largo del espaciador.

Para confirmar esta hipótesis, se realizó un análisis similar con las demás relaciones. Para las relaciones 1:3 y 1:5 se observó la misma tendencia, teniendo mayor eficiencia los nanogeles modificados superficialmente con transferrina utilizando el espaciador de 8 unidades PEG (MNG@Tf 6 y MNG@Tf 9) pero no para la relación 1:9. Este hecho puede explicarse mediante el análisis de las distintas relaciones. En la Figura 6. 25 se encuentra un esquema de los conjugados Tf-espaciador para distintas relaciones. Se presume que al ser la relación más elevada de Tf-espaciador, este último produce un impedimento estérico el cual dificulta la unión del nanogel a las CTCs y por lo tanto todos los nanogeles, independientemente del largo del espaciador utilizado, tienen bajos porcentajes de eficiencias de captura y no se observa ninguna tendencia.

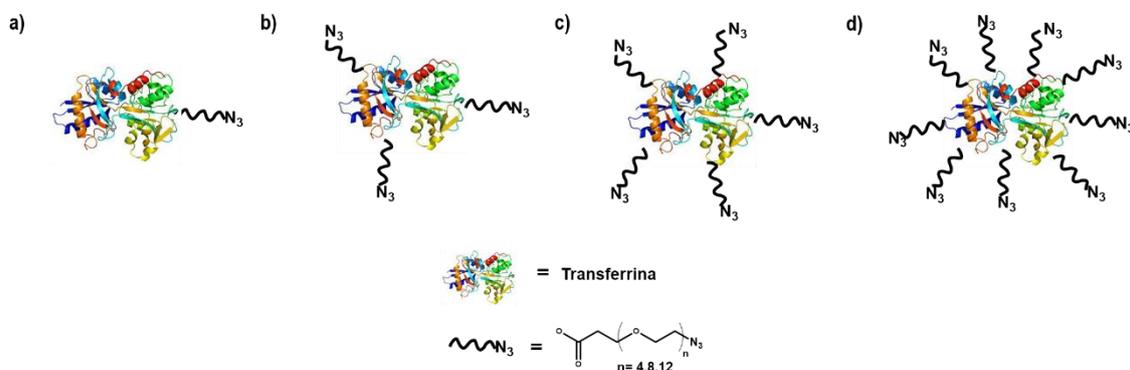
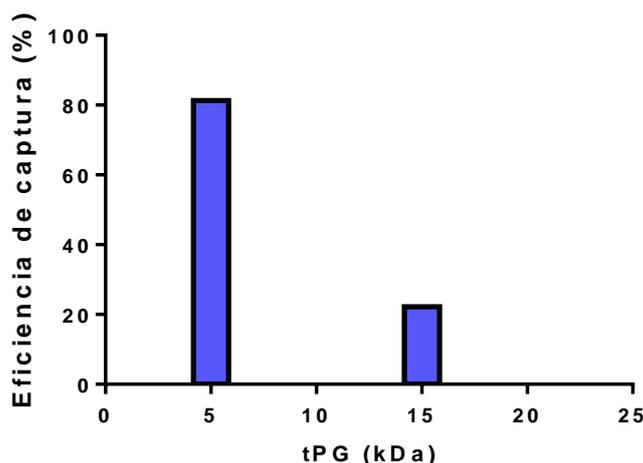


Figura 6. 25 Conjugados Tf:espaciador con distintas relaciones: a) 1:1, b) 1:3, c) 1:5 y d) 1:9.

De forma general, se analizó la eficiencia de captura en función de la relación entre la transferrina y el espaciador presentados en la Tabla 6.3. Se encontró que al aumentar la relación 1:1 a 1:3, la eficiencia de captura aumentaba de un 33 % a 81%; sin embargo, al cambiar la relación de 1:3 a 1:5, los valores de eficiencia disminuyeron de 81 % a 65%. Lo mismo se observó al comparar entre las relaciones 1:5 y 1:9 (de 65 % a 35 %). Por lo tanto, se demostró que hay una relación óptima, 1:3, mediante la cual se permiten mayores interacciones entre los MNG@Tf y las moléculas de adhesión de las CTCs, obteniéndose eficiencias de entre 65-80 %.

Una vez optimizadas las condiciones de síntesis respecto al conjugado, utilizando un espaciador con un largo de la cadena PEG de 8 unidades y una relación transferrina:espaciador de 1:3, se decidió investigar la influencia del largo de polímero en la eficiencia de captura. Para ello, se comparó la eficiencia de captura de CTCs de un nanogel sintetizados bajo estas condiciones con poligliceroles con distinto peso molecular, 5 kDa y 15 kDa (Tabla 6.3 MNG@Tf 6 y 14). En la Figura 6. 26 se muestra la eficiencia de captura de ambos sistemas.



**Figura 6. 26** Eficiencia de captura en función del peso molecular del poliglicerol utilizado (5 y 15 kDa).

Se encontró que al aumentar el peso molecular del poliglicerol, la eficiencia de captura disminuyó en gran proporción. Si se considera que al incrementar el peso molecular del polímero y por ende su largo, los poros del nanogel también aumentan, la transferrina en el nanogel de 15 kDa podría encontrarse obstruida en el interior de las cavidades del mismo, conduciendo así a una menor eficiencia de captura. Asimismo, la manipulación de este sistema resultó dificultosa tanto durante la síntesis, la purificación como en la caracterización, debido al carácter oleoso de la muestra.

A partir de todos estos resultados, se concluyó que el sistema óptimo para la captura de CTCs era el MNG@Tf 6, con espaciador con 8 unidades PEG, una relación Tf:espaciador 1:3 y utilizando tPG de 5 kDa, el cual tuvo una eficiencia de captura del 81 % (Tabla 6.3, MNG@Tf 6).

Por lo anteriormente expuesto, se decidió elegir este sistema para realizar experimentos preliminares de captura de CTCs en sangre que son estudiados actualmente en el laboratorio del Dr. Jayant Khandare.

## 6.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se logró la síntesis de nanogeles magnéticos decorados con transferrina mediante una metodología basada en ultrasonificación y una cicloadición de Huisgen azida-alquino promovida por tensión anular. Para ello, se sintetizaron y modificaron nanopartículas magnéticas con el fin de obtener el grupo BCN. Además, se sintetizaron diferentes poligliceroles lineales termosensibles con terminales azida y se conjugaron, en distintas relaciones, espaciadores con terminales azida a la transferrina.

En un primer lugar, se sintetizaron exitosamente las MNP@BCN. Asimismo, se obtuvieron los poliglicerol diazidados. Una vez obtenidos los bloques constructores, se sintetizaron diferentes nanogeles magnéticos con gran facilidad en cortos tiempos de reacción. Los nanogeles presentaron tamaños entre 100 y 200 nm, con una morfología globular no uniforme y se demostró su comportamiento termosensible. A su vez, el sistema presentó un comportamiento termosensible con una  $T_{if}$  de 42 °C. Adicionalmente, se analizaron las propiedades magnéticas del sistema obteniendo propiedades superparamagnéticas y valores de relajación similares al de los agentes de contraste comerciales empleados en IRM, por lo que este sistema puede utilizarse para diagnóstico por imagen y tratamiento por hipertermia.

Se comprobó que al utilizar esta metodología sintética se logra tanto un control del tamaño como de la polidispersidad del sistema. Otra ventaja es que es una síntesis muy sencilla con tiempos de cortos de reacción en comparación a los antecedentes reportados.

Para evaluar el potencial de estos sistemas en nanomedicina se realizaron estudios de liberación controlada de clorhidrato de doxorubicina y de captura de CTCs. Se encontró un perfil de liberación realmente alentador ya que podría realizar una liberación a partir de las 6 h, dando tiempo al nanodispositivo para llegar a la zona que ha de ser tratada. También se demostró cómo influye el comportamiento termosensible del nanogel en la liberación observándose una mayor velocidad al realizar el experimento a 50 °C. Se plantea el posterior estudio y optimización de la liberación de fármacos para luego realizar estudios biológicos analizando este efecto.

Para evaluar los nanogeles magnéticos como dispositivos de captura de CTCs, los mismos fueron modificados superficialmente con transferrina a través de diferentes espaciadores con distintos largos de la cadena PEG. Se evaluaron las eficiencias de captura de CTCs de todos los sistemas, encontrándose una dependencia tanto en el largo del espaciador utilizado como en su relación con respecto a la transferrina. Se concluyó que el sistema óptimo para la captura de CTCs era aquél con espaciador con 8 unidades PEG, una relación Tf:espaciador 1:3 y utilizando tPG de 5 kDa ya que con esta proteína se obtuvo una eficiencia de captura de 80 %.

Por lo tanto, se demostró la versatilidad del empleo de los MNGs en nanomedicina. Esto se debe principalmente a que de acuerdo a los resultados obtenidos; por un lado, los MNGs muestran potencial aplicación como dispositivos de captura de células circulantes de metástasis ya que se obtuvieron altas eficiencias de captura y se estudió el potencial de estos sistemas para la liberación controlada de fármacos, y por otro, la caracterización magnética denotó las propiedades del sistema que permitirían que fuese utilizado como agente de contraste en diagnóstico por imágenes de resonancia magnética siendo que se obtuvieron valores de relajación similares al de los agentes de contraste comercialmente disponibles.

Por último, cabe destacar que es la primera vez que se logra obtener un nanogel magnético decorado con transferrina mediante ultrasonificación con notables mejoras y, por lo tanto, este trabajo de tesis realizó un importante aporte en el área del diseño de materiales ya que hasta el momento no se han reportado antecedentes similares con tan prometedores resultados en cuanto a la versatilidad del sistema.

## 6.5 REFERENCIAS

1. Lutz JF, Zarafshani Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne “click” chemistry. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(9):958-970. doi:10.1016/j.addr.2008.02.004.
2. Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2014;35(18):4969-4985. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.001.
3. Fu GD, Jiang H, Yao F, Xu LQ, Ling J, Kang ET. Preparation of fluorescent organometallic porphyrin complex nanogels of controlled molecular structure via reverse-emulsion click chemistry. *Macromol Rapid Commun.* 2012;33(18):1523-1527. doi:10.1002/marc.201200337.
4. Chen J, Zou Y, Deng C, Meng F, Zhang J, Zhong Z. Multifunctional Click Hyaluronic Acid Nanogels for Targeted Protein Delivery and Effective Cancer Treatment in Vivo. *Chem Mater.* 2016;28(23):8792-8799. doi:10.1021/acs.chemmater.6b04404.
5. Li S, Zhang J, Deng C, Meng F, Yu L, Zhong Z. Redox-Sensitive and Intrinsically Fluorescent Photoclick Hyaluronic Acid Nanogels for Traceable and Targeted Delivery of Cytochrome c to Breast Tumor in Mice. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(33):21155-21162. doi:10.1021/acsami.6b05775.
6. Zhang Y, Ding J, Li M, et al. One-Step “click Chemistry”-Synthesized Cross-Linked Prodrug Nanogel for Highly Selective Intracellular Drug Delivery and Upregulated Antitumor Efficacy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(17):10673-10682. doi:10.1021/acsami.6b00426.
7. Heller DA, Levi Y, Pelet JM, et al. Modular “click-in-emulsion” bone-targeted nanogels. *Adv Mater.* 2013;25(10):1449-1454. doi:10.1002/adma.201202881.
8. Steinhilber D, Witting M, Zhang X, et al. Surfactant free preparation of biodegradable dendritic polyglycerol nanogels by inverse nanoprecipitation for encapsulation and release of pharmaceutical biomacromolecules. *J Control Release.* 2013;169(3):289-295. doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.008.
9. Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderón M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym Chem.* 2014;5:6909-6913. doi:10.1039/C4PY01186D.
10. Cappelletti A. Síntesis , caracterización y modificación química superficial de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro . Obtención de nanomateriales magnéticos híbridos. 2014:Tesis doctoral. UNC-Argentina.
11. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B.* 2015;3:6117-6147. doi:10.1039/C5TB00664C.
12. Bloemen M, Brullot W, Luong TT, Geukens N, Gils A, Verbiest T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Nanopart Res.* 2012;14(9):1100. doi:10.1007/s11051-012-1100-5.
13. Gisin BF. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal*

- Chim Acta*. 1972;58(C):248-249. doi:10.1016/S0003-2670(00)86882-8.
14. Wang W, Vaughn MW. Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning*. 2008;30(2):65-77. doi:10.1002/sca.20097.
  15. Calderón M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R. Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Adv Mater*. 2010;22(2):190-218. doi:10.1002/adma.200902144.
  16. Weinhart M, Becherer T, Schnurbusch N, Schwibbert K, Kunte HJ, Haag R. Linear and hyperbranched polyglycerol derivatives as excellent bioinert glass coating materials. *Adv Eng Mater*. 2011;13(12):501-510. doi:10.1002/adem.201180012.
  17. Khandare J, Calderón M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2824-2848. doi:10.1039/C1CS15242D.
  18. Tonhauser C, Schüll C, Dingels C, Frey H. Branched acid-degradable, biocompatible polyether copolymers via anionic ring-opening polymerization using an epoxide inimer. *ACS Macro Lett*. 2012;1(9):1094-1097. doi:10.1021/mz300265z.
  19. Schulte B, Walther A, Keul H, Möller M. Polyglycidol-based prepolymers to tune the nanostructure of microgels. *Macromolecules*. 2014;47(5):1633-1645. doi:10.1021/ma401465c.
  20. Reineke TM. Stimuli-Responsive Polymers for Biological Detection and Delivery. *ACS Macro Lett*. 2016;5(1):14-18. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00862.
  21. Gonçalves C, Silva JP, Antunes IF, et al. Dextrin-Based Nanomagnetogel: In Vivo Biodistribution and Stability. *Bioconjug Chem*. 2015;26(4):699-706. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00024.
  22. Anirudhan TS, Sandeep S. Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells. *J Mater Chem*. 2012;22(25):12888. doi:10.1039/c2jm31794j.
  23. Wang H, Ke F, Mararenko A, Wei Z, Banerjee P, Zhou S. Responsive polymer-fluorescent carbon nanoparticle hybrid nanogels for optical temperature sensing, near-infrared light-responsive drug release, and tumor cell imaging. 2014;6(13):7443-7452. doi:10.1039/c4nr01030b.
  24. Xu H-L, Mao K-L, Huang Y-P, et al. Glioma-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles as drug-carrying vehicles for theranostic effects. *Nanoscale*. 2016;8:14222-14236. doi:10.1039/c6nr02448c.
  25. Jain TK, Richey J, Strand M, Leslie-Pelecky DL, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2008;29(29):4012-4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.004.
  26. Akbarzadeh A, Mikaeili H, Zarghami N, Mohammad R, Barkhordari A, Davaran S. Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:511-526. doi:10.2147/IJN.S24326.

27. Kamba SA, Ismail M, Hussein-Al-Ali SH, Ibrahim TAT, Zakaria ZAB. In vitro delivery and controlled release of doxorubicin for targeting osteosarcoma bone cancer. *Molecules*. 2013;18(9):10580-10598. doi:10.3390/molecules180910580.
28. Cáncer metastático. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. <https://www.cancer.gov/espanol>.
29. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):398-406. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.001.
30. He Q, Guo S, Qian Z, Chen X. Development of individualized anti-metastasis strategies by engineering nanomedicines. *Chem Soc Rev*. 2015;44:6258-6286. doi:10.1039/c4cs00511b.
31. Gao Y, Xie J, Chen H, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnol Adv*. 2014;32(4):761-777. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.013.
32. Veisheh O, Kievit FM, Ellenbogen RG, Zhang M. Cancer Cell Invasion: Treatment and Monitoring Opportunities in Nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):582-596. doi:10.1016/j.addr.2011.01.010.
33. Kaiser J. Cancer's Circulation Problem. *Science (80- )*. 2010;327:1072-1074. doi:10.1126/science.327.5969.1072.
34. Lokody I. Cancer genetics: The origin and evolution of an ancient cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(3):152. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3686>.
35. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells[mdash]biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(3):129-144. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>.
36. Hou S, Zhao H, Zhao L, et al. Capture and stimulated release of circulating tumor cells on polymer-grafted silicon nanostructures. *Adv Mater*. 2013;25(11):1547-1551. doi:10.1002/adma.201203185.
37. Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-1239. doi:10.1038/nature06385.
38. Abonnenc M, Borgatti M, Fabbri E, et al. Lysis-on-chip of single target cells following forced interaction with CTLs or NK cells on a dielectrophoresis-based array. *J Immunol*. 2013;191(7):3545-3552. doi:10.4049/jimmunol.1300890.
39. Dharmasiri U, Njoroge SK, Witek MA, et al. High-Throughput Selection , Enumeration , Electrokinetic Manipulation , and Molecular Profiling of Low-Abundance Circulating Tumor Cells Using a Microfluidic System. *Anal Chem*. 2011;83(5):2301-2309. doi:10.1021/Ac103172y.
40. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012;41(4):1241-1250. doi:10.3892/ijo.2012.1557.
41. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All

- Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Non. *Clin Cancer Res.* 2005;10(October):6897-6904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.
42. Talasz AH, Powell A a, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3970-3975. doi:10.1073/pnas.0813188106.
  43. Chen C, Zimmermann M, Tinhofer I, Kaufmann AM, Albers AE. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2013;338(1):47-56. doi:10.1016/j.canlet.2012.06.013.
  44. Shen Z, Wu A, Chen X. Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem Soc Rev.* 2017;46:2038-2056. doi:10.1039/C6CS00803H.
  45. Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(3):284-304. doi:10.1016/j.addr.2009.11.002.
  46. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater.* 2009;8(7):543-557. doi:10.1038/nmat2442.
  47. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology.* 2014;12(1):5. doi:10.1186/1477-3155-12-5.
  48. Papp I, Sieben C, Sisson AL, et al. Inhibition of Influenza Virus Activity by Multivalent Glycoarchitectures with Matched Sizes. *ChemBioChem.* 2011;12(6):887-895. doi:10.1002/cbic.201000776.
  49. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11613-11618. doi:10.1073/pnas.0801763105.
  50. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater.* 2009;8(1):15-23. doi:10.1038/nmat2344.
  51. Tsuji T, Yoshitomi H, Usukura J. Endocytic mechanism of transferrin-conjugated nanoparticles and the effects of their size and ligand number on the efficiency of drug delivery. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2013;62(3):341-352. doi:10.1093/jmicro/dfs080.
  52. Wagner E, Curiel D, Cotten M. Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 1994;14(1):113-135. doi:10.1016/0169-409X(94)90008-6.
  53. Banerjee SS, Khutale G V., Khobragade V, et al. Biofunctionalized Capillary Flow Channel Platform Integrated with 3D Nanostructured Matrix to Capture Circulating Tumor Cells. *Adv Mater Interfaces.* 2017;4(4):1600934. doi:10.1002/admi.201600934.
  54. Sun L, Wu Q, Peng F, Liu L, Gong C. Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015;135:56-72. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.07.013.
  55. Banerjee SS, Jalota-Badhwar A, Satavalekar SD, et al. Transferrin-mediated rapid

- targeting, isolation, and detection of circulating tumor cells by multifunctional magneto-dendritic nanosystem. *Adv Heal Mater.* 2013;2(6):800-805. doi:10.1002/adhm.201200164.
56. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci.* 2008;33(4):448-477. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002.
  57. Kabanov A V., Vinogradov S V. Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew Chemie - Int Ed.* 2009;48(30):5418-5429. doi:10.1002/anie.200900441.
  58. Molina M, Asadian-Birjand M, Balach J, Bergueiro J, Miceli E, Calderón M. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 2015;44(17):6161-6186. doi:10.1039/C5CS00199D.
  59. Karg M, Hellweg T. Smart Microgel / Nanoparticle Hybrids with Tunable Optical Properties. In: *Hydrogel Micro and Nanoparticles.* ; 2012:257-279.
  60. Zheng XJ, Cheung LSL, Schroeder JA, Jiang L, Zohar Y. A high-performance microsystem for isolating viable circulating tumor cells. *Lab Chip.* 2011;(11):3269-3276. doi:10.1039/c1lc20331b.





**SECCIÓN 4**

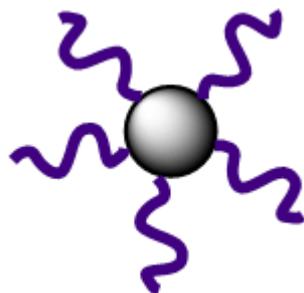
**NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS CORE-  
BRUSH**





# Capítulo 7

## SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS *CORE-BRUSH* MEDIANTE ATRP

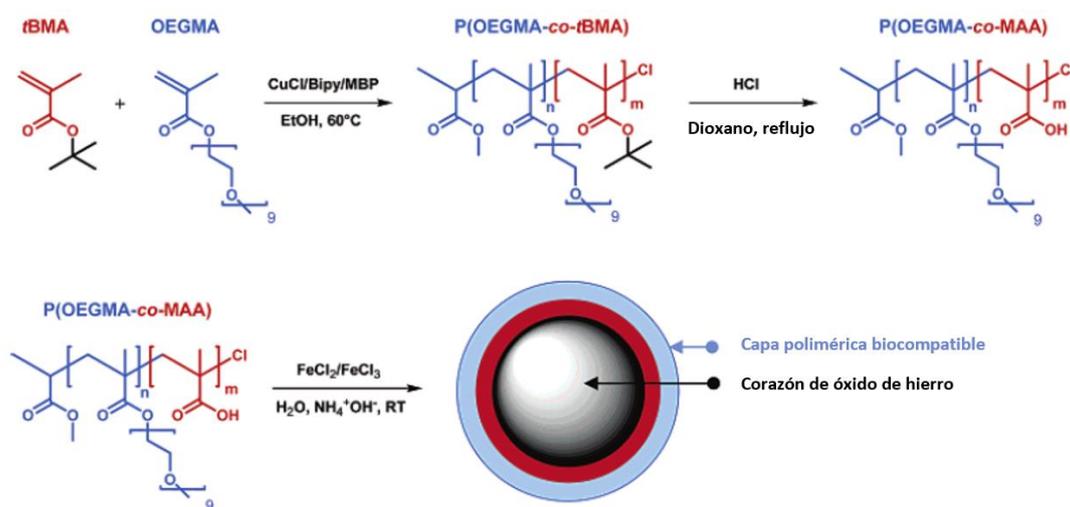




## 7.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas sin modificar pueden ser fácilmente captadas por el sistema retículo endotelial (RES). Para ralentizar el proceso de reconocimiento por el RES se recurre a distintas estrategias de recubrimiento de las nanopartículas que permiten que no sean reconocidas temporariamente aumentando así su tiempo de vida medio de circulación en el torrente sanguíneo.<sup>1</sup> Una de las estrategias más utilizadas es la modificación superficial de las mismas con cadenas poliméricas.<sup>2</sup>

Dentro de estas estrategias de modificación de nanopartículas magnéticas, una de las más difundidas consiste en el empleo de oligoetilenglicoles para la obtención de cadenas poliméricas que recubran la nanopartícula. En la actualidad, existen diversos reportes del injerto de un polímero en la superficie de la nanopartícula magnética. Por ejemplo, Lutz y colaboradores<sup>3</sup> estudiaron la síntesis de nanopartículas magnéticas en presencia de distintas concentraciones del copolímero P(OEGMA-co-MAA) como se esquematiza en la Figura 7.1.



**Figura 7.1** Síntesis de copolímero P(OEGMA-co-MAA) y síntesis *in situ* de las MNPs en presencia del copolímero. Reproducido de la referencia 3.

Las nanopartículas obtenidas tenían tamaños entre 10-25 nm en función de la cantidad de copolímero utilizada y exhibieron una estabilidad coloidal a largo plazo en solución de buffer fisiológico. Además, fueron empleadas en estudios *in vivo* para su uso como agente de contraste en resonancia magnética. Los resultados obtenidos demostraron que las MNPs no se acumularon en el hígado luego de varias horas y, por lo tanto, este análisis es una prueba indirecta de la prolongada circulación del sistema en el torrente sanguíneo. Asimismo, Lu y colaboradores<sup>4</sup> reportaron nanopartículas magnéticas *core-brush* obtenidas mediante el injerto de P(PEGMA), sintetizado previamente mediante ATRP. Para realizar dicho injerto, el polímero

se modificó previamente con el agente silano APTES. Además, incorporaron de manera covalente el colorante isocianato de fluoresceína (FITC) obteniendo así nanopartículas no sólo magnéticas sino también fluorescentes. De manera similar, Fan junto a su grupo de investigación<sup>5</sup> sintetizaron mediante ATRP en masa P(PEGMA) que luego se injertó en las nanopartículas magnéticas encontrándose que la absorción de las MNPs por las células macrófagas se redujo en dos órdenes de magnitud tras el injerto de la superficie con P(PEGMA).

Adicionalmente, Chanana y su grupo de investigación<sup>6</sup> sintetizaron nanopartículas tipo *core-brush* a partir de copolímeros de P(MEO<sub>2</sub>MA-co-OEGMA) variando la relación entre ambos y la nanopartículas de magnetita. Asimismo, el copolímero fue modificado con un colorante obteniendo un nanodispositivo que puede ser utilizado tanto para administración de fármacos guiada como para diagnóstico por fluorescencia. A su vez, Huang y colaboradores<sup>7</sup> reportaron nanopartículas magnéticas recubiertas con poli(glicidilmetacrilato)-co-poli(etilenglicol)éter metacrilato (P(GMA-co-PEGMA)) y se conjugó ácido fólico. Estos sistemas demostraron ser altamente estables en medio acuoso y tener baja toxicidad en células de mamíferos, pudiendo evadir los macrófagos y siendo altamente eficientes en el direccionamiento específico hacia los tumores, demostrando así su potencial para aplicaciones *in vivo*. Además, Thomson *et al.*<sup>8</sup> obtuvieron MNPs recubiertas con un copolímero de monómeros OEGMA modificado con terminales azida e hidroxilo. Esto proporcionó a las nanopartículas una funcionalidad química extra mediante a los grupos azida para acoplamiento e inmovilización de oligonucleótidos.

Sin embargo, hasta el momento existen muy pocos antecedentes del crecimiento de cadenas poliméricas de MEO<sub>2</sub>MA y OEGMA desde la superficie de la nanopartícula. Por esta razón se decidió realizar un estudio exhaustivo sobre el crecimiento de este copolímero a partir de la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro.

## 7.2 OBJETIVOS

En el capítulo 5 se describió la síntesis de nanogeles magnéticos utilizando monómeros derivados del oligoetilenglicol y nanopartículas de óxido de hierro como entrecruzantes. Al haber obtenido prometedores resultados se planificó el diseño racional de nanopartículas magnéticas y termosensibles tipo *core-brush* utilizando los mismos bloques constructores para luego realizar una comparación entre ambos sistemas. Para la obtención de estos sistemas, se propuso utilizar como técnica de polimerización controlada como es la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP), evaluando distintos factores como la naturaleza del iniciador, el ligando utilizado, el tiempo de reacción, los métodos de síntesis, etc.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y funcionalizar las nanopartículas magnéticas para su empleo como iniciador en la ATRP.
- Estudiar la síntesis de nanopartículas *core-brush* magnéticas. Analizar los parámetros para la optimización de las condiciones de síntesis.
- Caracterizar las nanopartículas *core-brush*.

### **7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

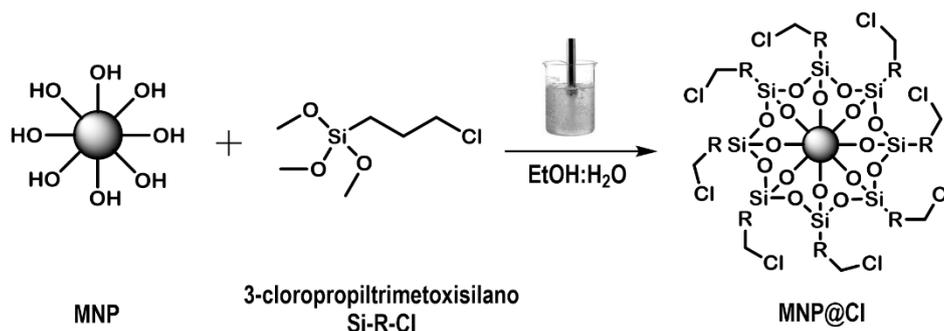
En la actualidad existen pocos reportes de la síntesis nanopartículas *core-brush* utilizando como iniciador la misma superficie de la nanopartícula y monómeros derivados del oligoetilenglicol. Por tal motivo se planteó la síntesis y la modificación de las MNPs para luego emplearlas como iniciadores de la polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP). Se evaluaron distintas condiciones de síntesis para la optimización del sistema.

#### **7.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas**

Considerando que las MNPs se utilizarían como iniciadores de la polimerización ATRP, las mismas debían ser modificadas adecuadamente. Como se ha mencionado, la ATRP requiere como iniciador a un compuesto que tenga un grupo funcional halógeno. El halógeno es abstraído por el complejo de cobre para generar el radical con el cual se inicia la polimerización. Por lo general, se emplean compuestos funcionalizados con grupos bromuro ya que éste es mejor grupo saliente y, por lo tanto, la velocidad de reacción es mayor. Sin embargo, como estos compuestos tienen costos elevados, por lo que se plantea la utilización de compuestos clorados, aunque su reactividad es menor. En este contexto, se estudió la síntesis de dos tipos de iniciadores: nanopartículas magnéticas silanizadas con terminales cloruro y nanopartículas silanizadas con terminales bromuro.

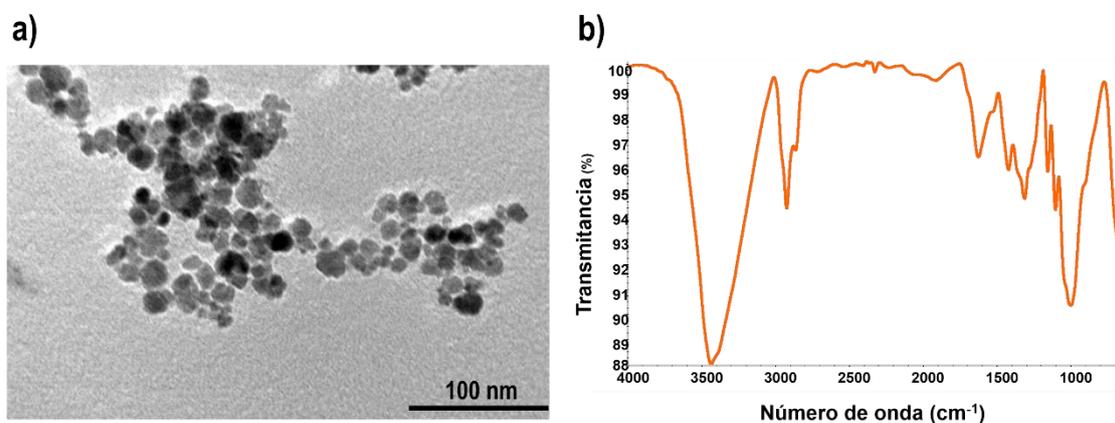
Primero, se sintetizaron las nanopartículas magnéticas con la metodología de coprecipitación de sales de hierro.<sup>9</sup> Al igual que lo descrito en capítulos anteriores, se obtuvieron partículas esféricas y monodispersas con un tamaño promedio de  $5 \pm 2$  nm. Se eligieron nuevamente las MNPs por los resultados prometedores obtenidos, encontrando que las mismas tenían propiedades potenciales como agentes de contraste para resonancia magnética, para terapia guiada y tratamiento por hipertermia.

Por un lado, para la modificación superficial de las MNPs con grupos cloruro se llevó a cabo mediante silanización de las mismas con 3-cloropropil trimetoxisilano (CPM) mediante una metodología ya reportada, mejorada con el empleo de ultrasonificación (Materiales y métodos 3.2.3.4.1).<sup>10</sup> El esquema de reacción se muestra en la Figura 7.2. Se utilizó nuevamente un ultrasonicador de punta para incrementar la energía del proceso de modificación superficial y con el fin de evitar la agregación de las MNPs obteniendo tiempos de reacción de 10 minutos.



**Figura 7.2** Modificación superficial de MNP con 3-cloropropiltrimetoxisilano.

El tamaño de las nanopartículas se mantuvo constante luego de la modificación con el silano como se observa en las imágenes TEM de la Figura 7.3 a).



**Figura 7.3** a) Imágen TEM y b) Espectro FT-IR de las MNP@Cl.

La incorporación del agente silano CPM en las MNPs se corroboró mediante espectroscopia FT-IR. En la Figura 7.3 b) se encuentra el espectro FT-IR de la nanopartícula silanizada donde puede observarse la aparición 2 señales nuevas. Por un lado, alrededor de a  $1200\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda característica de la tensión Si-O de los silanos. Asimismo, pueden contemplarse las señales características de la cadena carbonada del silano a  $2916\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento C-H alifático. La tensión C-Cl que sale alrededor de  $580\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  no se diferencia de la correspondiente a la tensión Fe-O. Sin embargo, al estar presentes las demás bandas, puede concluirse que la nanopartícula ha sido exitosamente silanizada.

Por otro lado, para realizar la modificación superficial de las nanopartículas con bromuro en dos pasos, se silanizaron las MNPs con APTES como ya se describió en el Capítulo 6 y luego se modificaron con bromuro de 2-bromoisobutirilo siguiendo el protocolo reportado por Liu y colaboradores<sup>11</sup> (Materiales y Métodos 3.2.3.4.2). En la Figura 7.4 se muestra el esquema de reacción para la obtención de las nanopartículas modificadas con grupos bromuro (MNP@Br).

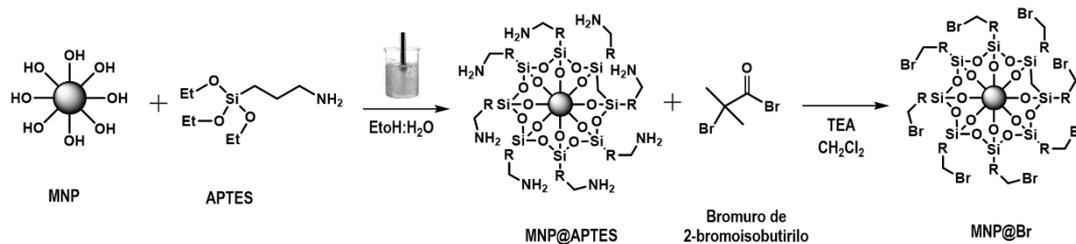


Figura 7.4 Modificación superficial de las nanopartículas con grupos bromuro.

Se confirmó mediante TEM que el tamaño de las nanopartículas no se vio alterado por la modificación superficial. En la Figura 7.5 se encuentra el espectro FT-IR de las MNP@Br. De manera similar al espectro obtenido para las MNP@Cl, se observan alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  la banda característica de la tensión Si-O de los silanos y las señales características de la cadena carbonada tanto del silano como del 2-bromoisobutirilo a  $2916\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento C-H alifático y la tensión C=O a  $1700\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbonilo presente en la cadena del 2-bromoisobutirilo. La tensión C-Br que sale alrededor de  $580\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  y no se diferencia de la correspondiente a la tensión Fe-O. Sin embargo, debido a la presencia de las señales características del 2-bromoisobutirilo se puede confirmar que la modificación superficial con grupos bromuros ha sido exitosa.

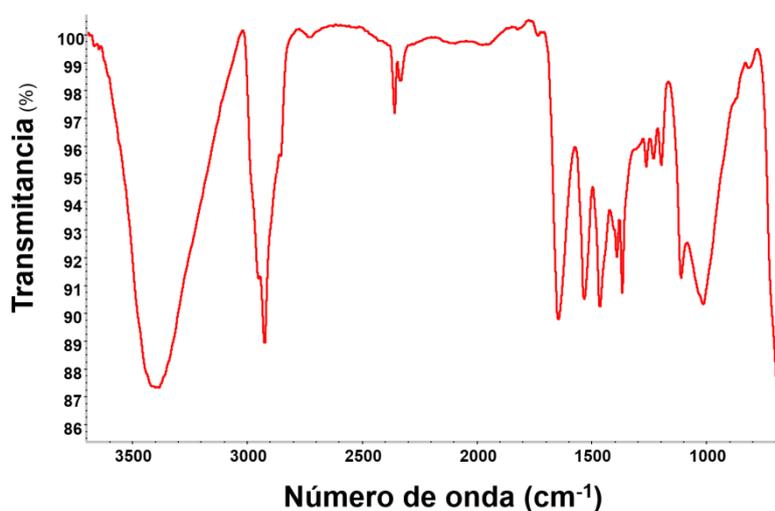


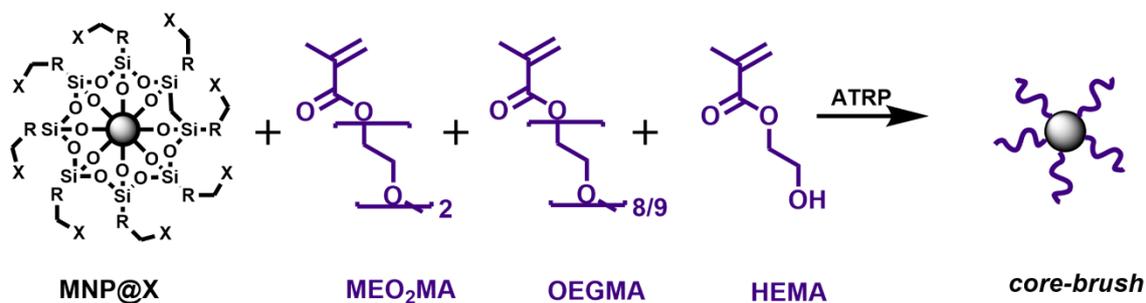
Figura 7.5 Espectro FT-IR de MNP@Br.

### 7.3.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas *core-brush* mediante ATRP

Una vez sintetizado el iniciador, se procedió al estudio de las condiciones de reacción para la obtención de las nanopartículas tipo *core-brush*. Para realizar dicha síntesis se eligió como estrategia de síntesis el empleo de la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP). Esta metodología presenta algunas ventajas como que todas las cadenas del polímero

pueden crecer al mismo tiempo; si se agrega un segundo monómero puede reactivarse su crecimiento lográndose copolímeros en bloque. Es decir, que la ATRP permite un control preciso de la arquitectura molecular (composición, topología, y funcionalidad), que conduce a diferentes materiales con aplicaciones interesantes.<sup>12-14</sup>

Los monómeros utilizados fueron OEGMA y MEO<sub>2</sub>MA que, como ya se ha mencionado, la temperatura de transición de fase de los polímeros resultantes puede variarse en función de la relación molar entre ambos.<sup>15,16</sup> Además, se utilizó como co-monómero HEMA. La motivación principal para la elección de este sistema fue poder realizar un estudio comparativo del sistema con igual composición, pero con distinta morfología y el nanogel obtenido en Capítulo 5. Es decir, analizar las diferencias entre nanogeles magnéticos y nanopartículas *core-brush*. En la Figura 7.6 se esquematiza la síntesis de las nanopartículas mediante ATRP.



**Figura 7.6** Esquema de síntesis de las nanopartículas *core-brush*.

En la Tabla 7.1 se detallan los distintos experimentos realizados para la obtención de las nanopartículas empleando distintos tiempos, ligandos, iniciadores, etc.

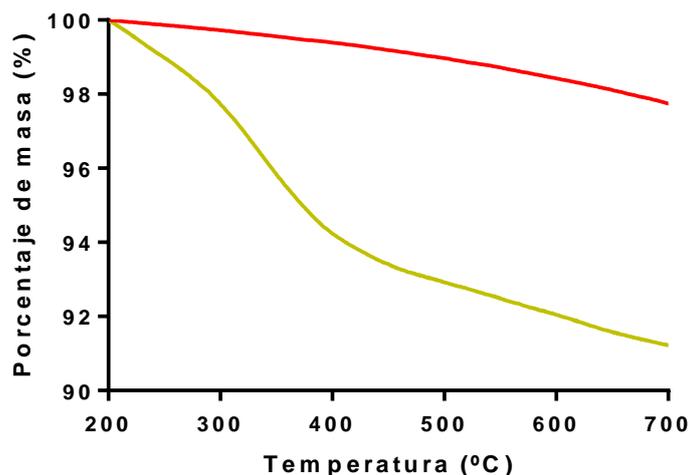
Tabla 7. 1 Resumen de condiciones analizadas para la síntesis de nanopartículas *core-brush*.

Muestra	Técnica	MNP@X	Ligando	Monómeros (5.419 mmol)	HEMA	TEGDMA	Tiempo	Cobre	Porcentaje de polímero (%)	Comportamiento termosensible	
1	En solución	50 mg MNP@Cl	HMTETA	MEO <sub>2</sub> MA:OEGMA 8:2	4 mol%	-	1 d	36,13 μmol de Cu (I), Cu (II)	10	No	
2							5 d		10		
3							2 d, 5 d, 7 d		10		
4							6 h, 12 h, 1 d, 2 d		7		
5		25 mg MNP@Cl		MEO <sub>2</sub> MA			3 mol %		12 h		5
6		50 mg MNP@Cl									5
7		25 mg MNP@Cl									5
8		50 mg MNP@Cl									9
9											8
10											MMA
11	En masa	25 mg MNP@Cl	MEO <sub>2</sub> MA	-	-	18 h	7				
12		25 mg MNP@Br					2				
13		25 mg MNP@Cl					Bipy	72,32 μmol de Cu (I)	5		

Para comenzar, se sintetizaron las nanopartículas utilizando el protocolo desarrollado por la Dra. Cintia Contreras<sup>17</sup> pero adaptándolo al sistema de estudio, Tabla 7.1, muestras 1 y 2. Brevemente, se colocaron ambos monómeros OEGMA y MEO<sub>2</sub>MA junto con 50 mg de MNP@Cl y el ligando 1,1,4,7,10,10-Hexametiltriétilentetramin (HMTETA). Los mismos se dispersaron en 25 mL de etanol y se desgasificó durante 20 minutos. Luego se agregaron el cobre (I) y (II) y permitiendo reaccionar a temperatura ambiente bajo agitación. Mediante análisis termogravimétrico (TGA) se observó que la modificación fue muy baja, siendo el polímero menor al 10 % de la masa. Asimismo, las nanopartículas no presentaron comportamiento termosensible en un rango de 20 °C a 70 °C.

Frente a esta perspectiva, se planteó la síntesis utilizando sólo el monómero más hidrofóbico, MEO<sub>2</sub>MA, para poder obtener un comportamiento termosensible apreciable. En esta nueva serie de síntesis, se varió tanto la cantidad de nanopartículas como la presencia o ausencia del co-monómero HEMA y distintos tiempos de reacción. Nuevamente se observó un muy bajo porcentaje de incorporación del polímero a la superficie y no hubo comportamiento termosensible apreciable. Asimismo, se evaluó la síntesis de las nanopartículas en presencia de un entrecruzante como el TEGDMA (Tabla 7.1, muestras 6 y 7) para ver si al utilizar esta molécula, aumentaba la capa polimérica. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores. Como consecuencia, se decidió emplear un monómero más reactivo como el metacrilato de metilo (MMA), encontrando que la pérdida de peso correspondiente a la cadena polimérica en el TGA fue menor al 10 %.

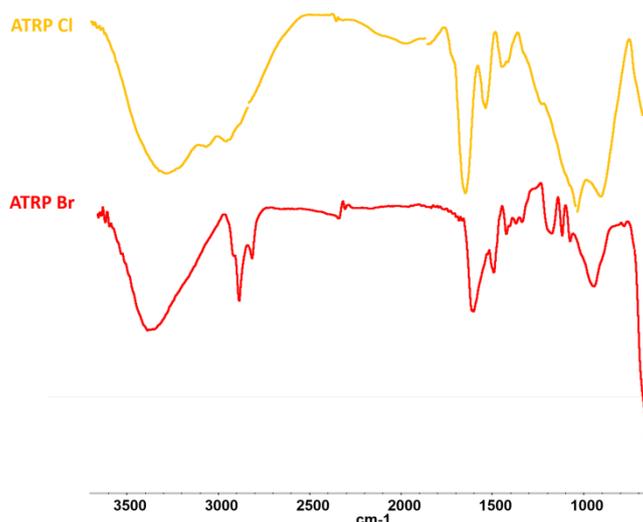
A partir de estos resultados, se optó por utilizar una polimerización en masa como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos 3.2.5.1.2 siguiendo el protocolo de Fan y colaboradores<sup>5</sup>. Para esta síntesis se realizó una polimerización en masa, es decir, el mismo monómero actuó como solvente de las nanopartículas. Las condiciones se detallan en la Tabla 7.1, muestras 11 y 12. Se estudió la modificación superficial de las nanopartículas recubiertas con grupos cloruro y también, para ver si el empleo de un mejor grupo saliente mejoraba la síntesis, se estudiaron las nanopartículas modificadas con grupos bromuro. Para ambos casos, se analizaron el porcentaje de injerto mediante TGA. En la Figura 7.7 se encuentran los resultados obtenidos.



**Figura 7.7** Análisis termogravimétrico de nanopartículas obtenidas mediante ATRP a partir de MNP@Cl (amarillo) y MNP@Br (rojo).

Como puede observarse, el perfil termogravimétrico de las nanopartículas *core-brush* sintetizadas a partir de MNP@Cl (amarillo) presenta una pérdida de masa entre 230 y 400 °C que puede ser atribuida a la descomposición térmica del contenido orgánico menor al 7 % mientras que en el perfil de las nanopartículas obtenidas utilizando como iniciador MNP@Br (rojo) casi no se observa una pérdida de masa correspondiente al contenido polimérico siendo esta menor al 2 %.

Asimismo, las nanopartículas obtenidas con los distintos iniciadores se analizaron mediante FT-IR. En la Figura 7. 8 se encuentran los resultados.



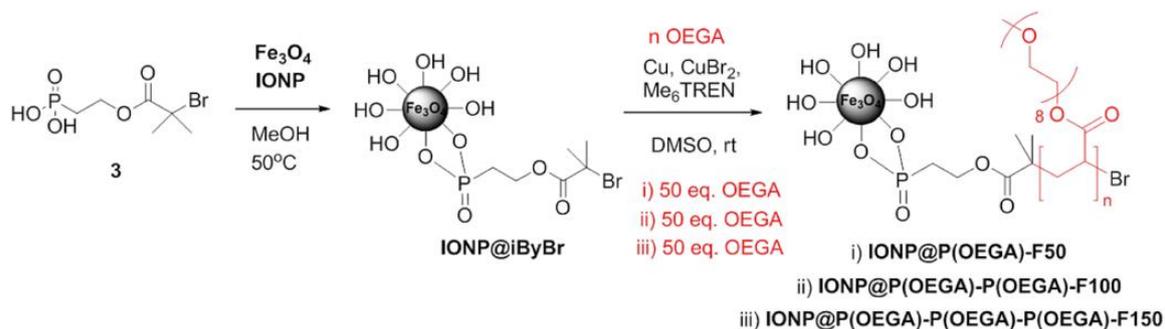
**Figura 7. 8** Espectros FT-IR de las nanopartículas *core-brush* obtenidas a partir de MNP@Cl (amarillo) y MNP@Br (rojo).

Como puede observarse, los espectros FT-IR de ambas nanopartículas presentan las bandas características a  $2916\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento de C-H alifático y  $1735\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento C=O del éster, así como la tensión Fe-O alrededor de  $550\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la magnetita y la banda alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del enlace Si-O del silano. También se observa alrededor de  $1680\text{ cm}^{-1}$  una señal que corresponde a la vibración C=C que puede atribuirse a la presencia de grupos vinilos terminales en la cadena polimérica que quedaron sin reaccionar o al monómero ocluido en las nanopartículas.

Por último, se evaluó el empleo de otro ligando, la bipyridina (Bipy), utilizando solo cobre (I) en la síntesis en masa de las nanopartículas *core-brush*. Nuevamente no se obtuvieron resultados alentadores.

Por todas las razones expuestas se considera que, a pesar de evaluar distintas variables como el iniciador, la metodología, los monómeros, los tiempos, etc., no se pudieron mejorar los rendimientos obteniendo un injerto del 10 % de polímero en el mejor de los casos, sin observar comportamiento termosensible. Además, para todos los casos se analizó el sobrenadante observando que se recuperó, casi en su totalidad, el monómero sin reaccionar.

Frente a estos resultados, se postula que una de las posibles razones por la cual esta técnica no es efectiva, es la baja funcionalización de las nanopartículas no permitiendo así el crecimiento de las cadenas poliméricas. Mediante una exhaustiva búsqueda bibliográfica se encontró un antecedente publicado por Basuki y colaboradores<sup>18</sup> donde sustituyeron el agente silano por un organofosfato. De esta manera, se crecieron las cadenas poliméricas de poli(oligoetilenglicolacrilato) (POEGA). Los sucesivos pasos de reacción para la obtención exitosa de nanopartículas *core-brush* se muestran en la Figura 7.9.



**Figura 7.9** Esquema de síntesis para la obtención de nanopartículas magnéticas recubiertas con POEGA. Reproducido de la referencia 18.

En este caso, se realizó una modificación superficial de las nanopartículas magnéticas primeramente con un organofosfato con un grupo terminal bromuro que luego actuó como

iniciador para la polimerización ATRP del OEGA. Mediante análisis termogravimétrico encontraron que el porcentaje de injerto en la nanopartícula alcanzó el 60 %.

Por lo tanto, la funcionalización de las nanopartículas mediante silanización aparentemente no fue la óptima para realizar posteriormente una polimerización ATRP en la cual se obtengan altos porcentajes de injerto.

## 7.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se presentó la síntesis de nanopartículas magnéticas y termosensibles tipo *core-brush* utilizando los mismos bloques constructores descritos en el capítulo 5 para la obtención de nanogeles magnéticos. Para la ello, se utilizó la técnica de polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP).

En una primera instancia, se sintetizaron las nanopartículas magnéticas para luego realizar su modificación superficial y utilizarlas como iniciador en la ATRP. Para tal fin, las nanopartículas se funcionalizaron con grupos cloruro o bromuro. Para la obtención de las primeras, se realizó una silanización con un agente silano con un cloruro terminal en su cadena carbonada y para las MNP@Br se realizaron dos pasos, una silanización con APTES para luego realizar una modificación con bromuro de 2-bromoisobutirilo. Ambas nanopartículas fueron caracterizadas y se confirmó la presencia de los grupos funcionales mediante espectroscopia FT-IR.

Para la síntesis de las nanopartículas *core-brush* se evaluaron distintas variables como iniciador, metodología, monómeros, tiempos, etc., encontrando que no es posible mejorar los rendimientos obteniéndose un injerto del 10 % de polímero en el mejor de los casos, sin observar comportamiento termosensible. Este hallazgo, llevó a concluir que una de las posibles razones por la cual esta técnica no es efectiva, es la baja funcionalización de las nanopartículas, no permitiendo así el crecimiento de las cadenas poliméricas o bien, el agente silano no es lo suficientemente reactivo. Este hecho fue corroborado mediante una búsqueda bibliográfica, en donde se encontró una mayor eficiencia utilizando otros agentes de modificación distintos a los silanos como, por ejemplo, los organofosfatos.

Considerando los resultados obtenido para síntesis de nanogeles magnéticos basados en OEG descritos en el Capítulo 5, desde el punto de vista de la metodología sintética la polimerización radicalaria no controlada, permitió obtener nanodispositivos en forma rápida y sencilla, con tamaños óptimos y una mayor proporción de polímero en el sistema (45 %). Además, estos sistemas presentaron una gran estabilidad coloidal y comportamiento sensible, mientras que las nanopartículas obtenidas mediante ATRP presentaron un bajo porcentaje de polímero (menores al 10 %) y no resultaron ser termosensibles.

## 7.5 REFERENCIAS

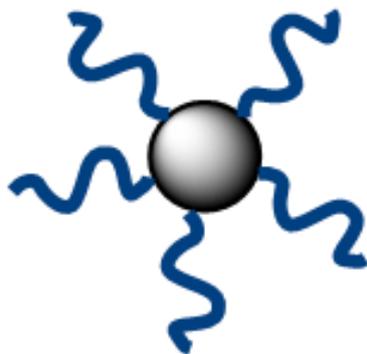
1. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307(1):93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
2. Kolhatkar A, Jamison A, Litvinov D, Willson R, Lee T. *Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles.* Vol 14.; 2013. doi:10.3390/ijms140815977.
3. Lutz J-F, Stiller S, Hoth A, Kaufner L, Pison U, Cartier R. One-pot synthesis of pegylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents. *Biomacromolecules.* 2006;7(11):3132-3138. doi:10.1021/bm0607527.
4. Lu X, Jiang R, Fan Q, et al. Fluorescent-magnetic poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles from post-atom-transfer-radical-polymerization modification: synthesis, characterization, cellular uptake and imaging. *J Mater Chem.* 2012;22(14):6965. doi:10.1039/c2jm15768c.
5. Fan Q-L, Neoh K-G, Kang E-T, Shuter B, Wang S-C. Solvent-free atom transfer radical polymerization for the preparation of poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: synthesis, characterization and cellular uptake. *Biomaterials.* 2007;28:5426-5436. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.039.
6. Chanana M, Jahn S, Georgieva R, Lutz JF, Bäuml H, Wang D. Fabrication of colloidal stable, thermosensitive, and biocompatible magnetite nanoparticles and study of their reversible agglomeration in aqueous milieu. *Chem Mater.* 2009;21(9):1906-1914. doi:10.1021/cm900126r.
7. Huang C, Neoh KG, Kang ET. Combined ATRP and “click” chemistry for designing stable tumor-targeting superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir.* 2012;28(1):563-571. doi:10.1021/la202441j.
8. Thomson D a C, Tee EHL, Tran NTD, Monteiro MJ, Cooper M a. Oligonucleotide and Polymer Functionalized Nanoparticles for Amplification-Free Detection of DNA. *Biomacromolecules.* 2012;13:1981-1989. doi:10.1021/bm300717f.
9. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B.* 2015;3:6117-6147.

- doi:10.1039/C5TB00664C.
10. Wang W, Vaughn MW. Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning*. 2008;30(2):65-77. doi:10.1002/sca.20097.
  11. Liu J, He W, Zhang L, et al. Bifunctional nanoparticles with fluorescence and magnetism via surface-initiated AGET ATRP mediated by an iron catalyst. *Langmuir*. 2011;27(20):12684-12692. doi:10.1021/la202749v.
  12. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog Polym Sci*. 2007;32(1):93-146. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.11.002.
  13. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Recent mechanistic developments in atom transfer radical polymerization. *J Mol Catal A Chem*. 2006;254(1-2):155-164. doi:10.1016/j.molcata.2006.01.076.
  14. Matyjaszewski K, Tsarevsky N V. Macromolecular engineering by atom transfer radical polymerization. *J Am Chem Soc*. 2014;136(18):6513-6533. doi:10.1021/ja408069v.
  15. Ishizone T, Han S, Okuyama S, Nakahama S. Synthesis of water-soluble polymethacrylates by living anionic polymerization of trialkylsilyl-protected oligo(ethylene glycol) methacrylates. *Macromolecules*. 2003;36:42-49. doi:10.1021/ma021257f.
  16. Lutz J-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *J Polym Sci Part A Polym Chem*. 2008;46(11):3459-3470. doi:10.1002/pola.22706.
  17. Contreras CB. Funcionalización, micro / nano estructuración de superficies esféricas y planas . Preparación de materiales híbridos. 2015.
  18. Basuki JS, Esser L, Zetterlund PB, Whittaker MR, Boyer C, Davis TP. Grafting of P ( OEGA ) Onto Magnetic Nanoparticles Using Cu ( 0 ) Mediated Polymerization : Comparing Grafting “ from ” and “ to ” Approaches in the Search for the Optimal Material Design of Nanoparticle MRI Contrast Agents Supporting Information Experieme. *Macromolecules*. 2013;46:6038-6047.



# Capítulo 8

## SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CORE-BRUSH MEDIANTE QUÍMICA *CLICK*



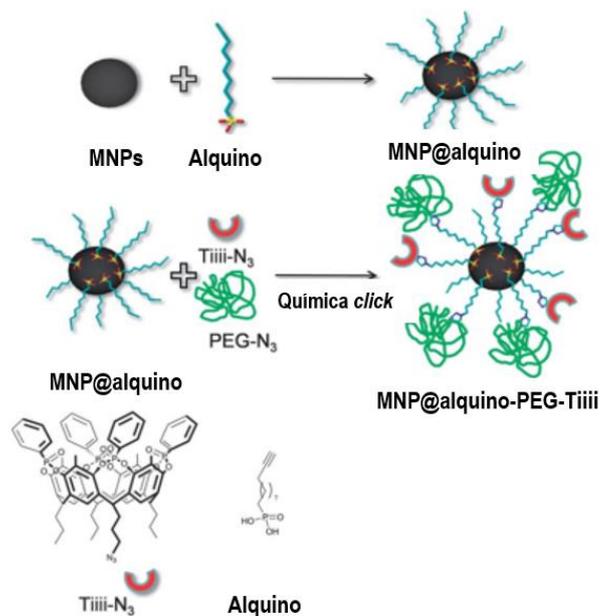


## 8.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversos reportes de nanopartículas *core-brush*. En particular, la síntesis de nanopartículas decoradas con cadenas de PEG ha sido ampliamente utilizadas para la incorporación de fármacos anticancerígenos, entre ellos, la doxorubicina (DOX). Para lograr dicho objetivo, los polietilenglicol han sido modificados químicamente de diferentes maneras. Quinto y colaboradores<sup>1</sup> sintetizaron nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con un PEG fosfolipídico al que incorporaron doxorubicina con un contenido de fármaco cargado de 30,8 % p/p. Además, se encontró que estas nanopartículas exhibían una liberación sostenida de DOX durante 72 horas donde la cinética de liberación podría ser alterada por la longitud de la cadena PEG.

De manera similar, Xu y su grupo de investigación<sup>2</sup> diseñaron nanopartículas magnéticas y una capa polimérica compuesta de PEG/PEI (polietilenimina)/ polisorbato 80 (Ps80), que fueron empleados para encapsular DOX. Estudios *in vivo* demostraron que estas nanopartículas presentaron completa supresión del crecimiento de glioma después de 28 días desde que se realizó el tratamiento.

En particular, existen algunos reportes de la obtención de nanopartículas magnéticas *core-brush* mediante química *click*.<sup>3-8</sup> Uno de estos reportes es el de Tudisco y colaboradores<sup>3</sup> donde se sintetizaron nanopartículas magnéticas que luego fueron modificadas superficialmente con un fosfato conteniendo terminales alquinos para su posterior unión covalente de cadenas PEG y receptores Tiii sensibles a las sales de metilamonio, mediante química *click* como se muestra en la Figura 8.1. De manera similar, Das *et al.*<sup>4</sup> diseñaron un nuevo PEG-silano con terminales azida que puede autoensamblarse fácilmente sobre la superficie del óxido metálico a través del anclaje del silano y simultáneamente facilitar la bio-funcionalización ortogonal del sustrato a través de química *click*. Encontraron la inmovilización exitosa de ácido fólico en las nanopartículas a través de este silano.



**Figura 8.1** Esquema de modificación superficial de nanopartículas magnéticas con PEG y receptores Tiii. Reproducido de la referencia 3.

A su vez, la utilización de polímeros termosensibles para el recubrimiento de las nanopartículas amplía el campo de aplicación de estos nanodispositivos debido a que puede ser utilizado como agente teragnóstico debido a las propiedades inherentes de las MNPs y, también se puede realizar una liberación controlada estimulada por la temperatura.<sup>9</sup> Los poligliceroles lineales termosensibles (tPG) son buenos candidatos para el diseño de nanodispositivos debido a su biocompatibilidad.<sup>10,11</sup> Además, variando la relación molar de los monómeros utilizados, la temperatura de transición de fase puede ser controlada.<sup>11-13</sup> Hasta el momento no se han hallado muchos antecedentes del empleo de poliglicerol termosensible para el recubrimiento de nanopartículas magnéticas mediante química *click*.

## 8.2 OBJETIVOS

En el capítulo anterior se demostró que mediante las condiciones estudiadas la obtención de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush* mediante el empleo de ATRP no fue posible. Este hecho fue la principal motivación para el estudio de un nuevo sistema *core-brush* empleando otra estrategia sintética.

Habiendo obtenido tan prometedores resultados mediante el empleo de química *click* y nanoprecipitación (Capítulo 6), se propuso como alternativa, la síntesis y caracterización de nanopartículas *core-brush* mediante la estrategia anteriormente nombrada. Así, las nanopartículas magnéticas se recubrieron con poliglicerol lineal termosensible mediante química *click*.

En este contexto es que se plantearon los siguientes objetivos específicos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y modificar nanopartículas magnéticas con terminales BCN.
- Sintetizar poliglicerol lineal termosensible monoazidado de 10 kDa (tPG-N<sub>3</sub>).
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas magnéticas *core-brush*.
- Realizar estudios preliminares de liberación controlada de fármacos.
- Comparar los resultados con los nanogeles magnéticos análogos obtenidos en el Capítulo 6.

### 8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Capítulo 6 se desarrolló la síntesis de nanogeles magnéticos utilizando química *click* y nanoprecipitación como estrategia de síntesis. Se comprobó que al utilizar esta metodología se logra tanto un control en el tamaño como en la polidispersidad del sistema. A su vez, se demostró que la síntesis es muy sencilla con tiempos de reacción tan cortos como 15 minutos. De esta manera, se planteó utilizar la misma técnica, empleando el poliglicerol monozidado para obtener así los sistemas *core-brush*.

Una vez más, se eligieron como bloques constructores nanopartículas magnéticas modificadas con grupos BCN, al igual que en el Capítulo 6 y poliglicerol lineal termosensible de 10 kDa monoazidado para el diseño racional de los sistemas *core-brush*.

#### 8.3.1 Síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas

La síntesis y modificación de las nanopartículas magnéticas se realizó de manera análoga a la descrita en el capítulo 6 (Inciso 6.3.1). Brevemente, se sintetizaron las MNPs nuevamente con la metodología de coprecipitación de sales de hierro<sup>14</sup> para luego modificarlas superficialmente mediante silanización con APTES.<sup>15</sup> Por último, se modificaron los grupos amino de las MNP@APTES con BCN-paranitrofenil carbonato (BCN-PNP), mediante un ataque nucleofílico del grupo amino terminal del APTES a la molécula BCN-PNP, obteniéndose una unión carbamato entre el MNP@APTES y el BCN. En la Figura 8.2 se esquematizan las distintas etapas.

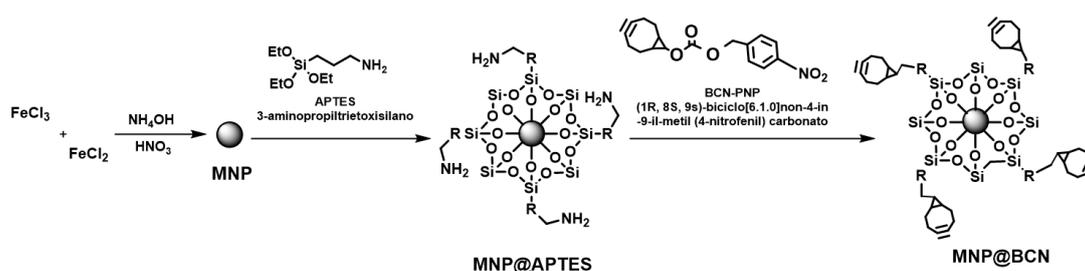


Figura 8.2 Esquema para la obtención de las MNP@BCN.

Se eligió utilizar nuevamente estas nanopartículas debido a que fueron exhaustivamente caracterizadas, encontrándose que las mismas tenían tamaños alrededor de los 5 nm. A su vez, las mismas presentaron potenciales propiedades como agente de contraste para resonancia magnética, para terapia guiada y tratamiento por hipertermia.

### 8.3.2 Síntesis del poliglicerol lineal monoazidado (tPG-N<sub>3</sub>)

Como se ha mencionado anteriormente, los poliéteres como el poliglicerol lineal termosensible (tPG) son buenos candidatos para el diseño de nanodispositivos debido a su biocompatibilidad<sup>10,11</sup> y versatilidad.<sup>16-18</sup>

Para la obtención del polímero monoazidado se realizó la polimerización aniónica por apertura de anillo para luego llevar a cabo la azidación como se muestra en la

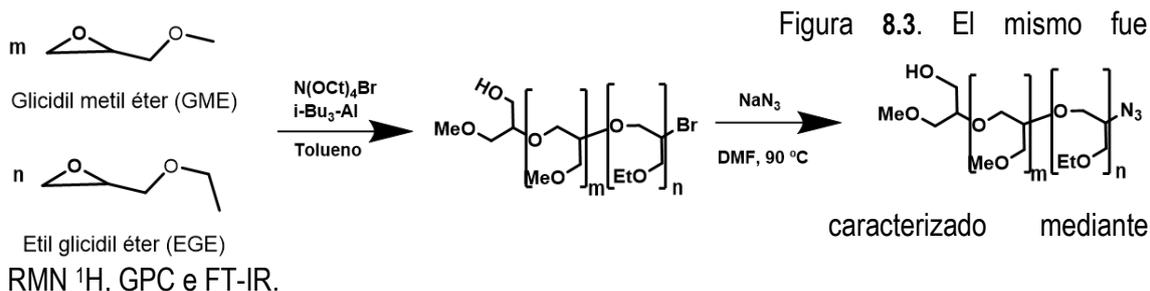
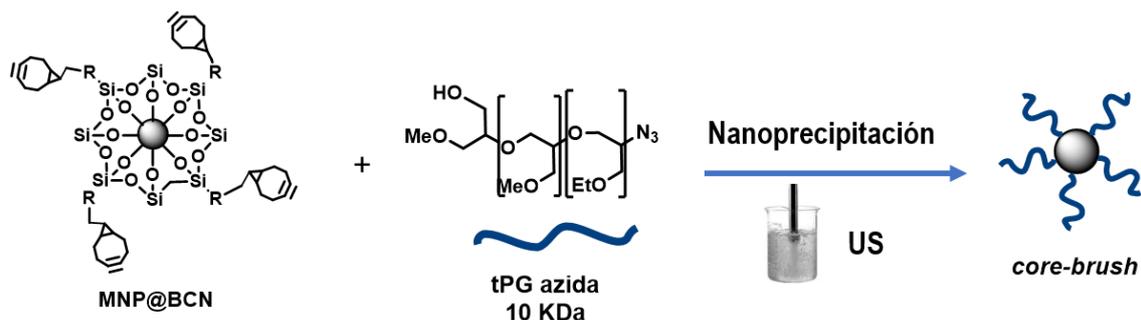


Figura 8.3 Esquema de síntesis del poliglicerol monoazidado (tPG-N<sub>3</sub>).

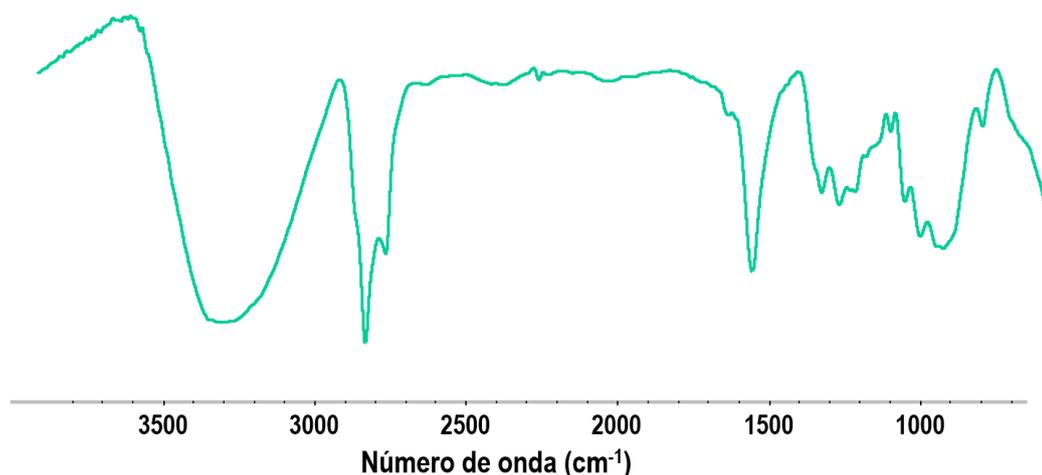
### 8.3.3 Síntesis de nanopartículas magnéticas core-brush

Para la síntesis de las nanopartículas, se planteó utilizar química click para la unión covalente de las MNP@BCN a la cadena de tPG, como se esquematiza en la Figura 8.4. Se decidió utilizar nuevamente la metodología empleada anteriormente, basada en termonanoprecipitación y asistida por ultrasonificación (Materiales y métodos 3.2.8.2) debido a que anteriormente se obtuvo una gran eficiencia y a cortos tiempos de reacción.<sup>19</sup> Las condiciones de reacción fueron las mismas utilizadas en el capítulo 6, utilizando 500 μL de la solución de MNP y 2 μmol del tPG-N<sub>3</sub>. Una vez más, se evidenció que el empleo del ultrasonificador de punta permitió un gran control de la agregación del sistema en comparación con la síntesis bajo agitación convencional o en un baño de ultrasonificación.



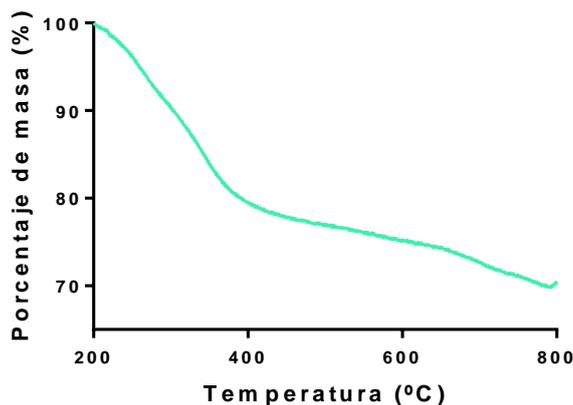
**Figura 8.4** Esquema de la síntesis de nanopartículas core-brush mediante nanoprecipitación asistida por ultrasonificación.

Las nanopartículas *core-brush* sintetizadas se caracterizaron mediante espectroscopia FT-IR. En la Figura 8.5 se muestra el espectro de las mismas. Se confirmó la reacción de entrecruzamiento entre el grupo azida del polímero y los grupos BCN debido a la desaparición de la señal característica del grupo azida a  $2099\text{ cm}^{-1}$  indicando la formación de triazol a través de la cicloadición de Huisgen promovida por tensión anular.



**Figura 8.5** Espectro FT-IR de las nanopartículas.

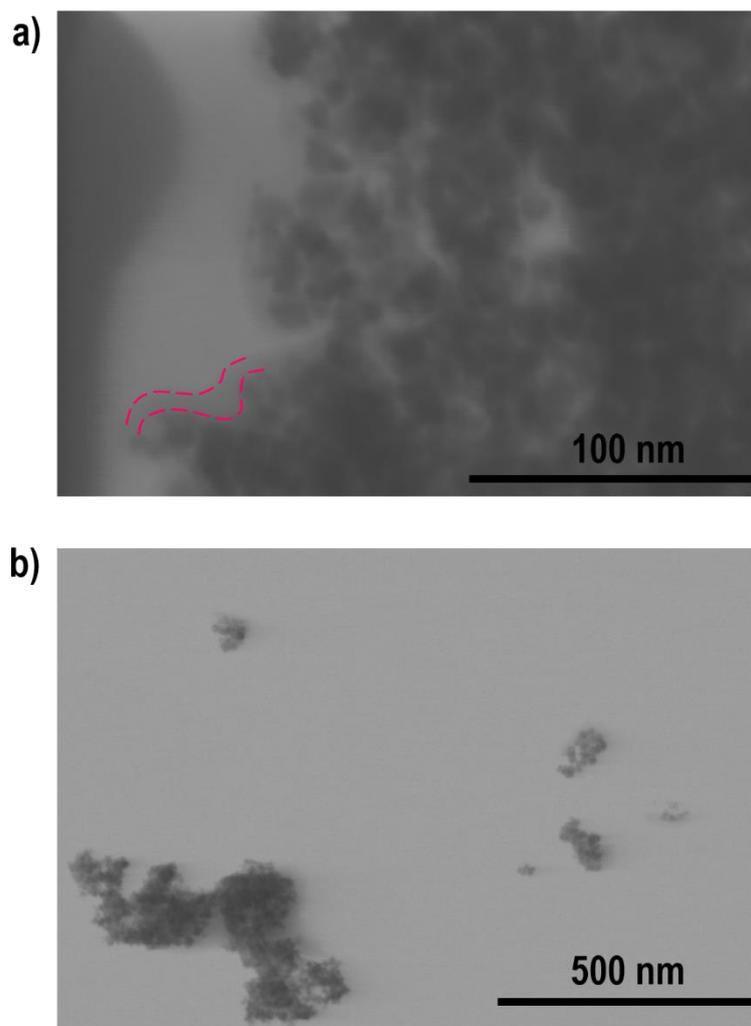
Con el propósito de estudiar el porcentaje polimérico presente en las nanopartículas *core-brush*, se realizaron estudios de termogravimetría (TGA). En la Figura 8.6 se muestra que el porcentaje de pérdida de masa de las nanopartículas *core-brush* es 23 % entre 230 y 400 °C. La misma es atribuida a la descomposición térmica del contenido orgánico, es decir, al polímero. Este valor se encuentra en el mismo orden que el porcentaje obtenido para los nanogeles magnéticos sintetizados a través de química *click* (Capítulo 6) alrededor del 17 %.



**Figura 8.6** Análisis termogravimétrico de las nanopartículas *core-brush*.

Además, para corroborar el comportamiento termosensible se realizaron turbidimetrías encontrándose que las nanopartículas *core-shell* no presentaban comportamiento termosensible mientras que el MNG obtenido en el Capítulo 6 tenía una  $T_{if}$  alrededor de 42 °C. Esto puede deberse a que el polímero puede estar dispuesto en la superficie de forma tal que no facilita el ordenamiento de los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos para observar un comportamiento termosensible tangible.

Con el fin de analizar el tamaño de las nanopartículas tipo *core-brush*, los mismos se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos se muestran en Figura 8.7. Como se puede observar, las nanopartículas magnéticas *core-brush* tienen un tamaño promedio de 5 nm y se encuentran agregadas. Sin embargo, en la imagen de TEM puede denotarse una capa orgánica recubriendo a las nanopartículas (Figura 8.7 Imágenes TEM de las nanopartículas magnéticas *core-brush*). La misma se remarca en líneas punteadas magenta. Esta capa fue atribuida a la presencia del poliglicerol injertado a la nanopartícula. Por lo tanto, se comprobó la exitosa formación de las nanopartículas *core-brush*. Además, mediante medidas de NTA se obtuvo que el tamaño del agregado en solución de las nanopartículas era de  $(54 \pm 3)$  nm).



**Figura 8.7** Imágenes TEM de las nanopartículas magnéticas *core-brush*.

### 8.3.4 Estudios de liberación controlada de fármacos

Una vez caracterizado el material, en una segunda etapa se continuó con los estudios preliminares de encapsulación y liberación de fármacos a los fines de comparar las nanopartículas *core-brush* y los MNGs. En este caso, nuevamente se utilizó como droga anticancerígena modelo, clorhidrato de doxorubicina (DOX.HCl).

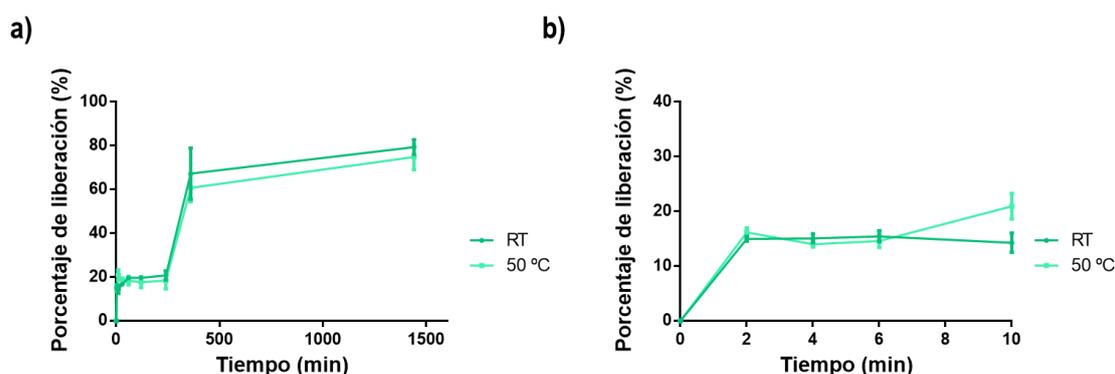
Para llevar a cabo la incorporación, se siguió el protocolo detallado en la Sección Materiales y métodos 3.2.11.2. De manera general, 5 mg de las nanopartículas *core-brush* se pusieron en contacto con 2,5 mL de una solución de DOX.HCl 0,2 mM en buffer acetato de pH 5. Las mismas se mantuvieron bajo agitación mecánica durante 16 h para luego separar magnéticamente los sistemas y lavarlos dos veces con buffer acetato. Luego se procedió a

cuantificar la incorporación mediante espectrofotometría UV-Vis. Todos los estudios se realizaron por triplicado.

Para evaluar la cantidad de doxorubicina incorporada en los sistemas, se analizaron los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE%) y contenido del fármaco en el nanodispositivo (DLC%). Se encontró que la eficiencia de encapsulación para este sistema era  $(12 \pm 3) \%$  y el contenido del fármaco era  $(7 \pm 2) \%$  en peso. Estos valores son similares a los encontrados en la bibliografía para este tipo de sistemas, cuando se utilizaron nanopartículas magnéticas estabilizadas con polímeros.<sup>20,21</sup> Asimismo, restan analizar distintas variables que pueden mejorar aún más la incorporación del fármaco como el uso de diferentes concentraciones de DOX.HCl o distintos pH. Además, estos valores fueron similares a los obtenidos para los nanogeles obtenidos mediante química *click* (EE% =  $(10 \pm 2) \%$  y DLC% =  $(6 \pm 1) \%$ ).

A partir de los resultados obtenidos, se realizaron estudios preliminares de liberación de DOX.HCl de las nanopartículas *core-brush*. Para ello se realizaron dos experimentos análogos, uno a temperatura ambiente y el otro a 50 °C. De manera general, las nanopartículas *core-brush* cargadas se colocaron en buffer fosfato y se midió la liberación de DOX.HCl a distintos tiempos mediante espectrofotometría UV-Vis. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para comenzar con el análisis, en la Figura 8.8 se muestra el perfil de liberación para las nanopartículas *core-brush* a temperatura ambiente y a 50 °C.



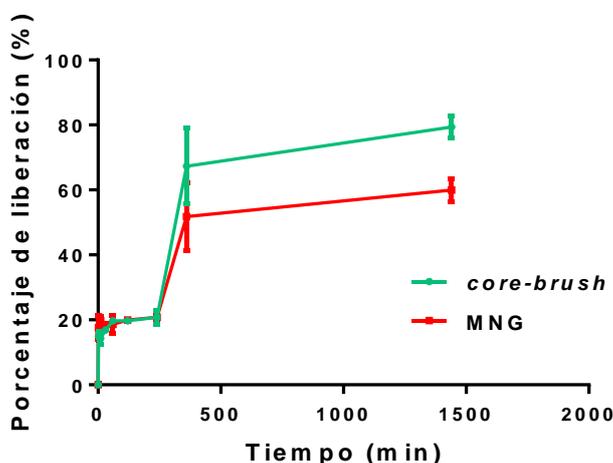
**Figura 8.8** Perfil de liberación de DOX.HCl de las nanopartículas *core-brush* a temperatura ambiente y 50 °C. a) tiempo total y b) primeros 10 minutos de liberación con sus respectivos errores.

Los resultados obtenidos demuestran una liberación rápida de 20 % de la DOX.HCl incorporada dentro de los primeros 10 minutos. Además, luego de 6 h se observó nuevamente un incremento abrupto en la liberación alrededor del 60 % para luego obtenerse una liberación controlada llegando a 80 % a las 24 h. Este perfil de liberación es realmente alentador ya que podría realizar una liberación a partir de 6 h, dando tiempo al nanodispositivo para llegar a la zona que ha de ser tratada. Además, se observó que la liberación era sostenida al menos hasta

24 h. Se comprobó que las nanopartículas *core-brush* presentaban un perfil similar al obtenido en los nanogeles análogos.

Por otro lado, se analizó el efecto de la temperatura en la liberación. Como era de esperar, no se encontró comportamiento termosensible alguno del sistema, no hubo ningún cambio en la liberación tanto a temperatura ambiente como a altas temperaturas, 50 °C (Figura 8.8, línea verde claro).

Es importante en este punto, hacer un estudio comparativo entre las liberaciones de clorhidrato de doxorubicina de las nanopartículas y los nanogeles análogos. Para poder realizar un análisis comparativo entre los perfiles de liberación obtenidos para las nanopartículas *core-brush* y los MNGs a temperatura ambiente, en la Figura 8.9 se encuentran graficados dichos perfiles.



**Figura 8.9** Perfiles de liberación de DOX.HCl a temperatura ambiente de las nanopartículas *core-brush* (verde) y los MNGs (rojo).

Como se observa en la Figura 8.9, la liberación del fármaco a temperatura ambiente es más rápida para las nanopartículas *core-brush* alcanzando una liberación del 80 % a 24 h mientras que los MNG liberan un 55 % en el mismo periodo de tiempo. Este hecho puede explicarse analizando las morfologías de cada sistema ya que el MNG presenta una red tridimensional entrecruzada que disminuye la difusión del fármaco a través de las cavidades haciendo que su liberación sea más lenta mientras esto no ocurre en las nanopartículas *core-brush*.

Por último, debido a que los resultados obtenidos para la liberación de DOX.HCl son muy alentadores se plantea continuar con el estudio y optimización de la liberación de fármacos para luego realizar estudios biológicos analizando este efecto.

## 8.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se estudió la síntesis y caracterización de nanopartículas *core-brush* mediante química *click*. La metodología elegida fue la nanoprecipitación asistida por ultrasonificación.

Para ello, se realizó la síntesis y modificación de los distintos bloques constructores, las MNP@BCN, el tPG de 10 kDa monoazidado (tPG-N<sub>3</sub>). Luego se realizó la síntesis de las nanopartículas magnéticas *core-brush*. Se observó que la síntesis fue exitosa. Se encontró que las nanopartículas se presentaban como agregados, pudiéndose observar la capa polimérica en las imágenes TEM. Además, las nanopartículas magnéticas *core-brush* no presentaron comportamiento termosensible.

En una segunda etapa, se realizaron estudios preliminares de incorporación y liberación de clorhidrato de doxorrubicina. Los valores obtenidos para las nanopartículas *core-brush* de eficiencia de encapsulación fue  $(12 \pm 3) \%$  y de contenido del fármaco,  $(7 \pm 2) \%$  p/p. Estos valores son similares a los encontrados en la bibliografía para las nanopartículas magnéticas estabilizadas con polímeros. Asimismo, estos valores son comparables con los obtenidos para los nanogeles análogos.

Se encontró que el perfil de liberación de las nanopartículas *core-brush* fue similar al obtenido para los nanogeles estudiados previamente: una liberación rápida de 20 % de la DOX.HCl incorporada dentro de los primeros 10 minutos y luego de 6 h se observó nuevamente un incremento abrupto en la liberación siendo alrededor del 80 % para luego obtenerse una liberación controlada sostenida al menos hasta 24 h.

Por último, siendo exitosa la síntesis de las nanopartículas magnéticas *core-brush* mediante química *click* y nanoprecipitación asistida por ultrasonificación, es que se demuestra la versatilidad de esta técnica de ultrasonificación para la obtención de distintos nanomateriales con distintas morfologías.

### 8.5 REFERENCIAS

1. Quinto CA, Mohindra P, Tong S, Bao G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale*. 2015;7(29):12728-12736. doi:10.1039/C5NR02718G.
2. Xu H-L, Mao K-L, Huang Y-P, et al. Glioma-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles as drug-carrying vehicles for theranostic effects. *Nanoscale*. 2016;8:14222-14236. doi:10.1039/c6nr02448c.
3. Tudisco C, Bertani F, Cambria MT, et al. Functionalization of PEGylated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles with tetraphosphonate cavitand for biomedical application. *Nanoscale*. 2013;5(23):11438-11446. doi:10.1039/c3nr02188b.
4. Das M, Bandyopadhyay D, Singh R, Harde H, Kumar S, Jain S. Orthogonal Biofunctionalization of Magnetic Nanoparticles via “Clickable” Poly-(Ethylene Glycol) Silanes: A “Universal Ligand” Strategy to Design Stealth and Target-Specific Nanocarriers. *J Mater Chem*. 2012;(22):24652-24667. doi:10.1039/C2JM34571D.
5. He H, Zhang Y, Gao C, Wu J. “Clicked” magnetic nanohybrids with a soft polymer interlayer. *Chem Commun*. 2009;(13):1655-1657. doi:10.1039/b821280e.
6. Khoee S, Bagheri Y, Hashemi A. Composition controlled synthesis of PCL–PEG Janus nanoparticles: magnetite nanoparticles prepared from one-pot photo-click reaction. *Nanoscale*. 2015;7(9):4134-4148. doi:10.1039/C4NR06590E.
7. Liu X, Cheng R, Deng J, Wu Y. Magnetic composite nanoparticles consisting of helical poly(n-hexyl isocyanate) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> prepared via click reaction. *RSC Adv*. 2014;4(90):48796-48803. doi:10.1039/C4RA07476A.
8. Oz Y, Arslan M, Gevrek TN, Sanyal R, Sanyal A. Modular Fabrication of Polymer Brush Coated Magnetic Nanoparticles: Engineering the Interface for Targeted Cellular Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(30):19813-19826. doi:10.1021/acsami.6b04664.
9. Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Prog Polym Sci*. 2010;35(1-2):174-211. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.10.004.

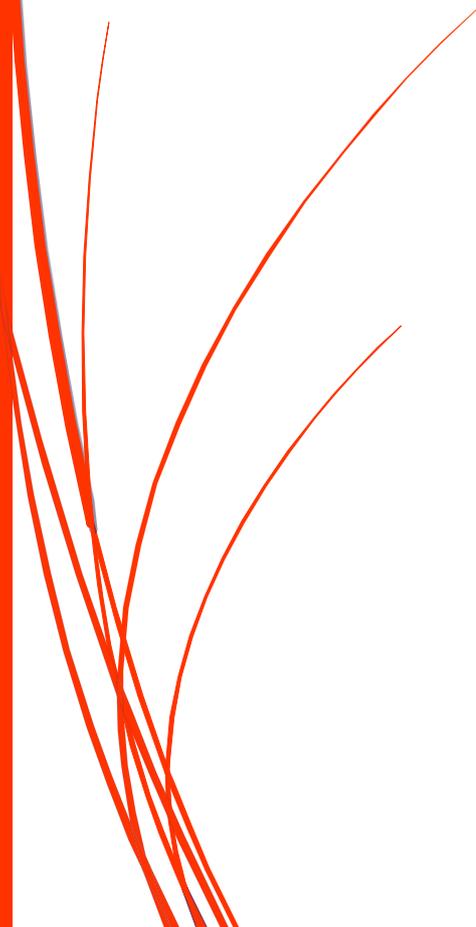
10. Calderón M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R. Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Adv Mater.* 2010;22(2):190-218. doi:10.1002/adma.200902144.
11. Weinhart M, Becherer T, Schnurbusch N, Schwibbert K, Kunte HJ, Haag R. Linear and hyperbranched polyglycerol derivatives as excellent bioinert glass coating materials. *Adv Eng Mater.* 2011;13(12):501-510. doi:10.1002/adem.201180012.
12. Reineke TM. Stimuli-Responsive Polymers for Biological Detection and Delivery. *ACS Macro Lett.* 2016;5(1):14-18. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00862.
13. Jo J, Aoki I, Tabata Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *J Control Release.* 2010;142(3):465-473. doi:10.1016/j.jconrel.2009.11.014.
14. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, Jérôme C, Duguet E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J Mater Chem B.* 2015;3:6117-6147. doi:10.1039/C5TB00664C.
15. Wang W, Vaughn MW. Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning.* 2008;30(2):65-77. doi:10.1002/sca.20097.
16. Khandare J, Calderón M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2824-2848. doi:10.1039/C1CS15242D.
17. Tonhauser C, Schüll C, Dingels C, Frey H. Branched acid-degradable, biocompatible polyether copolymers via anionic ring-opening polymerization using an epoxide inimer. *ACS Macro Lett.* 2012;1(9):1094-1097. doi:10.1021/mz300265z.
18. Schulte B, Walther A, Keul H, Möller M. Polyglycidol-based prepolymers to tune the nanostructure of microgels. *Macromolecules.* 2014;47(5):1633-1645. doi:10.1021/ma401465c.
19. Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderón M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym Chem.* 2014;5(24):6909-6913. doi:10.1039/C4PY01186D.

20. Yang J, Lee CH, Ko HJ, et al. Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. *Angew Chemie - Int Ed.* 2007;46(46):8836-8839. doi:10.1002/anie.200703554.
21. Stéphanie L, Rousseau B, Epherre R, et al. Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganite nanoparticles for remotely triggered drug releas. *Polym Chem.* 2012;3:1408-1417. doi:10.1039/C4NR01030B.



**SECCIÓN 5**

**CONSIDERACIONES  
FINALES**





# **C**apítulo 9

## **CONSIDERACIONES FINALES**



## 9.1 CONCLUSIÓN GENERAL

Retomando los objetivos generales, en esta Tesis Doctoral se estudiaron diversas metodologías para el diseño de distintos nanodispositivos híbridos, formados por nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y un polímero termosensible, enfatizando la obtención de dos tipos de morfologías: nanogeles híbridos y MNPs del tipo *core brush*. Además, se estableció un nuevo método de síntesis para distintos sistemas empleando ultrasonificación. Consecuentemente, se demostró la ventaja que presenta la ultrasonificación como herramienta de síntesis no sólo de nanogeles y nanopartículas *core-brush* sino también para la modificación superficial de nanopartículas con diferentes agentes silano.

Esta Tesis Doctoral se enfocó en la síntesis de nanodispositivos híbridos; por un lado, la obtención de nanogeles magnéticos y termosensibles y por otro, la obtención de nanopartículas magnéticas tipo *core-brush*.

La primera parte se dividió en tres etapas. En la etapa inicial, se evaluó la síntesis asistida por ultrasonificación de nanogeles termosensibles. Se comprobó la utilidad de esta metodología como herramienta de síntesis. Como resultado, se describió una metodología novedosa y simple de síntesis de nanogeles termosensibles basados en oligoetilenglicoles, presentando numerosas ventajas frente a metodologías ya reportadas como tiempos más cortos de reacción sin necesidad de desoxigenación previa y trabajando a menores temperaturas a las habituales usadas en polimerizaciones radicalarias. Los nanogeles fueron sintetizados exitosamente presentando tamaños y polidispersidades ideales entre 100 nm y 200 nm, comportamiento termosensible, así como también adecuadas propiedades de citotoxicidad e internalización celular. Se logró un gran control de las propiedades de los nanogeles en función de distintas variables como relación molar entre los monómeros, porcentaje de co-monómero, tiempo, etc. Todos estos resultados evidencian el gran potencial de estos sistemas para la liberación controlada de diversas moléculas, como agentes de diagnóstico por imagen y fármacos anticancerígenos de bajo peso molecular

En una segunda etapa, se incorporaron exitosamente de manera covalente nanopartículas magnéticas al sistema previamente analizado. Para ello, las nanopartículas magnéticas fueron modificadas con un agente silano para obtener grupos vinilos en la superficie para poder actuar como agente entrecruzante. Los nanogeles magnéticos fueron sintetizados de manera exitosa con tamaños y temperaturas de transición de fase regulables. Se confirmó que la metodología empleada permite un gran control del tamaño de los MNGs. Se encontró una alta estabilidad del sistema en dispersión, siendo estables durante al menos un año, demostrando

ser factible la separación magnética del mismo con un simple imán comercial. Además, se encontró que estos nanogeles presentaban potencial aplicación en el campo de hipertermia debido a su carácter superparamagnético y su respuesta frente a la irradiación de infrarrojo cercano. También se realizaron estudios preliminares de encapsulación de clorhidrato de doxorrubicina encontrándose que este fármaco no era el óptimo, dado su carácter hidrofílico, para la incorporación en este sistema en particular.

Adicionalmente, se analizaron los tiempos de relajación de los MNGs, encontrándose valores de relajación similares al de los agentes de contraste comerciales de IRM ( $170 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), garantizando así su potencial empleo como nanodispositivo en teragnosis. También los estudios de citotoxicidad revelaron muy buenos resultados en cuanto a la viabilidad celular de los mismos.

Luego se abordó la síntesis de nanogeles magnéticos mediante una metodología basada en ultrasonificación y una cicloadición de Huisgen azida-alquino promovida por tensión anular. Se obtuvieron resultados prometedores demostrándose la versatilidad de esta herramienta sintética. Se analizaron las propiedades magnéticas del sistema obteniendo valores de relajación similares a los de agentes de contraste comerciales de IRM. Además, el sistema presentaba comportamiento termosensible.

Para evaluar el potencial de estos nanodispositivos con morfología del tipo nanogel obtenidos mediante química *click* en el campo de la nanomedicina, se realizaron estudios preliminares de incorporación y liberación de clorhidrato de doxorrubicina. La incorporación del fármaco en los nanogeles resultó exitosa. El perfil de liberación obtenido es realmente prometedor ya que podría realizar una liberación a partir de las 6 h, dando tiempo al nanodispositivo para llegar a la zona que ha de ser tratada. A su vez, el comportamiento termosensible del nanogel se reflejó en cinéticas de liberación a altas temperaturas. Por otro lado, para evaluar el uso de los nanogeles como dispositivos de captura de células circulantes de metástasis, los mismos fueron funcionalizados con transferrina. Se obtuvo una amplia batería de nanogeles variando alguno de los bloques constructores. Se evaluaron las eficiencias de captura de CTCs de todos los sistemas, encontrándose una dependencia tanto en el largo del espaciador utilizado, su relación con respecto a la transferrina como el largo del polímero utilizado. Se encontró el sistema óptimo para la captura de CTCs con una eficiencia de captura del 80 % empleando tPG de 5 kDa y el conjugado de transferrina con el espaciador con longitud de cadena de 8 unidades PEG y una relación Tf:espaciador 1:3. Por lo tanto, el uso de los MNG sintetizados a través de química *click* y nanoprecipitación sería útil para la captación de células circulante de metástasis y liberación controlada de fármacos, así como agente de contraste.

En la segunda parte, se analizó la obtención de las nanopartículas magnéticas tipo *core-brush*. Para ello, primero se estudió la polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP) para el crecimiento de cadenas poliméricas de la superficie de la nanopartícula. Se evaluaron distintas variables como iniciador, metodología, monómeros, tiempos, etc., encontrando que no se pudo mejorar los rendimientos más allá de un injerto del 10 % de polímero en el mejor de los casos y sin observar comportamiento termosensible. Consecuentemente, se varió la estrategia sintética de nanopartículas *core-brush* utilizando química *click* y nanoprecipitación asistida por ultrasonificación. Se observó que la síntesis fue exitosa. Este hecho demuestra una vez más la versatilidad de esta técnica de ultrasonificación para la obtención de diversos nanomateriales con distintas morfologías. Las nanopartículas no presentaron comportamiento termosensible. Además, se realizaron estudios preliminares de incorporación y liberación de doxorrubicina clorhidrato. La incorporación del fármaco en las nanopartículas al igual que para los nanogeles resultó exitosa. Para las nanopartículas también se obtuvo el mismo perfil de liberación observado en los nanogeles, pero la liberación fue más rápida que para los nanogeles. Al realizar la liberación a mayores temperaturas, como se esperaba, no se obtuvo un incremento en la cinética de liberación.

Del análisis de los resultados obtenidos a través de la aplicación de diferentes metodologías de polimerización (polimerización radicalaria no controlada y ATRP) para el estudio de dos morfologías diferentes, surge claramente que desde el punto de vista de la metodología sintética, la polimerización radicalaria no controlada permitió obtener nanodispositivos en forma rápida y sencilla, con tamaños óptimos, una gran estabilidad coloidal y una mayor proporción de polímero en el sistema (45 %), mientras que con la polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica, se obtuvieron sistemas con un bajo porcentaje de polímero unido a través de cadenas del tipo *brush* (menores al 10 %).

Con respecto a la metodología de química *click*, permitió obtener los nanodispositivos buscados en ambos casos, nanogeles y *core-brush*, aunque con menores porcentajes de fracción polimérica (17 % para nanogel y 23 % para *core brush*).

Se observó que los nanogeles magnéticos obtenidos mediante química *click* presentaban una mayor versatilidad ya que estos sistemas demostraron su potencialidad tanto en el campo de liberación controlada de fármacos como en la captura de células circulantes de metástasis. El uso de esta estrategia de síntesis permite también un gran control de las propiedades finales del sistema variando distintas condiciones de reacción como, por ejemplo, los bloques constructores utilizados. A su vez, esta metodología presenta también sus ventajas a

saber, cortos tiempos de reacción, no hay necesidad de desoxigenar el solvente y no se emplean surfactantes.

Desde el punto de vista morfológico, si bien en todos los casos se encontró comportamiento magnético, sólo se observó comportamiento termosensible en los nanodispositivos tipo nanogel. Este hecho, llevó a concluir que una de las posibles razones por lo cual la morfología *core-brush* no presenta comportamiento termosensible es que probablemente la funcionalización de la MNPs en la primera etapa no es efectiva o suficiente, no permitiendo así el crecimiento óptimo de las cadenas poliméricas para encontrar la formación de dominios hidrofóbicos/hidrofílicos y mostrar comportamiento termosensible.

Por lo tanto, los nanogeles parecen ser los nanodispositivos óptimos para su uso en teragnosis. Esto se debe principalmente a que los mismos, debido a su morfología, presentan comportamiento termosensible que puede ser controlado a partir de las condiciones de síntesis. Además, estos sistemas presentaron alta estabilidad en el tiempo y su síntesis resultó simple con bajos tiempos de reacción. Todos los nanogeles magnéticos estudiados presentaron propiedades superparamagnéticas enfatizando así su potencial uso para el tratamiento por hipertermia. Asimismo, los valores de relajación de los nanogeles magnéticos fueron similares al de los agentes de contraste comerciales de IRM permitiendo proponer estos sistemas para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética. También, pueden ser modificados para unir de forma covalente grupos *targeting* como la transferrina permitiendo así su empleo como dispositivos de captura de células circulantes de metástasis.

Por último, es importante destacar que el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral planteó un desafío interdisciplinario muy importante. El trabajo aquí presentado es el resultado de una estrecha colaboración entre el Laboratorio de Materiales Poliméricos (LAMAP) del Departamento de Química Orgánica (FCQ, UNC) y otros investigadores pertenecientes a distintos laboratorios de reconocida trayectoria: el grupo del Dr. Marcelo Calderón de la Freie Universität Berlin (Alemania), el grupo del Dr. Jayant Khandare del Mahastra Institute of Pharmacy, Kothrud, Pune (India) y el investigador Dr. Bastian Klemke de Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie (Alemania). Los resultados obtenidos indican que es posible combinar exitosamente metodologías de distintas disciplinas para el desarrollo de nuevos materiales híbridos que, se espera, tengan en un futuro un papel fundamental en la nanomedicina y la nanotecnología.

## 9.2 PROYECCIONES

Los nanogeles sintetizados y caracterizados en esta Tesis Doctoral presentaron potenciales aplicaciones en el área de la nanomedicina. Por esta razón, se propone continuar estudiando estos sistemas para su perfeccionamiento. Se plantea un estudio completo de la incorporación y liberación de distintos fármacos evaluando diferentes condiciones. A su vez, estos sistemas también podrían modificarse empleando grupos *targeting* para aplicaciones aún más específicas. Además, en el grupo de investigación se espera continuar con los estudios biológicos de estos sistemas, ya sea la internalización celular, la citotoxicidad (al liberar el fármaco), estudios *in vivo*, etc.

### 9.3 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

**“Facile ultrasonication approach for the efficient synthesis of ethylene glycol-based thermoresponsive nanogels”**. Catalina Biglione<sup>†</sup>, Ana Sousa-Herves<sup>†</sup>, Martina Menger, Stefanie Wedepohl, Marcelo Calderón and Miriam C. Strumia. *RSC Adv.* (2015), 5, 15407–15413. † Igual contribución de los autores.

**“Transferrin Decorated Thermoresponsive Nanogels as Magnetic Trap Devices for Circulating Tumor Cells”**. Mazdak Asadian-Birjand<sup>†</sup>, Catalina Biglione<sup>†</sup>, Julian Bergueiro, Ariel Cappelletti, Chinmay Rahane, Govind Chate, Jayant Khandare, Bastian Klemke, Miriam C. Strumia, Marcelo Calderon. *Macromol. Rapid Commun.* (2016), 37 (5), 439-445. † Igual contribución de los autores.

**“Novel magnetic nanogel using MNP as covalent cross linkers for hyperthermia treatment”**. Catalina Biglione, Julián Bergueiro, Stefanie Wedepohl, Marcelo Calderón, Miriam Strumia. *Manuscrito en redacción*.

**“Optimizing the circulating tumor cells capture efficiency of magnetic nanogels by transferrin decoration”** Catalina Biglione, Mazdak Asadian-Birjand, Julian Bergueiro, Vrushali Khobragade, Govind Chatea, Manoj Dongare, Jayant Khandare, Miriam C. Strumia, Marcelo Calderon. *Manuscrito en redacción*.

Otras publicaciones:

**“C-C bond formation catalyzed by core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pd magnetic nanoparticles: An efficient nanocatalyst in Heck-Mizoroki coupling reaction”**. Catalina Biglione, Ariel L. Cappelletti, Miriam C. Strumia, Sandra E. Martin, Paula M. Uberman. *Manuscrito en redacción*.

Capítulo de libro de polímeros acerca de nanogeles:

**“Design of multifunctional nanogels with intelligent behavior”**. *Polymer Gels: Science and Fundamentals*.

Guido Rimondino, Catalina Biglione, Marisa Martinelli, Cecilia Alvarez Igarzábal y Miriam Strumia Springer Publisher. Aceptado. 23/11/2016.