A transmission electron micrograph showing numerous spherical nanoparticles. Some are single spheres, while others are pairs or small clusters of spheres. The particles have a darker, textured core and a lighter, smoother outer shell. The background is a light gray, grainy texture.

# Nanopartículas híbridas $\text{Fe}_3\text{O}_4@p\text{NIPAM}$ y $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ para aplicaciones en nanomedicina

Directores:

Juan Manuel López Romero  
Rafael Contreras Cáceres

Programa de Doctorado:

Química y Tecnologías Químicas.  
Materiales y Nanotecnología



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tesis Doctoral  
Alicia Ortega Rodríguez  
2022



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Alicia Ortega Rodríguez

 <https://orcid.org/0000-0001-7469-6723>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

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

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



Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

## TESIS DOCTORAL

---

# *Nanopartículas híbridas $Fe_3O_4@pNIPAM$ y $Ag_2S/Ag$ para aplicaciones en nanomedicina*

---

Programa de Doctorado:

Química y Tecnologías Químicas. Materiales y Nanotecnología

Alicia Ortega Rodríguez

Málaga, enero 2022



Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

---

# ***Nanopartículas híbridas $Fe_3O_4@pNIPAM$ y $Ag_2S/Ag$ para aplicaciones en nanomedicina***

---

Programa de Doctorado:

Química y Tecnologías Químicas. Materiales y Nanotecnología

Memoria que presenta **Alicia Ortega Rodríguez** para optar al grado de Doctor

Málaga, enero 2022

**DIRECTORES :**

Juan Manuel López Romero

Rafael Contreras Cáceres

Catedrático Dpto. Química Orgánica

Contratado Doctor Dpto. Química

Universidad de Málaga

Universidad de Complutense de

Madrid



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña Alicia Ortega Rodríguez

Estudiante del programa de doctorado Química y Tecnologías Químicas. Materiales y Nanotecnología de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: Nanopartículas híbridas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@pNIPAM y Ag<sub>2</sub>S/Ag para aplicaciones en nanomedicina

Realizada bajo la tutorización de Juan Manuel López Romero y dirección de Juan Manuel López Romero y Rafael Contreras Cáceres

### DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 07 de octubre de 2021

Fdo.: Alicia Ortega Rodríguez Doctorando/a	Fdo.: Juan Manuel López Romero Tutor/a
Fdo.: Juan Manuel López Romero Director/es de tesis	



*A las personas que  
me llenáis de vida*

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Agradecimientos*

Desde que la Organización Mundial de la Salud declarase en marzo de 2020 la pandemia mundial por COVID-19 todas nuestras vidas cambiaron. El mundo se paralizó y empezamos a acostumbrarnos a una nueva vida que rompía con todo lo que siempre habíamos apreciado. Fue ahí, en este ambiente de caos, miedo y pérdidas, cuando decidí comenzar la escritura de mi Tesis Doctoral.

Para llegar hasta aquí llevo un largo camino que no he recorrido sola. Son muchas las personas que me han acompañado en esta aventura. A todas las que en algún momento me hayáis ayudado: compañeros de laboratorio de Málaga, Granada, Madrid y Sevilla, y directores. Gracias.

Pero sin ninguna duda, para realizar una Tesis Doctoral necesitas mucha ayuda de la que nada tiene que ver con la ciencia, y todo tiene que ver con el amor. Vosotros, los que me llenáis de vida cada día, mi familia de sangre y mi familia de corazón, sois la parte principal de este libro. A todos GRACIAS.

# *Índice*

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1. <b>NANOMEDICINA</b> .....	18
1.2. <b>IMPORTANCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS EN MEDICINA</b> .....	19
1.2.1. <i>Fármacos anticancerígenos en nanopartículas</i> .....	23
•    5-Fluoruracilo .....	23
•    Oxaliplatino.....	24
1.3. <b>TIPOS DE NANOPARTÍCULAS</b> .....	24
•    Nanopartículas magnéticas (MNPs) .....	25
•    Nanopartículas poliméricas sensibles a estímulos externos: pNIPAM ...	28
•    Nanopartículas inorgánicas semiconductoras: sulfuro de plata.....	31
1.4. <b>MODIFICACIONES EN LA SUPERFICIE</b> .....	32
•    Tensoactivos .....	33
•    Carga de la superficie.....	34
•    PEGilación.....	35
1.5. <b>VECTORIZACIÓN</b> .....	35
•    Vectorización pasiva: efecto de permeabilidad y retención aumentada .	36
•    Vectorización activa: terapia dirigida.....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	45
2.1. <b>CARACTERIZACIÓN</b> .....	46
2.1.1. <i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	46
2.1.2. <i>Difracción de rayos X de polvo (XRD)</i> .....	47
2.1.3. <i>Dispersión dinámica de luz (DLS)</i> .....	47

• Radio hidrodinámico.....	48
• Potencial Z .....	48
2.1.4. Liberación <i>in vitro</i> .....	49
2.1.5. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).....	50
2.1.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM). EDS y HAADF.....	50
• Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) .....	51
• Microscopía de difracción de ángulo alto en campo oscuro (HAADF) ..	52
2.1.7. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	52
2.1.8. Liofilización.....	53
2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	53
2.2.1. Materiales.....	54
2.2.2. Coprecipitación.....	54
2.2.3. Descomposición térmica.....	56
2.2.4. Funcionalización de la superficie.....	58
• Con ácido but-3-enoico. Preparación de @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -3BA .....	58
• Con ácido acrílico. Preparación de @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA .....	59
2.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	60
2.3.1. Materiales.....	60
2.3.2. Preparación de nanopartículas de pNIPAM@MZ.....	61
2.3.3. Preparación de nanopartículas copoliméricas .....	63
• Con ácido but-3-enoico. Preparación de pNIPAM-co-3BA@.....	63
• Con ácido acrílico. Preparación de pNIPAM-co-AA@ .....	64
• Con alilamina. Preparación de pNIPAM-co-AL@.....	65
2.3.4. Preparación de sistemas híbridos con núcleo magnético.....	65
• Preparación de pNIPAM@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -3BA .....	65
• Preparación de pNIPAM@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA.....	66
• Preparación de pNIPAM-co-AL@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA .....	67
2.3.5. Marcaje fluorescente. Preparación de pNIPAM-co-AL-FITC@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA ..	67

2.3.6. Encapsulación de fármacos: 5-fluorouracilo y oxaliplatino.....	69
2.4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA .....	70
2.4.1. Materiales.....	70
2.4.2. Síntesis del precursor $Ag(DDTC)$ .....	71
2.4.3. Síntesis de nanopartículas $Ag_2S/Ag$ .....	72
2.4.4. Transferencia a medio acuoso mediante ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) .....	74
2.4.5. Funcionalización de la superficie con polietilenglicol (PEG).....	76
2.4.6. Síntesis de nanopartículas núcleo@corteza de $Ag_2S/Ag@ZnS$ .....	77
2.4.7. Síntesis del precursor $Zn(DDTC)_2$ .....	78
2.4.8. Síntesis de nanopartículas $Ag_2S/Ag@ZnS$ .....	78
<b>PARTE TEÓRICA.....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO I: NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON NÚCLEOS     MAGNÉTICOS PARA EL TRANSPORTE Y LA LIBERACIÓN CONTROLADA     DE FÁRMACOS .....</b>	<b>83</b>
I.1. ANTECEDENTES.....	84
I.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
I.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPs) .....	91
I.3.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas de $Fe_3O_4$ ( $Fe_3O_4@$ ) .....	91
I.3.2. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas de $Fe_3O_4$ .....	94
I.4. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	96
I.4.1. Síntesis de los sistemas $pNIPAM@MZ$ .....	96
I.4.2. Adición de comonómeros a $pNIPAM@MZ$ : nanopartículas copoliméricas ...	99
I.5. SISTEMAS HÍBRIDO DE PNIPAM CON NÚCLEO MAGNÉTICO .....	102
I.5.1. Optimización del tamaño: variación de la concentración de monómero y entrecruzante.....	103
• Variación de la cantidad de monómero .....	103
• Variación de la concentración de entrecruzante.....	106

I.5.2 Diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) y temperatura crítica de transición de fase (LCST).....	110
I.5.3. Análisis de contenido en hierro.....	115
I.5.4. Marcaje fluorescente: preparación de FITC-pNIPAM-co-AL@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA ...	115
I.6. ENCAPSULACIÓN DE 5-FLUORURACILO Y OXALIPLATINO.....	118
I.7. LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE 5-FLUORURACILO Y OXALIPLATINO.....	120
<b>CAPÍTULO II: NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA PARA BIOIMAGEN POR FLUORESCENCIA</b> .....	124
II.1. ANTECEDENTES .....	125
II.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	135
II.2.1 Síntesis del precursor Ag(DDTC).....	135
II.2.2 Síntesis de nanopartículas Ag <sub>2</sub> S/Ag.....	136
II.2.3. Caracterización HAADF-STEM y EDS.....	141
II.2.4. Difracción de rayos X de polvo (XRD).....	146
II.2.5. Absorción ultravioleta (UV-Vis).....	147
II.2.6. Análisis elemental por energía dispersa (EDS) .....	150
• Muestra A: <b>XDTT</b> de 0.....	151
• Muestra D: <b>XDTT</b> de 0.6.....	152
• Muestra F: <b>XDTT</b> de 1 .....	154
II.2.7. Transferencia a medio acuoso y funcionalización superficial con PEG.....	157
II.2.8. Síntesis y caracterización de nanopartículas Ag <sub>2</sub> S/Ag@ZnS.....	160
• Síntesis del precursor Zn(DDTC) <sub>2</sub> .....	161
• Caracterización Ag <sub>2</sub> S/Ag@ZnS.....	162
CONCLUSIONES .....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	163



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Resumen*



El término nanomedicina se define como la rama de la nanotecnología aplicada a la medicina para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades mediante el uso de nanopartículas (NPs), es decir, partículas del rango nanométrico ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). Desde hace más de 30 años, cuando se aprobó la primera NP con aplicación médica, no ha parado de crecer el desarrollo de nuevos sistemas nanométricos que superan los inconvenientes de los fármacos convencionales como la baja farmacocinética y farmacodinámica, alta toxicidad e inespecificidad de acción. Entre las muchas aplicaciones, la principal área de aplicación de las NPs con potencial biomédico en el mercado y en desarrollo clínico es el cáncer.

La nanomedicina aplicada al cáncer aborda los problemas de diagnóstico y terapia con la introducción de técnicas más personalizadas, específicas, eficientes y localizadas, minimizando los efectos secundarios y toxicidad asociados a los tratamientos antitumorales convencionales. Así, el desarrollo de NPs posibilita la administración mediante nuevos sistemas de tamaño nanométrico de manera específica, y capaces de responder a estímulos para una liberación controlada. Además, los sistemas de nanoimagen permiten un alto contraste para el diagnóstico preciso mediante técnicas no invasivas y permitiendo la detección temprana. Esta Tesis Doctoral se engloba dentro del ámbito de la nanomedicina mediante el desarrollo y caracterización de NPs con potencial uso biomédico para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

En cuanto al uso de NPs para el tratamiento de enfermedades se ha aprovechado las potenciales características de las NPs poliméricas como transportadores de fármacos tales como biodegradabilidad, solubilidad en agua, baja toxicidad, larga vida útil y alta estabilidad durante su almacenamiento. Por tanto, se han sintetizado y caracterizado una serie de sistemas de microgeles híbridos



compuestos por nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de hierro recubiertas por un polímero termosensible, *N*-isopropilacrilamida (*p*NIPAM), en los que se han encapsulado los fármacos 5-fluorouracilo (5FU) y oxaliplatino (OXA), ampliamente utilizados para el tratamiento antitumoral y en concreto del cáncer colorrectal. A través de la encapsulación de estos agentes quimioterapéuticos en NPs se superan considerablemente las limitaciones de estos tratamientos, como su actuación no específica en los tejidos u órganos. Además, el 5FU muestra una rápida metabolización y excreción y el OXA provoca efectos adversos como la neuropatía periférica, lo que limita el uso para el tratamiento del cáncer colorrectal. Asimismo, el uso de MNPs permite el direccionamiento hacia el tejido u órgano donde se requiere la acción del fármaco con el uso de campos magnéticos externos, al mismo tiempo que genera calor en la zona facilitando la liberación del fármaco del microgel de *p*NIPAM, ya que este polímero, al ser termosensible, es capaz de responder a estímulos externos, como la temperatura, para facilitar la liberación controlada de las moléculas encapsuladas. En este contexto, la asociación de fármacos citotóxicos a NPs poliméricas con núcleo magnético supone un importante camino para mejorar la eficiencia de liberación y actuación, reduciendo los efectos adversos asociados a la dosis de los fármacos anticancerígenos.

Por otro lado, otro de los principales ámbitos de actuación de la nanomedicina es en el diagnóstico a través de NPs para bioimagen. Las NPs fluorescente como agentes de contraste para imagen por fluorescencia juegan un papel fundamental en el ámbito de la bioimagen, permitiendo obtener información de órganos y tejidos de organismos vivos, con potencial aplicación a nivel clínico. Las técnicas convencionales utilizadas para el diagnóstico mediante imagen se basan en el uso de radiación ionizante, que acarrear grandes inconvenientes, como la toxicidad,



baja sensibilidad y resolución espacial. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado, optimizado y caracterizado NPs de sulfuro de plata ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ) para bioimagen mediante fluorescencia, capaces de emitir entre los 1000 – 1350 nm (región NIR-II o segunda ventana biológica). Se tratan de NPs biocompatibles, con elevada estabilidad fotoquímica, sensibilidad e intensidad de emisión. Además, evitan los problemas asociados a la fluorescencia al trabajar en la segunda ventana biológica, como la autofluorescencia de los tejidos y el *scattering*, consiguiendo una alta profundidad de penetración de la luz en los tejidos y alta resolución de imagen.

Se espera que el desarrollo en nanomedicina siga creciendo en los próximos años, ya que ofrece ventajas únicas para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, especialmente del cáncer. Las NPs aquí desarrolladas muestran un gran potencial en esta área, por lo que es fundamental continuar la investigación y desarrollo para, en un futuro, poder llegar a tener utilidad clínica.

**Palabras clave:** nanomedicina, liberación controlada de fármacos, diagnóstico, bioimagen, nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas, *p*NIPAM, sulfuro de plata.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Listado de abreviaturas*



@	Recubierto o recubrimiento
°C	Grado Celsius
3BA	Ácido but-3-enoico
5FU	5-Fluorouracilo
AA	Ácido acrílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AL	Alilamina
AMF	Campo magnético alterno
ARN	Ácido ribonucleico
BIS	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida
CAI	Centro de Asistencia a la Investigación
CHI	Quitosano
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DDT	1-dodecanetiol
DDTC	Dietilditiocarbamato
$D_h$	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDS o EDX	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X
EE	Eficiencia de encapsulación
EMA	Agencia Europea de Medicamentos



EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GFP	Proteína verde fluorescente
HAADF	Microscopía de difracción de ángulo alto en campo oscuro
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IR	Infrarrojo
LCST	Temperatura crítica de transición de fase
MAPOSS	Silsesquioxano poliédrico oligomérico
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MRI	Imagen por resonancia magnética
MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinamida
NIPAM	<i>N</i> -isopropilacrilamida
NIR	Espectroscopia del infrarrojo cercano
NPs	Nanopartículas
OLA	Oleilamina
OXA	Oxaliplatino
PBS	Tampón fosfato



PCL	poli- $\epsilon$ -caprolactona
PEG	Polietilenglicol
PEG-NH <sub>2</sub>	<i>O</i> -(2-aminoetil)- <i>O'</i> -metilpolietilenglicol
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGA	Ácido poliglicólico
PL	Fotoluminiscencia
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli(láctico-co-glicólico)
<i>p</i> NIPAM	Poli( <i>N</i> -isopropilacrilamida)
QY	Eficiencia cuántica
R6G	Rodamina
RES	Sistema reticuloendotelial
RGD	Ácido aspártico
$R_h$	Radio hidrodinámico
SCAI	Servicios Centrales de Apoyo a la de Investigación
SDBS	Base de datos espectral para compuestos orgánicos
SPECT	Tomografía computerizada de emisión monofotónica
STEM	Microscopía electrónica de transmisión por barrido
TC	Tomografía computerizada
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico



TMAOH	Hidróxido de tetrametilamonio
ULC	Reticulación ultra-baja
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V50	Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
VPT	Transición de fase en volumen reversible
XDDT	Fracción molar del disolvente
XRD	Difracción de rayos X de polvo
ZP	Potencial Z



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Introducción*



## 1.1. Nanomedicina

El prefijo “nano” deriva del griego *νάνος* que significa “enano”. Un nanómetro (nm) equivale a una mil millonésima parte de un metro, por tanto, cuando hablamos de **nanotecnología** nos referimos a la ciencia e ingeniería implicada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y sistemas en la escala nanométrica.<sup>1</sup> A dicho tamaño, se producen los denominados “fenómenos de nanoescala”, que son cambios en las propiedades físicas y químicas de la materia respecto a los observados macroscópicamente, como la conductividad eléctrica, el color, la resistencia o la elasticidad. Estas características son la base para la aplicación de la nanotecnología en un amplio espectro de campos de investigación, entre los que destacan los materiales, el medioambiente, la electrónica, la energía y la medicina.

La explotación de la nanotecnología en el campo de la medicina, la **nanomedicina**, tiene como objetivo el desarrollo de herramientas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades, de manera más rápida, eficaz y específica, superando los inconvenientes asociados a la medicina convencional.<sup>2</sup> En los últimos años, la nanomedicina ha sufrido un crecimiento espectacular, generando un importante impacto económico, impulsado además por el propósito de proporcionar avances en términos de atención médica personalizada.<sup>3</sup>

La herramienta principal de trabajo en la nanomedicina son las **nanopartículas** (NPs), es decir, partículas que se encuentran en el rango de los nanómetros, y que pueden aplicarse en el ámbito médico en, principalmente, tres áreas de actuación: el diagnóstico (nanodiagnóstico), la liberación controlada de fármacos (nanoterapia) y la medicina regenerativa.<sup>4</sup>

## 1.2. Importancia de las nanopartículas en medicina

Actualmente existen alrededor de 80 NPs aprobadas para el uso médico por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA); y más de 230 en desarrollo clínico. La gran mayoría de los nanofármacos que se encuentran en el mercado o en desarrollo están indicados para el tratamiento de un gran rango de cánceres. Principalmente, se tratan de nuevas formulaciones de fármacos quimioterapéuticos existentes, como docetaxel, paclitaxel y cisplatino, cuyo uso clínico está limitado debido a los efectos secundarios y a la toxicidad.

El cáncer es uno de los principales problemas de la salud mundial.<sup>5</sup> Se trata de una enfermedad compleja, que abarca una serie de trastornos caracterizados por el crecimiento continuo e incontrolado de las células cancerosas. Para afrontar este reto es necesario un diagnóstico temprano, preferiblemente en estadio precanceroso, además de tratamientos más efectivos.

Las terapias convencionales utilizadas para el tratamiento del cáncer incluyen métodos invasivos, no específicos y no personalizados, tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia para eliminar las células cancerosas, y que poseen importantes limitaciones.<sup>6</sup> Por un lado, la cirugía no puede utilizarse en todos los tipos de cánceres y puede implicar la pérdida de un órgano. La radioterapia mata las células cancerosas, pero también daña a las células sanas de los alrededores. La quimioterapia, método más utilizado por sí solo o en combinación con otros tratamientos, se trata de un procedimiento agresivo y con baja eficacia en los estadios más avanzados del cáncer, debido a la baja especificidad y a la toxicidad, que limitan la dosis.

La nanotecnología ofrece nuevas soluciones para el desarrollo de tratamientos para el cáncer, superando las limitaciones de las terapias convencionales y mejorando la eficacia y seguridad.<sup>7</sup> En este escenario, las NPs juegan un papel fundamental, principalmente porque poseen propiedades únicas en la nanoescala y sirven como transportadores óptimos de moléculas o agentes macromoleculares, lo que permite la unión de la NP a la superficie celular y la liberación del fármaco en su interior. En la figura 1 se esquematiza como las NPs permiten su direccionamiento hacia la zona del tumor, evitando la acción del fármaco anticancerígeno por todo el cuerpo y por ende, los efectos secundarios de estos.

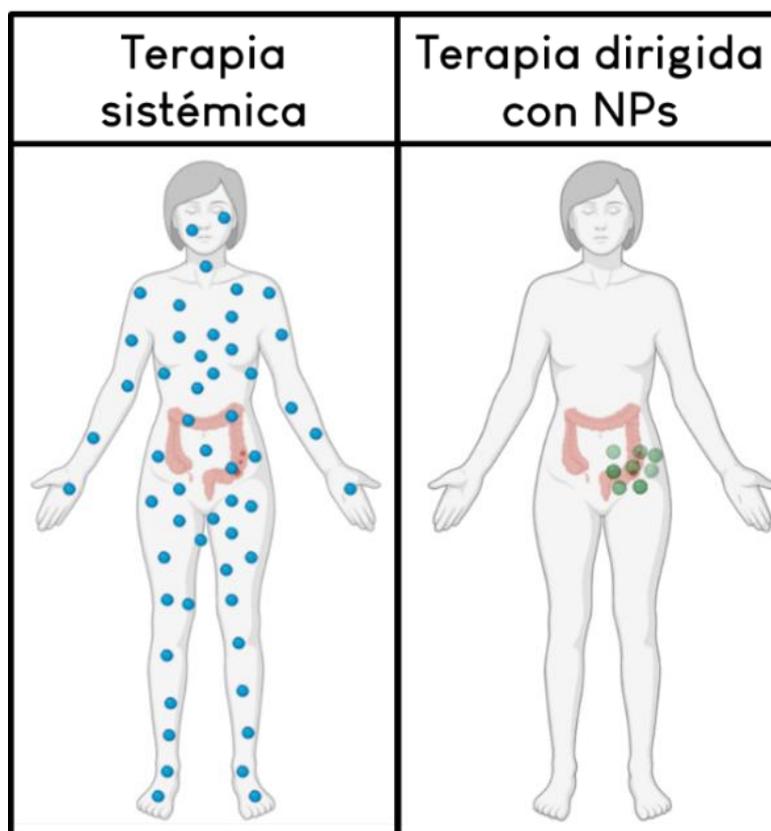


Figura 1. Representación esquemática de la administración de fármacos para la terapia contra el cáncer: tratamientos sistémicos frente a terapias dirigidas con nanopartículas.<sup>8</sup>



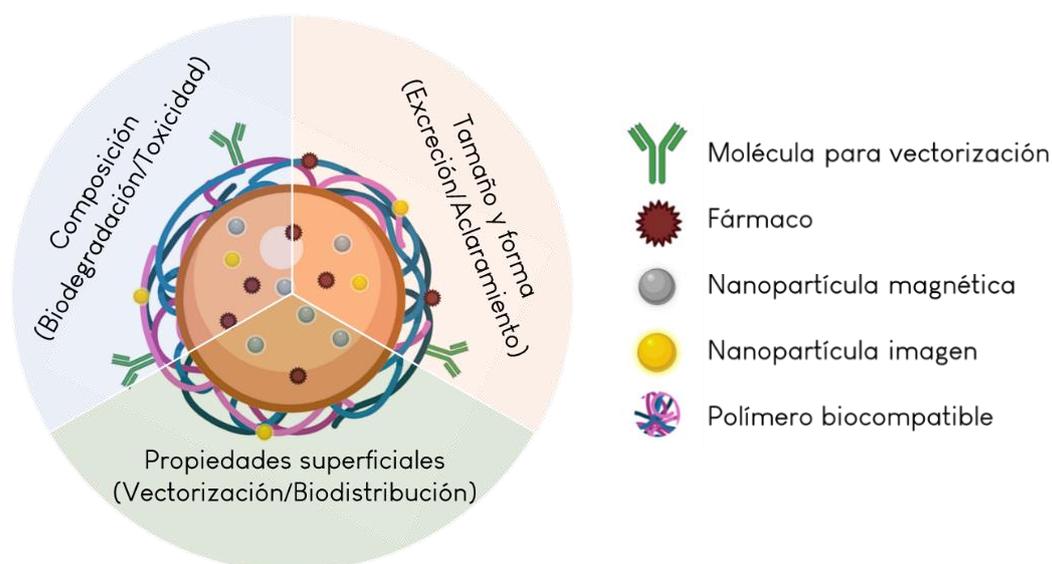
Las principales ventajas que pueden aprovecharse para las aplicaciones biomédicas son:

- ✓ Las características propias de cada NP, como tamaño, forma, composición y propiedades de la superficie, que pueden modificarse con facilidad para ajustarse a los requerimientos de liberación de fármacos, evitando la degradación de estos.
- ✓ Las modificaciones en la superficie mediante anticuerpos o ligandos específicos permiten el direccionamiento o vectorización de las NPs, además de mejorar la interacción con otros materiales y el organismo.
- ✓ Los fármacos que en la naturaleza son altamente hidrófobos pueden modificarse a hidrófilos, permitiendo su transporte en medios biológicos, y viceversa, según las necesidades y aplicaciones. Además, proporcionan protección al fármaco frente a la metabolización y excreción, aumentando el tiempo de circulación y la biodisponibilidad, y por tanto influyendo en el perfil farmacocinético del compuesto.
- ✓ La liberación de fármacos puede ser controlada y localizada, además de transportarse de forma dirigida al sitio de acción, consiguiendo una acción farmacológica óptima y sostenida.
- ✓ Las NPs con fines biomédicos no poseen toxicidad y son eliminadas de forma segura del organismo.

Como resultado de las características tan insólitas, las NPs tienen multitud de aplicaciones, tanto terapéuticas como de diagnóstico; pudiéndose formular infinitud de NPs, de un solo material o de composición compleja, y con tamaño, forma y características específicas. Será importante definir las características fisicoquímicas de cada NP relacionadas con su aplicación.<sup>6</sup>

Por tanto, las tres áreas principales en las que las NPs juegan un papel fundamental en la nanomedicina son: liberación de fármacos, diagnóstico y combinación de terapia y diagnóstico (teranósticos).

El término “teranóstico” hace referencia a la aplicación de NPs que exhiben las características de diagnóstico y terapia en una sola entidad.<sup>9</sup> En la figura 2 se esquematiza una nanopartícula teranóstica y las propiedades fisicoquímicas modificables.



*Figura 2. Representación esquemática de una nanopartícula teranóstica, con capacidad de diagnóstico y terapia por sí misma. Las características fisicoquímicas regulan la farmacocinética, biodistribución y toxicidad in vivo.<sup>9</sup>*

Estas funcionalidades tan interesantes están mediadas por la vectorización de las NPs hacia el tejido de interés y la biodistribución. Podemos distinguir distintas estrategias de vectorización, como la pasiva, la activa o la liberación controlada por estímulos. Se abordará posteriormente con más detalle la vectorización de las NPs.



### 1.2.1. Fármacos anticancerígenos en nanopartículas

Aprovechando las características de las NPs como sistemas para la liberación controlada de fármacos, se permite la reducción de la cantidad de fármaco y la frecuencia de la dosificación gracias a liberación selectiva en los tejidos diana, evitando los efectos secundarios asociados a los tratamientos tradicionales. En esta Tesis Doctoral se ha trabajado con los fármacos 5-Fluoruracilo y Oxaliplatino, ambos ampliamente utilizados para el tratamiento del cáncer.

- *5-Fluoruracilo*

El 5-Fluorouracilo (5FU) es uno de los compuestos quimioterapéuticos más utilizados para el tratamiento de una gran variedad de tumores como el cáncer colorrectal, el de mama, el de páncreas o el gástrico.<sup>10,11</sup> Se trata de un antimetabolito análogo de la pirimidina que inhibe la timidilato sintasa impidiendo la formación timina a partir de timidilato, y por ende, la síntesis de ADN y ARN durante la fase S del ciclo celular.<sup>12-14</sup>

Resulta un fármaco de gran interés para la incorporación en sistemas de liberación controlada en respuesta a estímulo como las NPs poliméricas,<sup>15</sup> debido a que además de tener una escasa absorción oral, presenta una corta vida media plasmática al metabolizarse rápidamente en el organismo, lo que afecta a la respuesta terapéutica del fármaco. Por tanto, mediante la encapsulación en NPs se protege al fármaco de la degradación tras la administración, además mediante la vectorización, se dirige al sistema para la liberación en el tejido diana, y finalmente se libera respondiendo a estímulos como puede ser pH o temperatura.

De este modo, se mejora la biodisponibilidad y se disminuye la dosis utilizada, y por ende los efectos tóxicos asociados.<sup>16</sup>

- ***Oxaliplatino***

El oxaliplatino (OXA) es un fármaco antitumoral de tercera generación basado en el platino que se utiliza actualmente como medicamento de elección para el tratamiento del cáncer colorrectal.<sup>17</sup> Se trata de un agente alquilante análogo del cisplatino, con efecto sinérgico a las fluoropirimidinas como el 5FU, por lo que se suele indicar combinados.<sup>18</sup>

A pesar de su eficacia clínica, el principal inconveniente es la acción no selectiva del oxaliplatino sobre las células normales y tumorales, lo que provoca cantidad de efectos adversos asociados a la dosis como neurotoxicidad, cardiotoxicidad, reacciones gastrointestinales y de hipersensibilidad.<sup>19</sup> Estas limitaciones pueden superarse mediante el desarrollo de nanosistemas para la administración de fármacos en respuesta al microambiente tumoral.<sup>20-24</sup>

### 1.3. Tipos de nanopartículas

Podemos clasificar las NPs según multitud de criterios, pero si nos centramos en su química, se clasifican en dos grupos: orgánicas e inorgánicas (*figura 3*). En esta Tesis Doctoral se han desarrollado nanopartículas de ambos tipos, específicamente: magnéticas, poliméricas y semiconductoras.

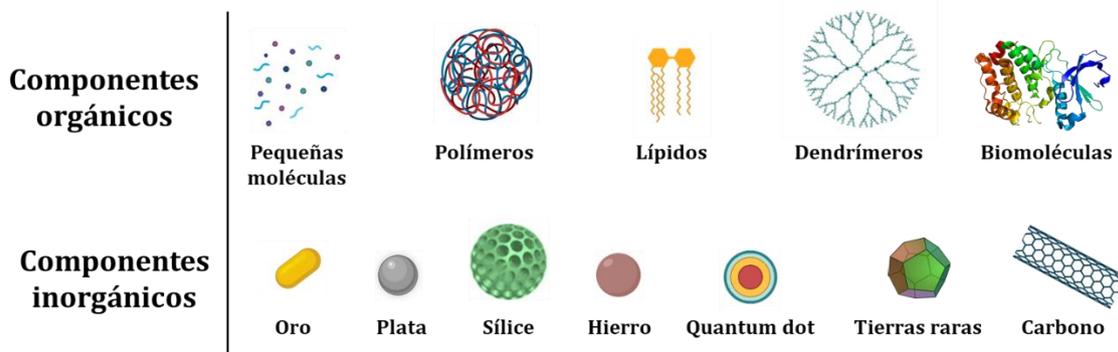


Figura 3. Principales tipos de componentes orgánicos e inorgánicos utilizados para la síntesis de nanopartículas.<sup>25</sup>

Entre estos tipos, destacamos, al ser su relación directa con el contenido de este trabajo, las MNPs, poliméricas y las NPs inorgánicas semiconductoras de sulfuro de plata.

- **Nanopartículas magnéticas (MNPs)**

Las MNPs se componen de elementos metálicos magnéticos, como hierro, níquel, cobalto o de sus óxidos como la magnetita o ferritas. Las más utilizadas son las formadas por óxido de hierro, en forma de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), de un tamaño inferior a los 50 nm y con características superparamagnéticas, sin magnetización remanente una vez que se retira el campo magnético. Estas propiedades, además de la biocompatibilidad y biodegradabilidad (pasando los iones de hierro al organismo y determinadas rutas metabólicas después de ser metabolizadas), hacen de las MNPs unos elementos indispensables en el campo de la nanomedicina.<sup>26</sup>



Los procesos de síntesis en el laboratorio son sencillos y baratos, destacando el método de coprecipitación en medio acuoso, por microemulsiones, o mediante síntesis hidrotermal y descomposición en medio orgánico.<sup>27</sup> Además, es común la modificación de la superficie con tensoactivos, lo que facilita la estabilización de las NPs en suspensión coloidal, ya que se contrarrestan las fuerzas de Van der Waals e interacciones magnéticas entre ellas.<sup>28,29</sup>

Las MNPs son unas de las nanopartículas más estudiadas, debido a la multitud de aplicaciones en nanomedicina. Su capacidad teranóstica – terapia y diagnóstico – reside en la utilidad de ser empleadas en el tratamiento mediante aplicación de un campo magnético alterno externo que eleve la temperatura (hipertermia); en el transporte y administración guiada de fármacos; o como agentes de contraste para las imágenes de resonancia magnética (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI).<sup>30,31</sup> Otras ventajas que se destacan son la separación magnética de células o compuestos, o como biosensores.<sup>32,33</sup> En la figura 4 se esquematiza las MNPs con aplicaciones teranósticas en cuanto a diagnóstico y terapia.

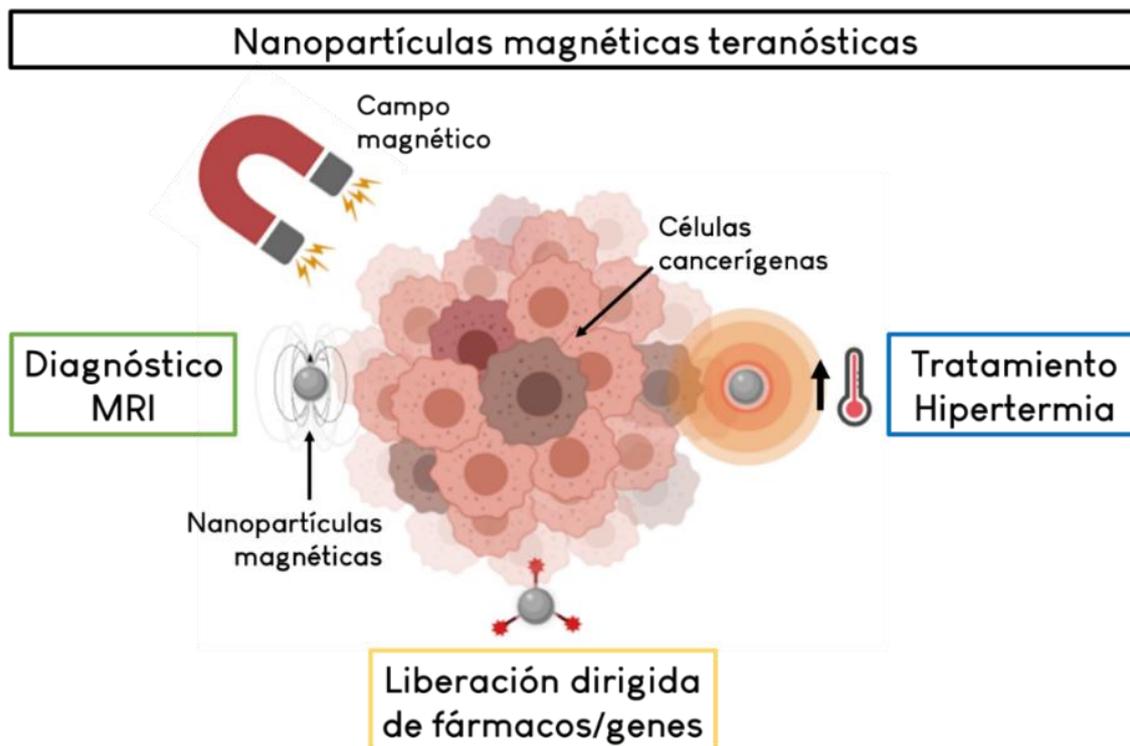


Figura 4. Aplicaciones teranósticas de las nanopartículas magnéticas. Diagnóstico por MRI, tratamiento por hipertermia y liberación dirigida de fármacos o genes.

El diagnóstico por MRI se basa en la utilización de campos magnéticos para alinear los momentos magnéticos nucleares de los átomos de hidrógeno del agua en el cuerpo, y permite la diferenciación de órganos según la proporción de agua en cada uno de ellos. La utilización de MNPs como agente de contraste está sustituyendo cada vez más al gadolinio, ya que estas producen imágenes de mayor contraste y no son tóxicas.<sup>34</sup>

El tratamiento de tumores por hipertermia se basa en la exposición de la región del cuerpo a tratar a altas temperaturas, lo que permite dañar o destruir las células cancerosas. Aquí, las MNPs se postulan como una herramienta prometedora para la eliminación no invasiva de pequeños tumores utilizando calor inducido magnéticamente.<sup>35,36</sup> Con la ayuda de un campo magnético externo, estas



NPs pueden dirigirse a la zona específica a tratar y adentrarse en el interior celular gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (del inglés *Enhanced Permeability and Retention*, EPR). Una vez en el interior de las células cancerígenas, se produce el aumento de temperatura que permite la eliminación de las células cancerígenas.

- *Nanopartículas poliméricas sensibles a estímulos externos: pNIPAM*

Las NPs poliméricas, en general, son muy utilizadas en nanomedicina ya que se sintetizan fácilmente y muestran características útiles para el transporte y liberación de fármacos, proteínas, ADN, genes etc., tales como: biodegradabilidad, pequeño tamaño (10 - 1000 nm), solubilidad en agua, no toxicidad, larga vida útil y estabilidad durante el almacenamiento.<sup>37</sup>

Los polímeros no sensibles a estímulos externos más utilizados en biomedicina son, entre otros, poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) o polietilenglicol (PEG). Los hidrogeles preparados con estos polímeros muestran un interés especial, ya que forman estructuras poliméricas entrecruzadas y son capaces de retener agua como consecuencia de su estructura tridimensional.

En el caso de NPs poliméricas sensibles a estímulos, estas se caracterizan por la capacidad de responder a diferentes parámetros fisicoquímicos, tales como el pH,<sup>38</sup> la temperatura,<sup>39</sup> la luz, la naturaleza del disolvente o la fuerza mecánica. El cambio en los valores de estos parámetros resulta en modificaciones de la estructura secundaria, de las dimensiones de sus cadenas, de la solubilidad o de

su asociación intermolecular. Este hecho puede ser aprovechado para, por ejemplo, controlar o modular la liberación de moléculas activas de interés.

Los polímeros más estudiados para la administración de fármacos en el tratamiento del cáncer son los sensibles a la temperatura y al pH. Esto es debido a que el microentorno que rodea a las células tumorales es diferente al que rodea a las células sanas, de pH más bajo y temperatura más alta; por lo que dicho microentorno puede utilizarse para la vectorización pasiva. Por ejemplo, las NPs sensibles al pH permanecen estables a un pH fisiológico de 7.4; pero colapsan para liberar el fármaco antitumoral en los tejidos diana que presentan valores de pH más bajos. De igual modo, los polímeros termosensibles desestabilizan su estructura liberando los compuestos activos en entornos tumorales que muestran una mayor temperatura.

La utilidad de los polímeros capaces de responder a estímulos destaca del resto sobre todo en aplicaciones biotecnológicas. Por ello, y por las características de los hidrogeles, en este trabajo resaltamos el polímero poli(*N*-isopropilacrilamida), *p*NIPAM.<sup>39</sup> Se trata de uno de los polímeros más utilizados, capaz de formar hidrogeles y microgeles sensibles a la temperatura. Este polímero se prepara por entrecruzamiento químico del monómero *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) junto con *N,N'*-metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante.<sup>40,41</sup>

El microgel de *p*NIPAM experimenta una transición de fase en volumen reversible (VPT) a la temperatura crítica de transición de fase (LCST, *lower critical solution temperature*) de alrededor de 32 °C en agua.<sup>42</sup> Esto significa que el microgel se expande por la incorporación de moléculas de disolvente (habitualmente, agua) a la temperatura menor que LCST, debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre el agua y los grupos de acrilamida. Por el contrario, por encima de la LCST,

las moléculas de agua son expulsadas debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno propiciada por la polarización del agua como por el efecto de la tensión superficial. Cuando el microgel colapsa, las interacciones hidrófobas entre los grupos isopropilo se convierten en las dominantes.<sup>43-47</sup> En la figura 5 se representa el cambio de fase del microgel del estado expandido al estado colapsado en función de la temperatura, y los cambios que se dan en la estructura.

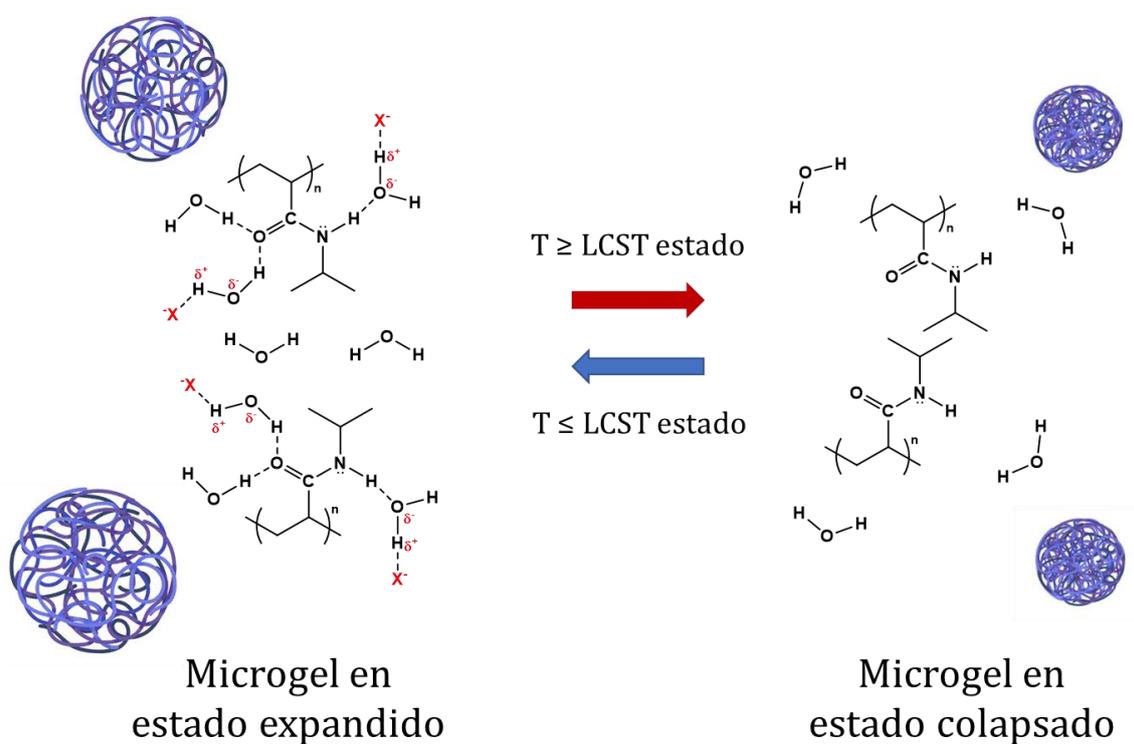


Figura 5. Esquema de la transición de fase entre el microgel en estado expandido (izquierda), y el microgel en estado colapsado (derecha) en función de la temperatura. Se representa la estructura de pNIPAM para ambos estados con la presencia de los enlaces de hidrógeno en el expandido y la ausencia en el colapsado.

- **Nanopartículas inorgánicas semiconductoras: sulfuro de plata**

A parte de las NPs inorgánicas magnéticas ya mencionadas, existe una amplia gama de nanomateriales inorgánicos innovadores que se están investigando actualmente por su potencial terapéutico y para la utilización en nanodiagnóstico, como el oro, la plata, las nanoesferas de sílice, los puntos cuánticos, los puntos de carbono y los nanotubos de carbono.<sup>48-50</sup> En concreto, en esta Tesis Doctoral hemos trabajado con NPs semiconductoras.

Las NPs semiconductoras se forman a partir de los cationes  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  o  $\text{In}^{3+}$ , y los aniones  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Se}^{2-}$ ,  $\text{Te}^{2-}$ ,  $\text{N}^{3-}$ ,  $\text{P}^{3-}$  o  $\text{As}^{3-}$ .<sup>51</sup> Enfocándonos en los calcogenuros de plata, las NPs de sulfuro de plata muestran posibilidades de aplicación en biomedicina, ya que tienen una alta estabilidad fotoquímica, biocompatibilidad, no presentan en su composición metales pesados como Cd, Hg o Pb, que son tóxicos y, además, emiten en la segunda ventana de infrarrojo cercano (NIR-II, 1000-1700 nm).

Esta última propiedad es importante porque la obtención de imágenes fluorescentes en la región NIR-II reduce la dispersión y la absorción de los tejidos, y con ello, la obtención de imágenes *in vivo* en este rango espectral proporciona una mejor resolución de las imágenes a mayores profundidades en los tejidos.<sup>52</sup> Por tanto, las NPs semiconductoras tienen un especial interés en el campo del diagnóstico.

## 1.4. Modificaciones en la superficie

La efectividad terapéutica de las NPs como sistema transportador de fármacos y como sistema para diagnóstico depende en gran medida de su reconocimiento, penetración a través de las barreras, internalización, formación de la corona proteica, retención en las células deseadas y escape del aclaramiento renal. Estas propiedades están estrechamente relacionadas con las propiedades de la superficie de las NPs. En la figura 6 se resume las interacciones biológicas relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de la superficie de las NPs.

Los procesos indicados están mediados por la superficie de las NPs, que se encuentra expuesta al organismo. Además, como se ha mencionado, la superficie de las NPs tiene vital importancia para la estabilidad de estas en suspensión y durante el proceso de síntesis, además, los grupos funcionales de la superficie pueden servir de anclaje para otras moléculas.



Figura 6. El tamaño y la carga de la superficie de las NPs van a determinar la interacción en las actividades biológicas y por ende el potencial como método de diagnóstico o tratamiento.<sup>53</sup>

A continuación, se analiza de forma breve el efecto de los tensoactivos, la carga de la superficie y la PEGilación de las NPs.

- *Tensoactivos*

Los tensoactivos se utilizan para estabilizar las NPs, aportando una capa protectora y evitando la agregación de estas. El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) es uno de los tensoactivos más utilizados para las NPs metálicas. Se trata de un tensoactivo catiónico que forma una bicapa con carga positiva sobre la superficie de las NPs.<sup>54</sup> La presencia de dichas cargas previene la agregación de las NPs en agua debido a la repulsión electrostática. En la figura 7 se representa la bicapa con carga positiva que forma el CTAB en la superficie de una NP y que impide la agregación en suspensión.

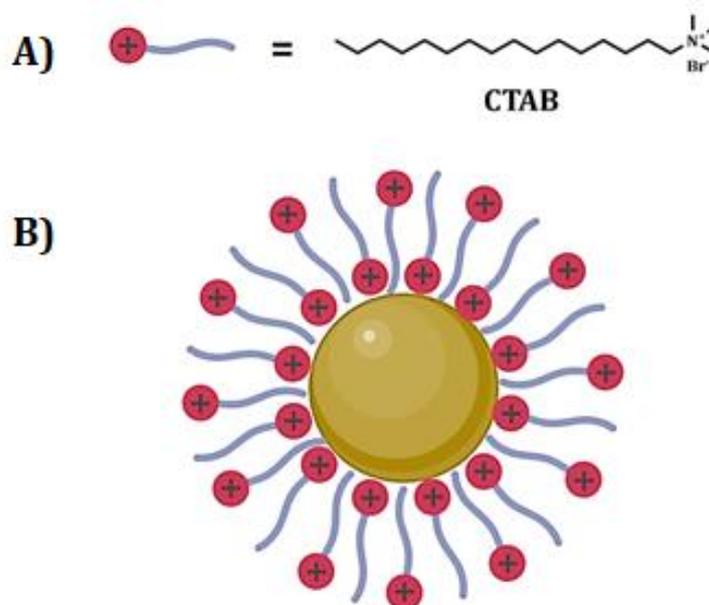


Figura 7. A) Estructura de la molécula de CTAB y B) esquema de la estructura de una NP metálica recubierta por CTAB (por ejemplo,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$ ).

- *Carga de la superficie*

La carga de la superficie de las NPs determina la biodistribución, internalización celular y la interacción con los ambientes biológicos. Generalmente, las NPs con carga positiva tienden a internalizarse más fácilmente que las neutras o las cargadas negativamente.<sup>53</sup> Esto puede ser debido a que el glicocáliz epitelial (envoltura que recubre a la membrana celular) presenta carga negativa, por lo tanto, las NPs con superficie catiónica sufren atracción electrostática hacia este, favoreciendo la penetración.<sup>55,56</sup> Sin embargo, es importante definir la carga específica de cada NP ya que la carga negativa nos aporta la ventaja de una mayor distribución en el organismo al existir una menor interacción electrostática con el glicocáliz.<sup>50,57</sup>

La carga de la superficie de las NPs también desempeña un papel importante en la opsonización por anticuerpos, proceso por el cual se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por fagocitos. Cuando las NPs entran en contacto con medios que contienen proteínas, como los fluidos biológicos, adquieren rápidamente una capa superficial de proteínas, conocida como corona proteica.<sup>58</sup> Esta influye sobre las propiedades de la superficie de las NPs, pudiendo cambiar la carga total (potencial zeta), el diámetro hidrodinámico y la agregación entre ellas.<sup>53,54,59</sup> Por tanto, las NPs con cargas positivas o negativas interactúan fuertemente con las proteínas plasmáticas y son eliminadas rápidamente del torrente sanguíneo por los macrófagos. Sin embargo, las NPs con naturaleza neutra, evitan la interacción con las proteínas opsoninas (moléculas coadyuvantes de la fagocitosis), como las albúminas, fibronectinas e inmunoglobulinas, por lo que no se reconocen como antígenos y por tanto muestran una mejor biodistribución al no ser destruidas.

- **PEGilación**

El recubrimiento de la superficie de las NPs con polietilenglicol (PEGilación), un polímero hidrófilo y biocompatible, reduce la carga de la superficie de las NPs y las enmascara al proceso de opsonización. Esto es debido a que minimiza las interacciones inespecíficas con las proteínas y por tanto evita su captación por las células macrocíticas.<sup>60</sup> Además, produce una mejora del tiempo de circulación de las NPs en la sangre, al evitar la captura por el sistema reticuloendotelial.<sup>61,62</sup> Gracias a las propiedades que aporta a las NPs, se trata de una de las estrategias más utilizadas en modificaciones en la superficie de NPs para el tratamiento y diagnóstico.

## 1.5. Vectorización

La penetración de los fármacos en el tejido tumoral es un factor limitante para el éxito de una terapia anticancerígena. La distribución de las NPs en el interior de estos tejidos y sus células está definida por las propiedades fisicoquímicas de las NPs y por las estrategias de vectorización.<sup>63</sup> Esta puede ser tanto pasiva, gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) en las células tumorales, como activa, para la dirección selectiva de los fármacos cancerígenos a las células a tratar. En la figura 8 se esquematiza las estrategias de vectorización pasiva y activa de las NPs para el tratamiento del cáncer.

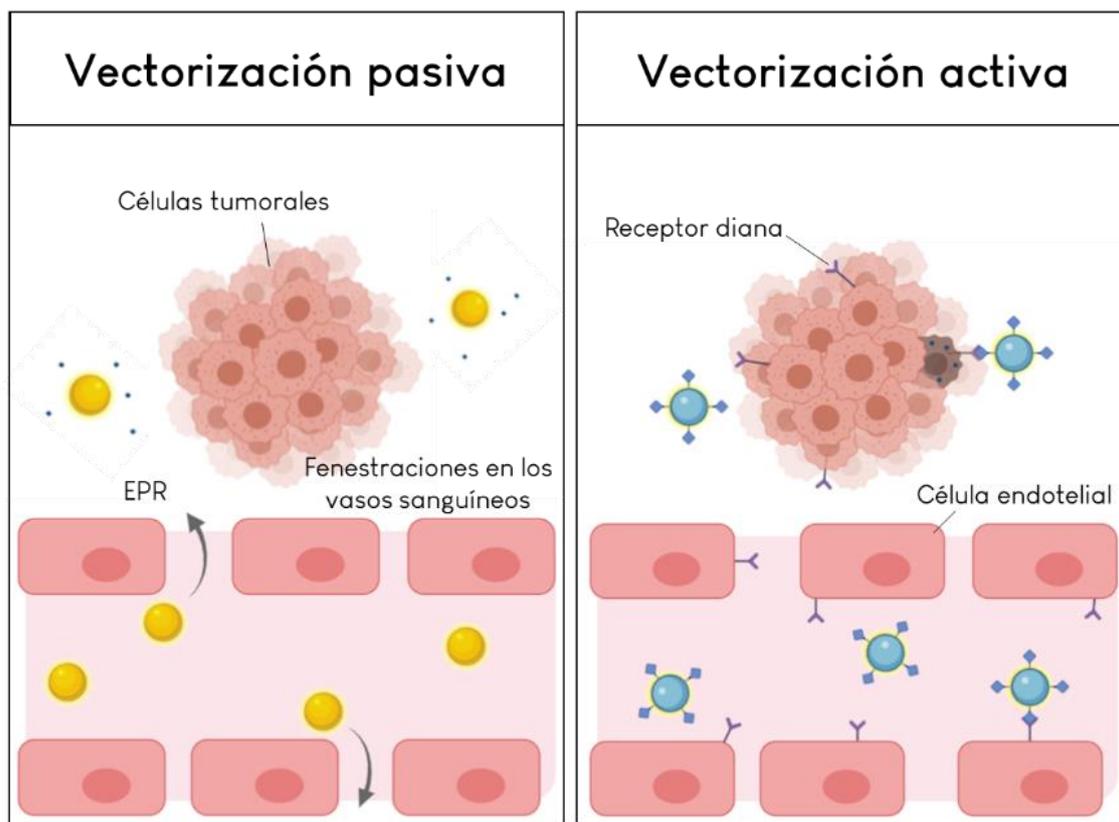


Figura 8. Estrategias de vectorización de las NPs para la distribución y liberación de fármacos anticancerígenos.

- **Vectorización pasiva: efecto de permeabilidad y retención aumentada**

La vectorización pasiva se fundamenta en el efecto de permeabilidad y retención aumentada (del inglés *Enhanced Permeability and Retention*, EPR). Este efecto es debido al rápido crecimiento de los tejidos tumorales. En el endotelio se generan fenestraciones de entre 200 y 600 nm a través de las cuáles las moléculas pequeñas y nanopartículas pueden difundirse más fácilmente, acumulándose por tanto las NPs de manera preferencial en los tejidos tumorales.<sup>64</sup> En la figura 9 se muestra las diferencias en el endotelio entre un tejido sano y un tejido tumoral y la acumulación de las NPs gracias al efecto EPR.

Gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada, cuando se inyectan NPs con tamaños en torno a 100 nm por vía intravenosa, las NPs inyectadas penetran con mayor facilidad en tejidos tumorales, donde tienden a quedar atrapadas. Por este motivo, un ajuste en el tamaño de las NPs permite su acumulación pasiva en los tejidos tumorales. Drogas anticancerígenas como los liposomas de doxorrubicina (Doxil®/Caelyx®) o el nab-paclitaxel (Abraxane®) son ejemplos comerciales del aprovechamiento del EPR en tratamientos de tumores por quimioterapia avanzada.<sup>65</sup>

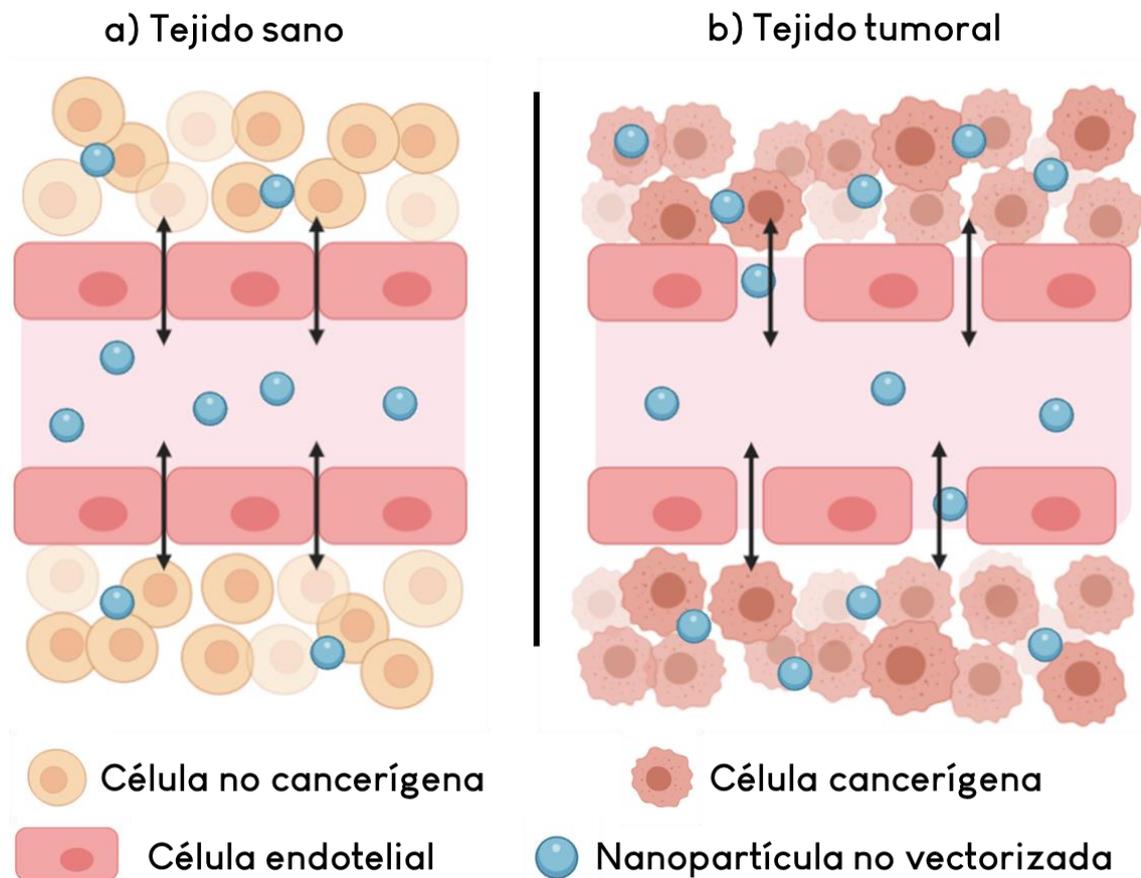


Figura 9. Acumulación diferencial de nanopartículas no vectorizadas en a) tejido sano y b) tejido tumoral. El efecto EPR permite a las NPs acumularse de manera preferencial en los tejidos tumorales, en los que liberan los compuestos activos.

- **Vectorización activa: terapia dirigida**

El objetivo principal de la vectorización activa es el direccionamiento de las NPs hacia una diana determinada (órgano, tejido o célula), de manera que se añade ligandos específicos para receptores concretos expresados en el lugar de acción. Las células tumorales sobreexpresan diferentes receptores en la superficie debido a la mayor necesidad de nutrientes que requieren, al tener un mayor y más rápido crecimiento que las células sanas. Aprovechando esta sobreexpresión, la vectorización activa de NPs se basa en el anclaje de ligandos que sean específicamente reconocidos por las células tumorales, tales como proteínas, anticuerpos, ácido fólico, carbohidratos, o macromoléculas como péptidos, aptámeros y oligonucleótidos.<sup>8</sup> Mediante la vectorización activa, se produce la internalización específica por las células tumorales a través de la endocitosis mediada por receptores, sin afectar a las células sanas vecinas, y permitiendo la acumulación del fármaco en la zona del tumor. En la figura 10 se muestra dianas sobreexpresadas en las células tumorales, útiles para la funcionalización de las NPs para la vectorización activa.

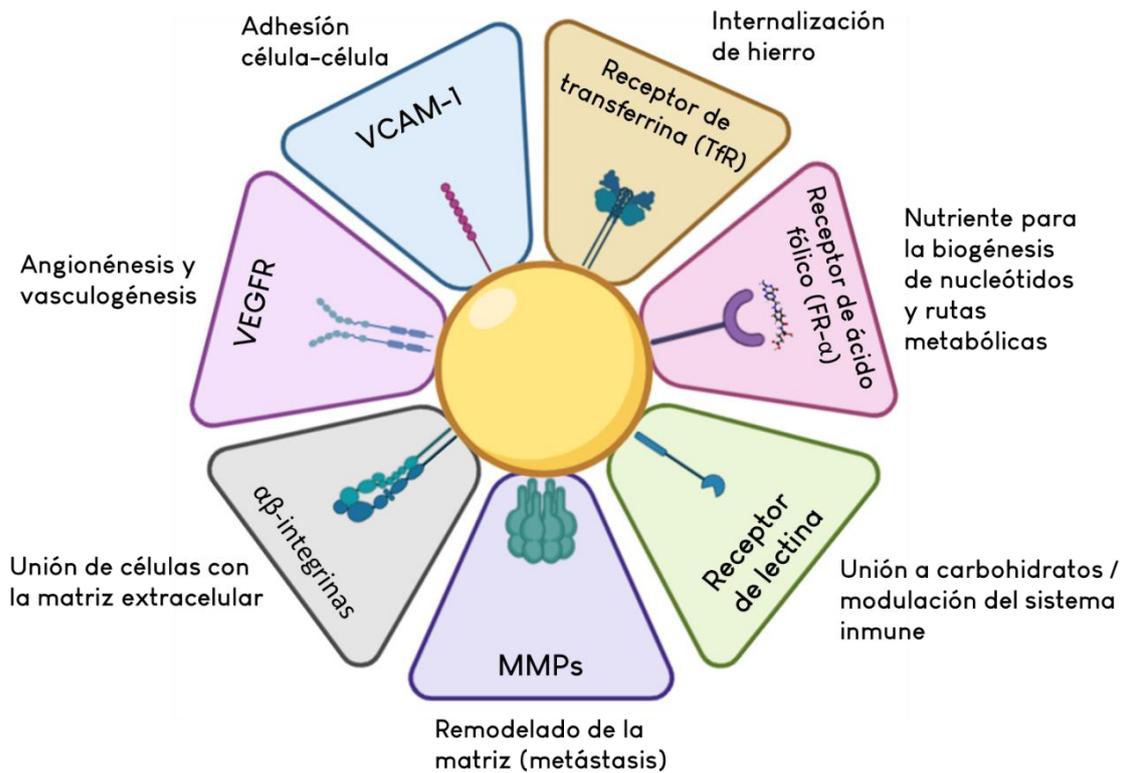


Figura 10. Moléculas diana útiles para la vectorización activa de NPs.<sup>8</sup>

Queda demostrado el potencial de las NPs para la utilización en el ámbito biomédico, es decir, la nanomedicina, perfilándose como un área con un gran potencial en el futuro próximo, especialmente en las aplicaciones de diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Sin embargo, no hemos de olvidar que se trata de un área aún en estudio y crecimiento, por lo que aún quedan muchos aspectos en los que son necesarios seguir investigando y mejorar.

Uno de los temas de principal conflicto es que aún no existen guías de seguridad de los cuerpos oficiales de regulatoria como la EMA o la FDA con relación a la evaluación de nanomedicinas e inmunotoxicidad. Esto es debido a que no se han desarrollado suficientes estudios de los efectos inmunológicos y la toxicidad producida por las NPs. Una mayor comprensión de las causas de la nanotoxicidad

mejoraría el diseño y desarrollo de NPs con uso biomédico y, por tanto, poder evitar la acumulación de NPs en el cuerpo, la toxicidad y los efectos adversos.

Como se observa en la figura 11, los datos obtenidos de la base de datos *Web of Science* muestra que la producción científica relacionada con el área de la nanomedicina ha seguido un crecimiento continuado a lo largo de los años. Se espera que el mercado de la nanomedicina siga ascendiendo exponencialmente de manera que puedan llegar a ensayos clínicos más sistemas nanométricos con utilidad biomédica, y finalmente al mercado con una repercusión real en tratamientos de medicina personalizada, diagnóstico y detección precoz de enfermedades.

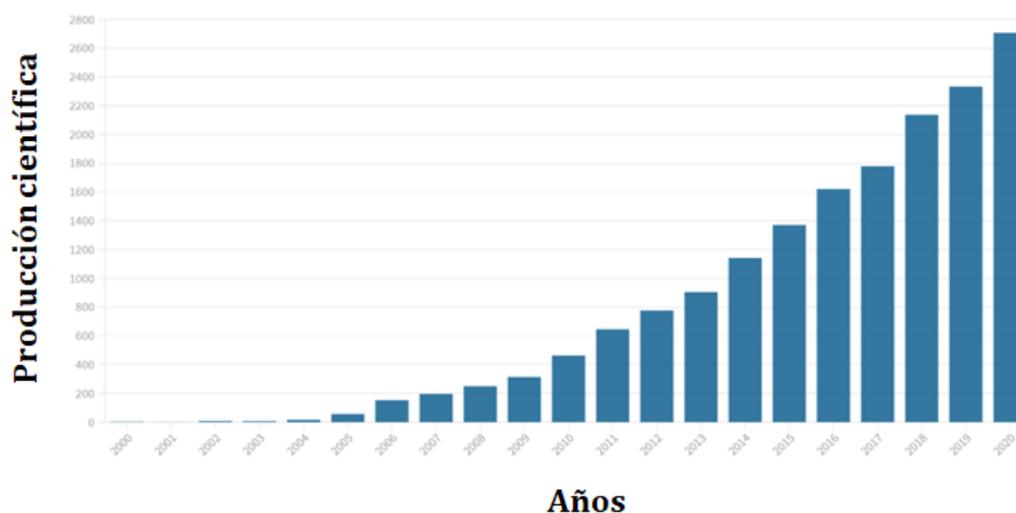


Figura 11. Gráfica de producción científica en el ámbito de la nanomedicina a lo largo de los años. Datos extraídos de *Web of Science*.

# *Objetivos*



El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de nanopartículas poliméricas sensibles a la temperatura con núcleo magnético y de sulfuro de plata con potencial uso biomédico. Para ello, se abordará desde los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo 1. Nanopartículas poliméricas sensibles a la temperatura con núcleo magnético para la liberación controlada de fármacos.**

En primer lugar, se sintetizará y caracterizará NP magnéticas de óxido de hierro por diferentes métodos. Las NPs obtenidas se funcionalizarán en la superficie con ácido acrílico (AA), ácido but-3-enoico (3BA) o alilamina (AL) para el posterior recubrimiento con polímero.

A continuación, se sintetizará el polímero *p*NIPAM mediante el método de polimerización por radicales libres, del cual se estudiará las condiciones óptimas de síntesis variando la concentración de monómero y/o entrecruzante. Se realizarán modificaciones en la superficie del polímero con ácido acrílico (AA), ácido but-3-enoico (3BA) o alilamina (AL), útiles para diferentes reacciones.

La preparación de los sistemas híbridos del polímero *p*NIPAM con núcleo magnético se llevará a cabo mediante la integración de las MNPs durante la síntesis del polímero funcionalizado. Además, se incorporará el marcador fluorescente FITC a las NPs de *p*NIPAM con núcleo magnético funcionalizadas con alilamina, para su visualización mediante microscopía fluorescente.

Finalmente, una vez caracterizados los sistemas obtenidos, se encapsularán los fármacos anticancerígenos: 5-fluoruracilo (5FU) y oxaliplatino (OXA), y se estudiará la liberación controlada *in vitro* en respuesta a la temperatura.



## **Objetivo 2. Nanopartículas de sulfuro de plata para bioimagen por fluorescencia.**

Las NPs de sulfuro de plata se sintetizarán mediante el método de descomposición térmica, para ello, en primer lugar, es necesario la síntesis del precursor Ag(DDTC). La reacción se llevará a cabo con los disolventes 1-dodecanotiol y oleilamina, de manera que se estudiará y caracterizará la relación de disolventes que genera las NPs con mejores condiciones para la utilización como marcadores fluorescentes. Una vez determinadas las condiciones óptimas de síntesis, se transferirán las NPs a medio acuoso mediante la modificación de la superficie con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA). Además, se funcionalizará la superficie con el polímero polietilenglicol (PEG).

Una vez obtenidas las NPs con las características de mayor interés, se estudiará la mejora de las propiedades lumínicas mediante la síntesis de una capa de recubrimiento de sulfuro de zinc sobre el sulfuro de plata, formando sistemas núcleo@corteza.

Los resultados obtenidos para los objetivos aquí descritos se estructuran dentro de esta Tesis Doctoral en dos capítulos.

- **Objetivo 1.** Se engloban dentro del Capítulo I: Nanopartículas poliméricas sensibles a la temperatura con núcleo magnético para la liberación controlada de fármacos.
- **Objetivo 2.** Recogido en el Capítulo II: Nanopartículas de sulfuro de plata para bioimagen por fluorescencia.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Parte experimental*



## 2.1. Caracterización

Las NPs preparadas fueron caracterizadas para determinar las propiedades físicas, químicas y morfológicas. Los datos obtenidos fueron analizados en búsqueda de una optimización de las síntesis y las propiedades de estas, para una mejora de los resultados. Las técnicas de caracterización empleadas se detallan a continuación.

### 2.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar los distintos grupos funcionales presentes en las NPs se realizó el análisis de espectroscopía infrarroja. Esta técnica registra los modos de vibración y torsión de grupos de átomos en moléculas a partir de los espectros de absorción de luz en el infrarrojo, mostrando picos característicos a la energía asociada a estas transiciones. El análisis de los espectros permite determinar la presencia de los grupos moleculares, su cuantificación aproximada, así como la hidratación de la muestra. Los espectros de infrarrojo se registraron con un espectrofotómetro FTIR Nicolet IR200 de Thermo Scientific en un rango de frecuencias entre 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  y con una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$ . Las muestras se analizaron en estado sólido, en forma de pastillas con bromuro de potasio.



### 2.1.2. Difracción de rayos X de polvo (XRD)

Con la medida de difracción de rayos X de polvo se estudió la estructura cristalina de las NPs de sulfuro de plata. El difractómetro utilizado fue un equipo X'Pert de Philips que funciona con radiación  $\text{Cu K}\alpha$ , con 1.5406 Å de longitud de onda. El rango de escaneo recorre desde los 20° hasta los 90° ( $2\theta$ ) en intervalos de 0.02° y con una velocidad normalizada de escaneo de 1 paso/s. Las condiciones de operación fueron 45 kV y 40 mA. Las medidas se realizaron en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de difracción de rayos X de polvo de la Universidad Complutense. El análisis de datos se realizó con ayuda del software MDI Jade, que cuenta con una base de datos para comparar los espectros obtenidos.

### 2.1.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz y potencial Z se determinó el tamaño de partícula, el radio hidrodinámico, la dispersión de la muestra y la carga eléctrica superficial. El análisis se llevó a cabo en un Zetasizer Nano-S de Malvern Instruments, con un ángulo de detección de  $\theta = 173^\circ$  y un vector de dispersión  $q = 0.0264 \text{ nm}^{-1}$ . Para los análisis se establecieron diferentes temperaturas y valores de pH para determinar el tamaño y carga bajo diferentes condiciones.

- *Radio hidrodinámico*

Las muestras diluidas se irradiaron con un láser He-Ne de 4mW a una longitud de onda de 633 nm con el objetivo de detectar las fluctuaciones que sufre la intensidad de luz por el choque con las partículas, las cuales están en constante movimiento debido al movimiento browniano. Así, relacionando las fluctuaciones de intensidad con el coeficiente de difusión traslacional y con el diámetro de partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein, se determina el promedio de radio hidrodinámico de la partícula ( $R_H$ ). Esta técnica permite estimar el tamaño de la partícula, pero el resultado está sobreestimado debido a que el  $R_H$  es el resultado de la suma del tamaño de la partícula y de la capa de iones o moléculas adheridos a ella.

Mediante esta técnica se puede determinar la temperatura crítica de transición de fase más baja en disolución (LCST) de un polímero termosensible, es decir, la temperatura a la que el polímero pasa de estar de estado colapsado a expandido y viceversa. Para ello, es necesario medir el tamaño hidrodinámico de las NPs en un rango de temperaturas que pase por ambos estados.

- *Potencial Z*

Para la medida de la carga de la superficie se coloca la muestra de NPs en una cubeta dotada con dos electrodos metálicos situados a ambos extremos de un capilar de plástico transparente. Cuando la celda capilar es sometida a un campo eléctrico, las NPs presentes se desplazan en la dirección del campo o en dirección opuesta a este, con una velocidad proporcional a su carga superficial. Mediante el

procesamiento de datos por parte del equipo, se obtiene el potencial Z de las nanopartículas, el cual depende de la carga iónica y del pH del medio. En la figura 12 se representa el diámetro real de una NP y el diámetro hidrodinámico medido, además del potencial Z de esta.

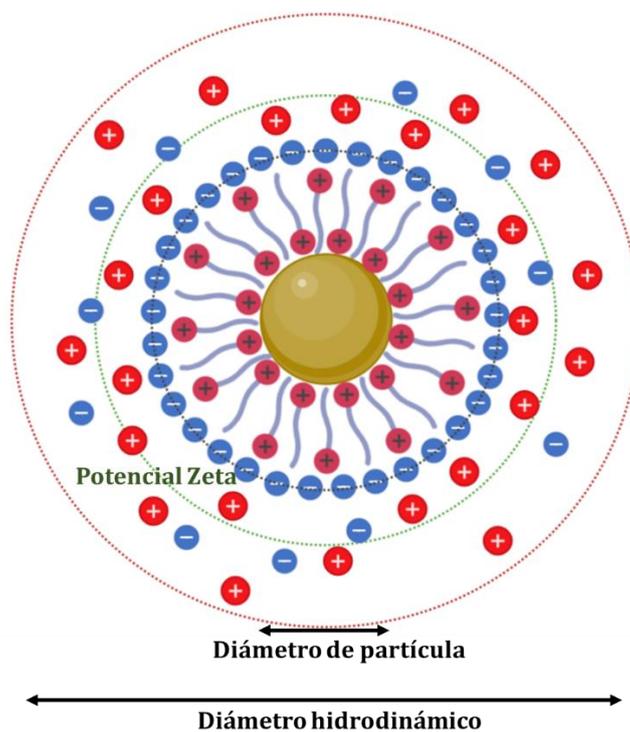


Figura 12. Representación del diámetro de partícula y el diámetro hidrodinámico para NP@CTAB.

#### 2.1.4. Liberación *in vitro*

Este estudio permite determinar el porcentaje de compuesto activo liberado en función del tiempo a diferentes temperaturas. Para ello, las NPs se sometieron a diálisis frente a tampón fosfato (PBS) a pH 7.4. Para realizar la diálisis se



utilizaron bolsas de celulosa, previamente hidratadas, en las cual se introdujo las NPs liofilizadas (3 mg) resuspendidas en PBS (10 mL). Las bolsas selladas se introdujeron en el interior de un Erlenmeyer con PBS (50 mL) y bajo agitación magnética. El ensayo se realizó a 4, 20 y 40 °C para observar la influencia de la temperatura. A tiempos de 10 min durante la primera hora, y posteriormente cada 12 h hasta las 48 h, se recogió una alícuota de 3 mL cada vez, cantidad que se repuso con PBS para mantener el mismo volumen. Las alícuotas recogidas se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis por espectroscopía UV.

### **2.1.5. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)**

Un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 fue utilizado para registrar los diferentes espectros de absorción de las suspensiones de nanopartículas. La medida fue tomada en cubetas de cuarzo de 1 cm de ancho en el rango entre 300 - 900 nm. Estas medidas permitieron monitorizar la encapsulación y liberación de compuestos activos en las NPs, así como elaborar las correspondientes rectas de calibrado. Del mismo modo, permitió determinar la presencia de plata en las NPs de sulfuro de plata gracias al análisis de los espectros de absorción.

### **2.1.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM). EDS y HAADF.**

Mediante el uso de microscopios electrónicos de transmisión se tomaron imágenes de las nanopartículas, a partir de las cuales se determinó la morfología y el tamaño



de las NPs sintetizadas en esta Tesis Doctoral. El equipo utilizado para la visualización de las NPs fue el microscopio JEM 1400 (JEOL), que opera a un voltaje de 100 kV, localizado en los Servicios Centrales de Apoyo a la de Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

Para obtener una resolución mayor, se hizo uso del equipo Talos F200X del SCAI de la Universidad de Málaga, que opera a 80 kV. Este microscopio es capaz de focalizar el haz electrónico en un único punto y barrer toda la muestra reconstruyendo la imagen píxel por píxel, lo que es conocido como microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), que permite tomar imágenes de resolución atómica.

Las muestras fueron preparadas colocando una gota de 10  $\mu$ L de NPs dispersadas, dependiendo de su naturaleza, en tolueno o agua, sobre rejillas de cobre con sustrato de carbono. Las NPs, una vez dejadas secar sobre la rejilla, fueron visualizadas para su análisis.

- *Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)*

El equipo Talos F200X cuenta con un sistema de microanálisis Super-X EDS (también abreviado como EDX), que permite analizar la composición de las nanopartículas gracias a los rayos X dispersados de la interacción del haz electrónico y la muestra. Mediante cuatro detectores de rayos X que rodean a la muestra, se analiza la energía emitida, la cual está relacionada con la masa atómica del elemento, así como el tipo de transición electrónica que lo produce, lo que permite obtener mapas de la composición de la muestra.

- **Microscopía de difracción de ángulo alto en campo oscuro (HAADF)**

Además, el equipo Talos F200X es capaz de obtener imágenes con la técnica de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) (del inglés, *High-angle annular dark-field*). Mediante esta técnica, se obtienen imágenes con una resolución atómica, que permite diferenciar impurezas dentro de un cristal diferenciado por el número atómico ( $Z$ ). En estas imágenes, los materiales que más electrones dispersan aparecen en el detector como una señal brillante sobre un fondo oscuro, debido a que el contraste de las fases va a depender del cuadrado de su masa atómica ( $Z^2$ ). Por tanto, la señal más intensa va a provenir del elemento más pesado.<sup>66</sup>

### **2.1.7. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)**

La técnica ICP-MS se realizó con el objetivo de determinar la cantidad de materia inorgánica en las NPs orgánicas. En nuestro caso, se determinó la cantidad de hierro de las MNPs, las cuales se encuentran en el interior de las nanopartículas de pNIPAM con núcleo magnético. El equipo utilizado fue el espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo NexION de Perkin-Elmer, del SCAI de la Universidad de Málaga.

### 2.1.8. Liofilización

Mediante la liofilización se consigue eliminar el agua presente en las muestras y así almacenar las NPs de manera estable. La técnica pasa por la congelación, y posterior secado por sublimación del producto final. La principal ventaja de la liofilización es que las NPs preservan las características iniciales, de manera que mantienen el tamaño inicial y, en general, no sufren agregación, pudiendo ser resuspendidas. Asimismo, la actividad farmacológica del compuesto activo incluido en ellas se mantiene inalterada.

## 2.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de hierro, y en todos se busca alcanzar la uniformidad de formas y tamaños de estas. El método elegido dependerá de las aplicaciones a las cuales van dirigidas, así como las ventajas y desventajas de cada síntesis. En todos los métodos, el proceso de síntesis tiene dos etapas diferenciadas: nucleación y crecimiento. Entre los métodos más utilizados para la preparación de MNPs se puede mencionar la coprecipitación química, la preparación de microemulsiones, la síntesis hidrotérmica y la descomposición térmica en medio orgánico.<sup>27,28</sup>

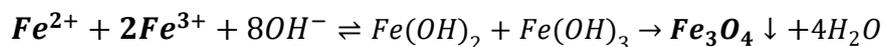


### 2.2.1. Materiales

Los reactivos utilizados fueron hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH, disolución al 25 % en metanol), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de hierro(III) hexahidratado, cloruro de hierro(II), acetilacetonato de hierro(III), ácido 10-undecenoico, dibencil éter, ácido acrílico (AA), alilamina (AL), ácido but-3-enoico (3BA) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Todos los productos fueron suministrados por Sigma-Aldrich y se emplearon sin una purificación adicional. Todos los experimentos han sido realizados con agua desionizada de grado Mili-Q (Milipore).

### 2.2.2. Coprecipitación

Se trata del método más popular para sintetizar MNPs con aplicaciones biomédicas debido a la naturaleza no tóxica de los materiales utilizados. Otras de las ventajas de esta síntesis son la simplicidad, eficiencia, bajo coste y la escalabilidad del proceso. Las MNPs obtenidas rondan los 2 - 15 nm de diámetro, pero con la desventaja de que tienen baja uniformidad, generando una amplia distribución de tamaños. El término coprecipitación hace referencia a la adición de una disolución de sal de  $Fe^{2+}$  y otra de  $Fe^{3+}$  en medio básico en una relación molar 1:2, lo que permite la nucleación y el crecimiento alrededor de estos núcleos. La reacción simplificada se muestra a continuación:





La síntesis está influenciada con condiciones experimentales como el pH, la fuerza iónica del medio, la temperatura, la velocidad de agitación, las sales utilizadas y sus porcentajes, y la velocidad de adición de estas. La dificultad del ajuste de todos estos parámetros complica la optimización del tamaño medio de partícula y el control de la polidispersidad de la muestra, lo que perjudica las propiedades magnéticas. Para superar todas estas dificultades, se ha sintetizado MNPs con diferentes modificaciones del procedimiento,<sup>67,68</sup> buscando siempre mejorar la estabilidad, tamaño y polidispersidad de la muestra.

Para la preparación de MNPs por este método, se utilizó un matraz de fondo redondo (50 mL) con tres bocas, al que se añadió TMAOH (10.5 mL de disolución al 25% p/p en MeOH) y agua (22 mL). La mezcla se agitó vigorosamente hasta alcanzar una temperatura de 70 °C en el interior del matraz. Una variación de la síntesis fue utilizar NaOH (20 mL, 0.4 M) como medio básico.<sup>69</sup> Mediante esta modificación del medio, y por tanto del pH y la fuerza iónica de este, se permite estudiar la influencia sobre la reacción, crecimiento, agregación y dispersión de las MNPs, pudiendo determinar las condiciones más óptimas para la síntesis.<sup>70</sup>

A continuación, se añadió gota a gota una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1083 mg, 4 mmol) y  $\text{FeCl}_2$  (250 mg, 1.97 mmol) en agua MilliQ (3 mL). Durante la adición, la disolución se volvió de color negro, lo que indica la formación de MNPs. Se continuó agitando durante 30 min más a la misma temperatura, y pasado este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para el eliminar el exceso de TMAOH, las nanopartículas formadas se decantaron magnéticamente usando un imán de neodimio. Este proceso se repitió tres veces. Posteriormente, se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 h, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con agua (10 mL) tres veces. La muestra de MNPs se dispersó en agua (10 mL). Para calcular el residuo seco se utilizó una alícuota de 1 mL, la cual se

dejó durante 12 h en un horno a 80 °C. Este procedimiento experimental se esquematiza en la figura 13, obteniéndose MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

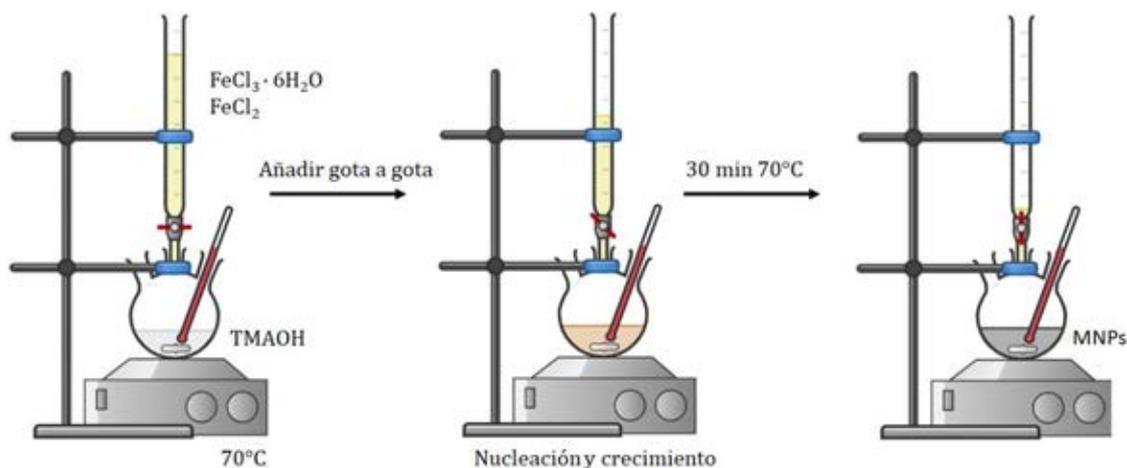


Figura 13. Esquema de síntesis MNPs por coprecipitación de  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{FeCl}_2$  en TMAOH.

### 2.2.3. Descomposición térmica

Este método de síntesis está basado en descomposición de un precursor orgánico de hierro a elevada temperatura. Se lleva a cabo en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición y en presencia de tensioactivos. La ventaja principal de este procedimiento es que se controla de forma efectiva el tamaño de las nanopartículas, y además se consigue un elevado grado de monodispersidad de la muestra. En cuanto a las desventajas del método encontramos la poca cantidad de producto generado, la mayor dificultad del procedimiento y el uso de disolventes orgánicos. Además, debido a la presencia de un recubrimiento hidrófobo en la superficie, es necesario un paso posterior de modificación



superficial para obtener nanopartículas dispersas en agua, que sean biocompatibles para usos biomédicos. La temperatura óptima para esta preparación se encuentra entre 100 °C y 350 °C, lo que genera MNPs de un tamaño de diámetro entre 4 y 30 nm. Por tanto, los factores principales a tener en cuenta en esta reacción son la temperatura y el tiempo de reacción.

Para llevar a cabo esta síntesis se mezclan en un matraz de fondo redondo (50 mL) de dos bocas, acetilacetonato de hierro (III) (0.353 g, 1 mmol) con ácido 10-undecenoico (0.688 g, 4 mmol) en dibencil éter (25 mL), empleado como disolvente. Se mantiene esta disolución durante 1 h a vacío en una línea de Schlenk. Posteriormente, se calienta en una manta calefactora hasta 200 °C, con agitación vigorosa y bajo atmósfera inerte de argón, manteniendo esta temperatura durante 2 h adicionales. Después de la etapa de estabilización a 200 °C, se calentó hasta 300 °C, temperatura de ebullición del disolvente. Se mantuvo la reacción a reflujo durante 1 h más. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió una mezcla de tolueno y acetona, con el objetivo de conseguir la precipitación de las MNPs, siendo aisladas estas bajo centrifugación durante 15 min a 9000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repite el proceso lavando con tolueno y acetona. Las MNPs obtenidas se resuspendieron en tolueno (10 mL). Este procedimiento se esquematiza en la figura 14. Se obtuvieron MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por el método de descomposición a alta temperatura.

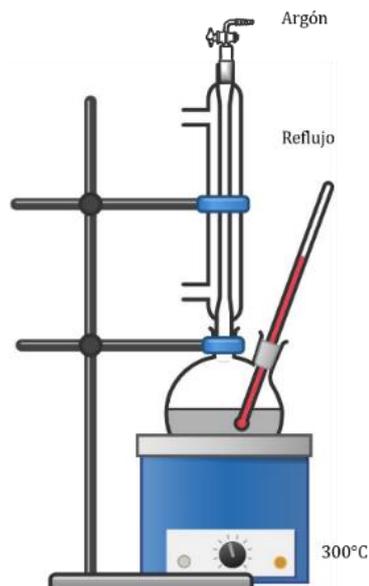


Figura 14. Montaje experimental del proceso de síntesis de MNPs por descomposición térmica en disolvente orgánico.

#### 2.2.4. Funcionalización de la superficie

La superficie de las nanopartículas de óxido de hierro puede ser modificada para favorecer la unión de polímeros o moléculas de interés, mejorar la estabilidad coloidal o para intercambio de ligandos. A continuación se desarrolla las diferentes modificaciones en la superficie realizadas.

- *Con ácido but-3-enoico. Preparación de @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA*

En un matraz redondo (250 mL) de tres bocas, se añadió ácido but-3-enoico (3BA, 9.4 mmol, 0.81 g, 0.8 mL) junto con la dispersión de MNPs (7.2 mg) en agua (100 mL) a temperatura ambiente. Para evitar la agregación de las nanopartículas, la

mezcla se sometió a sonicación intensa durante 1 h a 70 °C y, posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para mejorar la estabilidad coloidal de las MNPs, se añadió bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 200 mM, 2 mL) y se sonicó durante 5 min más. Para eliminar el exceso de reactivos, se centrifugaron durante 1 h a 8000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet se redispersó en agua (100 mL) con CTAB (5 mM, 1.25 mL). La estructura de MNPs obtenida se representa en el esquema incluido en la figura 15.

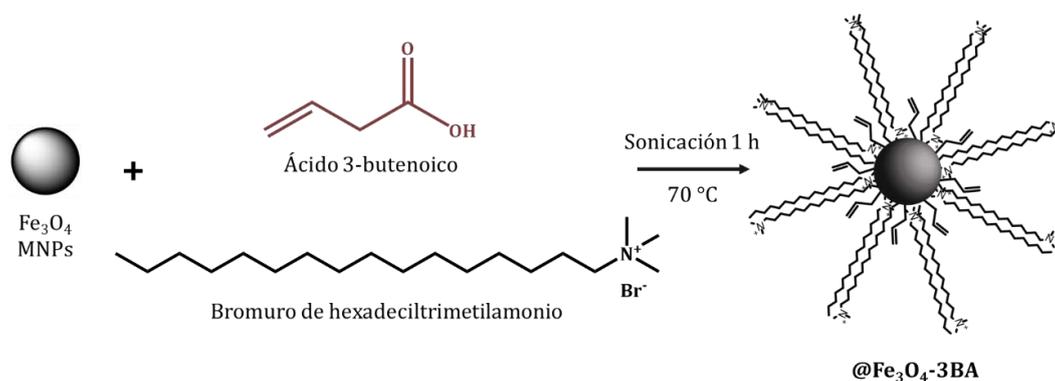


Figura 15. Nanopartícula magnética de óxido de hierro funcionalizadas con ácido but-3-enoico.

- *Con ácido acrílico. Preparación de @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA*

La modificación de la superficie con ácido acrílico (AA) se realizó siguiendo un procedimiento similar al descrito con ácido but-3-enoico. En este caso, se añadió ácido acrílico (AA, 9.4 mmol, 0.678 g, 0.645 mL) junto con la disolución de MNPs

(7.2 mg) en agua (100 mL) a temperatura ambiente. La estructura de MNPs obtenida se esquematiza en la figura 16.

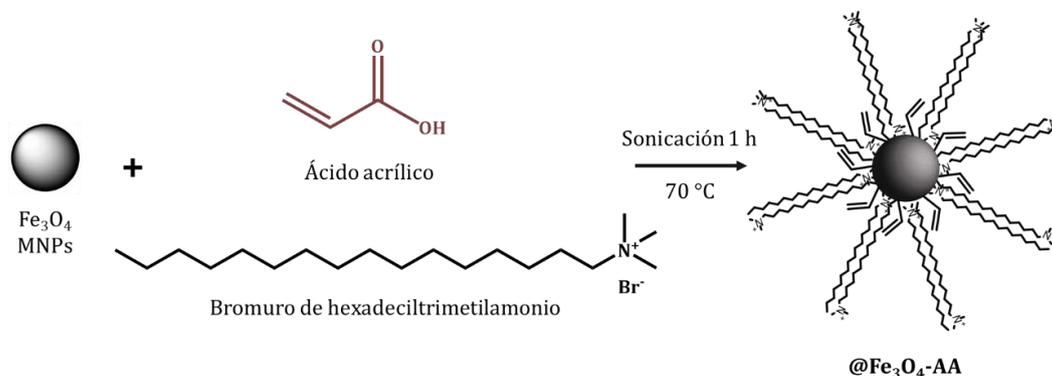


Figura 16. Nanopartícula magnética de óxido de hierro funcionalizada con ácido acrílico.

## 2.3. Síntesis de nanopartículas poliméricas

### 2.3.1. Materiales

Los materiales utilizados fueron *N*-isopropilacrilamida (NIPAM, 97 %), ácido but-3-enoico (3BA), ácido acrílico (AA), alilamina (AA), *N,N'*-metilenbisacrilamida (BIS,  $\geq 99.5\%$ ), 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (V50, 97 %), 5-fluoruracilo (5FU) y oxaliplatino (OXA). Todos los productos fueron suministrados por Sigma-Aldrich y se emplearon sin una purificación adicional. Todos los experimentos han sido realizados con agua desionizada de grado Mili-Q (Milipore).

### 2.3.2. Preparación de nanopartículas de *p*NIPAM@MZ

Para llevar a cabo la reacción de polimerización, se utilizó un matraz de fondo redondo (25 mL) de dos bocas. Como monómero se empleó *N*-isopropilacrilamida (NIPAM), y *N,N'*-metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. Se estudió la relación de monómero respecto al entrecruzante como muestra en la Tabla 1, con el objetivo de determinar las condiciones ideales para la síntesis de las NPs de *p*NIPAM@MZ. En la columna del entrecruzante BIS se muestra el porcentaje de los moles de este respecto al monómero NIPAM.

Tabla 1. Condiciones de polimerización de *p*NIPAM@MZ.

	N-isopropilacrilamida (NIPAM)			N,N'-Metilenbisacrilamida (BIS)		
	g	mmol	mM	g	mmol	%mol
1	0.113	1.0	50	0.015	0.10	10
2	0.170	1.5	75	0.023	0.15	10
3	0.226	2.0	100	0.031	0.20	10
4	0.339	3.0	150	0	0	0
5	0.339	3.0	150	0.015	0.075	2.5
6	0.339	3.0	150	0.023	0.15	5
7	0.339	3.0	150	0.032	0.21	7.5
8	0.339	3.0	150	0.046	0.30	10
9	0.453	4.0	200	0.062	0.40	10
10	0.566	5.0	250	0.077	0.50	10

Así, se mezclaron ciertas cantidades de ambos, NIPAM y BIS, según la Tabla 1, en agua (20 mL) desgasificada con argón a 70 °C y agitación magnética. Al cabo de 10 min, cuando se ha conseguido una mezcla homogénea, se añade el iniciador radicalario (2,2'-azobis(2-metilpropionamida), V50, 100 mM, 0.150 mL). A lo largo de los primeros 10 min se observa el proceso de polimerización, ya que el medio de reacción se vuelve de color blanco. Se mantiene el matraz sellado durante 2 h más en agitación a 70 °C. Después de este tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente, manteniendo la agitación magnética. Para el lavado, se recupera todo el polímero por centrifugación a 8000 rpm durante 1 h, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en H<sub>2</sub>O (20 mL). Se repite el proceso de centrifugación cuatro veces y, finalmente, se obtiene una dispersión coloidal que se almacena a 5 °C protegida de la luz. El proceso seguido se esquematiza en la figura 17, donde se incluye también la reacción que se produce.

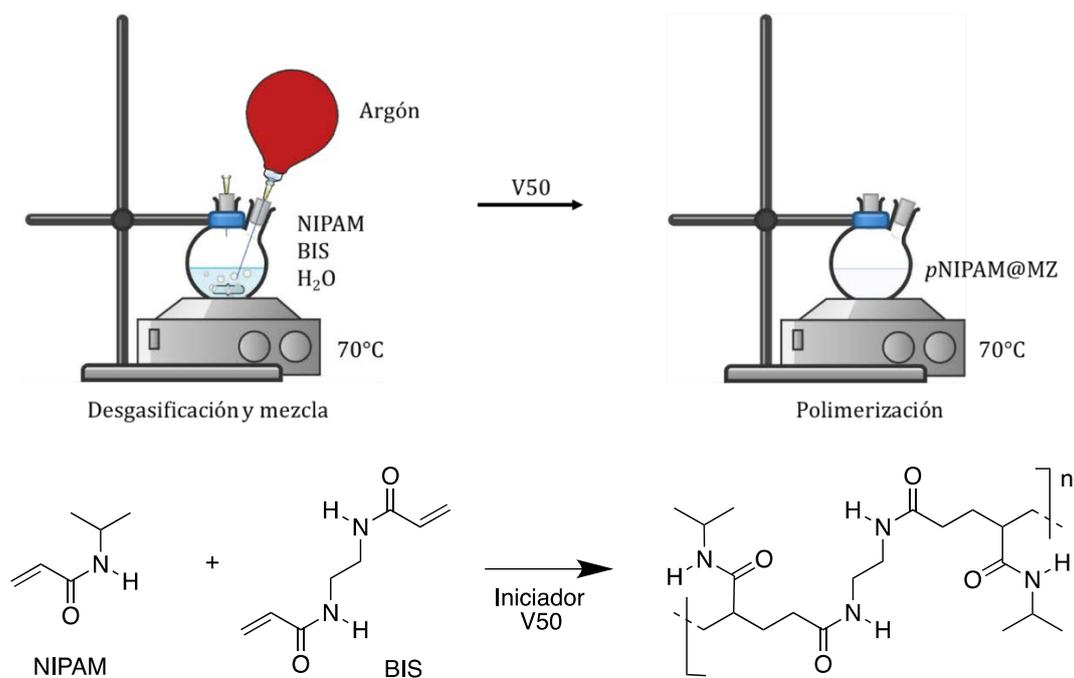


Figura 17. Esquema de preparación y reacción de polimerización radicalaria para obtener pNIPAM@MZ.

### 2.3.3. Preparación de nanopartículas copoliméricas

Además del monómero y entrecruzante utilizado para la síntesis anterior de *p*NIPAM@MZ (NIPAM y BIS), es de especial interés generar NPs copoliméricas que permita la introducción de grupos funcionales en la red, útil para reacciones posteriores. A continuación se desarrolla la síntesis de NPs copoliméricas del microgel *p*NIPAM con ácido but-3-enoico, con ácido acrílico y con alilamina.

- *Con ácido but-3-enoico. Preparación de pNIPAM-co-3BA@*

Con el objetivo de introducir grupos carboxílicos en la superficie de los microgeles de *p*NIPAM, se prepararon nanopartículas copoliméricas con ácido but-3-enoico (3BA). Se comienza preparando una disolución del monómero *N*-isopropilacrilamida (3 mmol, 0.339 g) y el entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.3 mmol, 0.046 g) en agua (20 mL). Se mezcla en un matraz de fondo redondo (25 mL) de dos bocas, y se mantiene a 70 °C bajo agitación suave y corriente de argón. A continuación, y antes de empezar la reacción de polimerización, se introduce el comonómero 3BA (0.35 mmol, 0.03 g, 0.03 mL), seguido del iniciador radicalario V50 (100 mM, 0.150 mL). Una vez terminada la reacción de polimerización, la purificación de las NPs se llevó a cabo similar a lo desarrollado en la sección 2.3.2: *Preparación de nanopartículas de pNIPAM@MZ*. El esquema de la reacción producida se muestra en la figura 18.

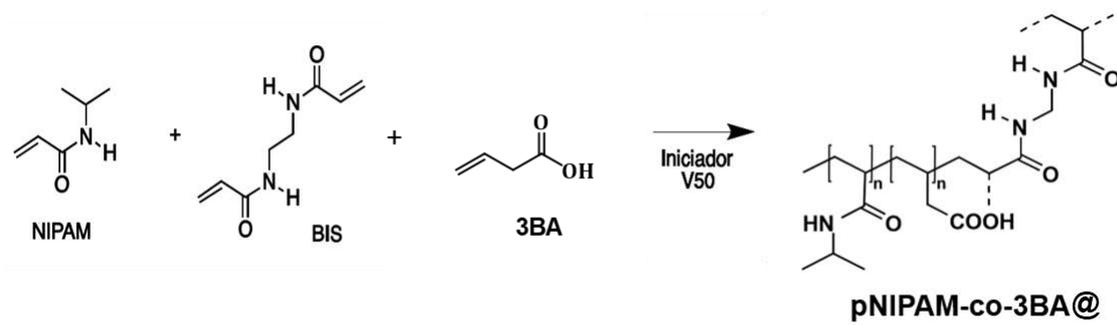


Figura 18. Funcionalización nanopartículas de pNIPAM con 3BA (pNIPAM-co-3BA@).

- Con ácido acrílico. Preparación de pNIPAM-co-AA@

Otra funcionalización con grupos carboxílicos se consigue mediante el uso del comonomero ácido acrílico (AA, 1.51 mmol, 0.021 g, 0.020 mL). La reacción de polimerización, cuya reacción se muestra en la figura 19, se lleva a cabo similar al procedimiento descrito empleando 3BA.

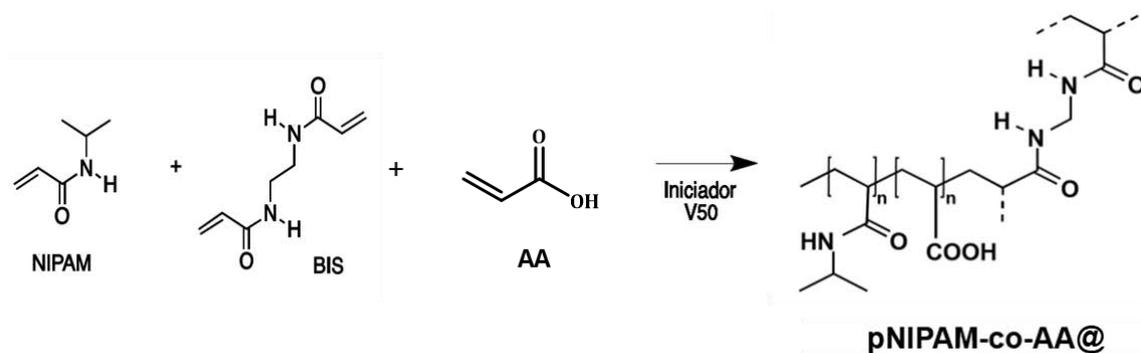


Figura 19. Funcionalización nanopartículas de pNIPAM con AA (pNIPAM-co-AA@).

- *Con alilamina. Preparación de pNIPAM-co-AL@*

Mediante la funcionalización con alilamina (AL), se consigue la introducción de grupos amina en la superficie de las NPs. El procedimiento es igual al seguido para 3BA y AA, pero añadiendo AL (50 mM, 1 mL). El esquema de la reacción producida se muestra en la figura 20.

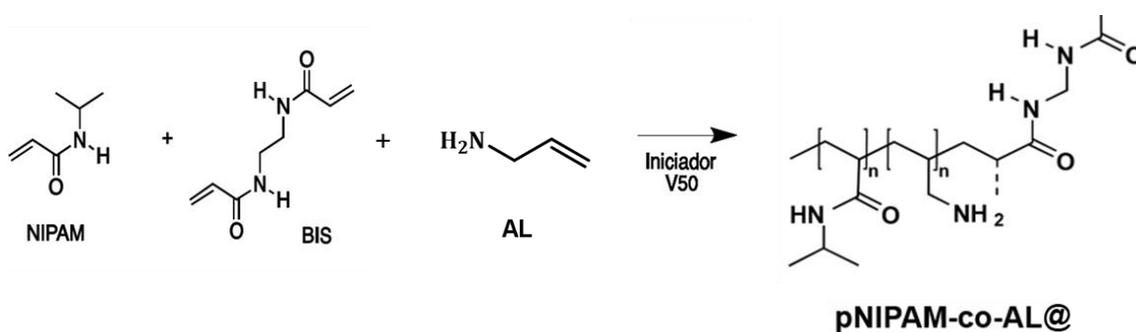


Figura 20. Funcionalización nanopartículas de pNIPAM con AL (pNIPAM-co-AL@).

#### 2.3.4. Preparación de sistemas híbridos con núcleo magnético

- *Preparación de pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA*

Para la preparación de las estructuras híbridas coloidales pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA, se utilizaron las MNPs funcionalizadas con 3BA (@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA) previamente sintetizadas y desarrolladas en la sección 2.2.4: *Funcionalización de la superficie*. Estas MNPs funcionalizadas con el grupo terminal alqueno fueron utilizadas como semilla para el crecimiento sobre ellas del polímero pNIPAM. Para lo cual, en un



matraz de fondo redondo de dos bocas (25 mL) se añadió a temperatura ambiente una mezcla del monómero *N*-isopropilacrilamida (3 mmol, 0.339 g) y el entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida (0.3 mmol, 0.046 g) junto con una dispersión del sistema @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA (20 mL) en agua (20 mL). A continuación, la mezcla se calentó a 70 °C y el líquido se desgasificó con un flujo de argón durante 10 min. La polimerización se inició añadiendo V50 (100 mM, 0.150 mL), dando prueba de ella el enturbiamiento que toma la disolución, y se dejó a esta temperatura durante 2 h más. Después de este tiempo, el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente. La purificación para eliminar los microgeles de pNIPAM libre de los sistemas híbridos pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA en los cuales no hay MNPs, se llevó a cabo mediante decantación magnética, colocando en el fondo del matraz un imán de neodimio durante 24 h. El sobrenadante, que contiene el pNIPAM libre, fue retirado y el precipitado fue redispersado en agua (20 mL). Los sistemas pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA obtenidos se almacenaron a 5 °C y protegidos de la luz. Una alícuota fue utilizada para su caracterización y otra parte se liofilizó.

- *Preparación de pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA*

En el caso de los sistemas híbridos pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, se partió de MNPs previamente sintetizadas en el apartado 2.2.4: *Funcionalización de la superficie*, y se desarrolló del mismo modo que para el sistema pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA.

- **Preparación de  $pNIPAM-co-AL@Fe_3O_4-AA$**

Con la preparación del sistema  $pNIPAM-co-AL@Fe_3O_4-AA$  se pretende incorporar un grupo amino al polímero. Este se creció sobre las nanopartículas  $@Fe_3O_4-AA$ , cuya preparación se realizó en el apartado 2.2.4: *Funcionalización de la superficie*. Para ello, se sigue el procedimiento ya descrito en los apartados anteriores, mezclando NIPAM, BIS y una dispersión de  $@Fe_3O_4-AA$  (20 mL) en agua (20 mL). A continuación, se calienta a 70 °C, se desgasifica con argón, y se inicia la polimerización con V50. En este caso, junto con el iniciador radicalario se añadió alilamina (AL, 50 mM, 1 mL), y se procedió de forma similar a los otros sistemas para la purificación y posterior almacenaje.

### **2.3.5. Marcaje fluorescente. Preparación de $pNIPAM-co-AL-FITC@Fe_3O_4-AA$**

Para evaluar la permeabilidad de los sistemas preparados mediante un ensayo *in vitro* en líneas celulares, se conjugó el marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) con el sistema híbrido  $pNIPAM-co-AL@Fe_3O_4-AA$ , el cual presenta los grupos aminos aportados por la alilamina. En un matraz de fondo redondo (10 mL) se dispersó en etanol (4.8 mL) FITC (2 mg) protegido de la luz, junto con el microgel aminoterminal liofilizado  $pNIPAM-co-AL@Fe_3O_4-AA$  (4.8 mg). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a 20 °C durante 24 h y atmósfera de argón. Pasado un día, la mezcla se centrifugó durante 40 min a 8000 rpm y, después de este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el precipitado



se lavó con agua (en 4 mL). Se volvió a centrifugar por tres veces más, y finalmente el producto se redispersó de nuevo en H<sub>2</sub>O (4 mL) obteniendo así la muestra pNIPAM-co-AL-FITC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, la cual se almacenó protegida de la luz a 5 °C. En la figura 21 se esquematiza la reacción entre el FITC y el polímero aminoterminal.

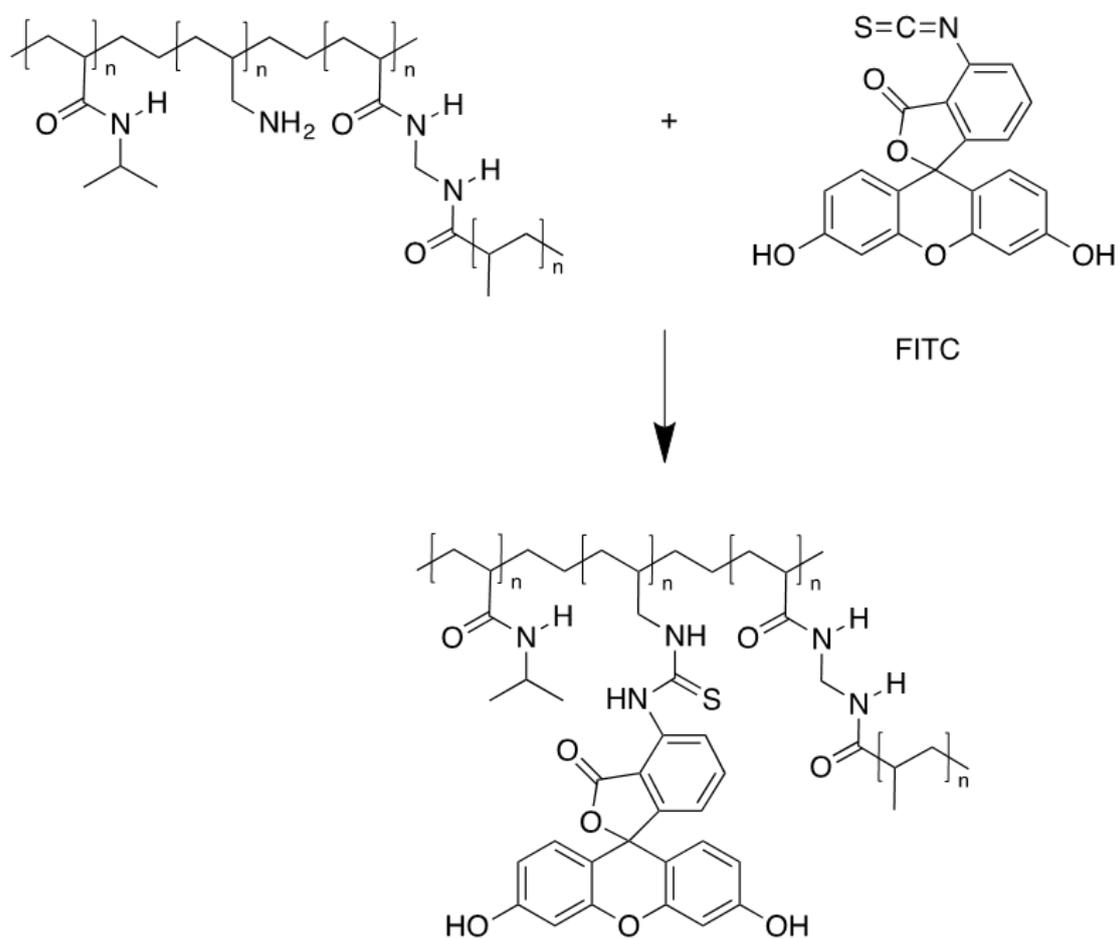


Figura 21. Esquema de la reacción de pNIPAM aminoterminal para marcaje fluorescente con FITC (pNIPAM-co-AL-FITC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA).

### 2.3.6. Encapsulación de fármacos: 5-fluorouracilo y oxaliplatino

Se utilizaron los sistemas sintetizados para la encapsulación de fármacos, en concreto,  $p\text{NIPAM@MZ}$ ,  $p\text{NIPAM@Fe}_3\text{O}_4\text{-3BA}$ ,  $p\text{NIPAM-co-AL-FITC@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}$ , y  $p\text{NIPAM-co-AL@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}$ . Para el proceso de encapsulación, se disuelve en agua (10 mL) diferentes cantidades del sistema liofilizado junto con el fármaco oxaliplatino (OXA) o 5-fluorouracilo (5FU), tal como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistemas, fármaco y cantidades utilizadas para cada encapsulación.

	Fármaco (mg)	$p\text{NIPAM}$ precursor (mg)	Sistema $p\text{NIPAM}$
1	5FU (20)	10	$p\text{NIPAM@MZ}+5\text{FU}$
2	5FU (20)	10	$p\text{NIPAM@Fe}_3\text{O}_4\text{-3BA}+5\text{FU}$
3	5FU (3)	6	$p\text{NIPAM-co-AL-FITC@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}+5\text{FU}$
4	5FU (6)	17	$p\text{NIPAM-co-AL@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}+5\text{FU}$
5	OXA (10)	10	$p\text{NIPAM@MZ}+ \text{OXA}$
6	OXA (10)	10	$p\text{NIPAM@Fe}_3\text{O}_4\text{-3BA}+ \text{OXA}$
7	OXA (10)	10	$p\text{NIPAM-co-AL@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}+ \text{OXA}$

La mezcla resultante se mantuvo en agitación magnética durante 48 h a 20 °C. Pasado este tiempo, la dispersión se centrifugó a 8000 rpm durante 1 h. El precipitado se redispersó en agua (10 mL). El sobrenadante se almacenó para determinar la eficiencia de encapsulación (EE %) de manera indirecta, es decir, cuantificando la cantidad de activo no encapsulado en el sobrenadante tras la

preparación de las nanopartículas. La cuantificación del fármaco se llevó a cabo mediante espectrometría UV y se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$EE \% = \frac{D_L - D_F}{D_F} \cdot 100$$

Siendo  $D_L$  la concentración inicial de fármaco añadido y  $D_F$  la concentración de fármaco libre después de la centrifugación.

## 2.4. Síntesis de nanopartículas de sulfuro de plata

### 2.4.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados para esta síntesis fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los reactivos necesarios fueron nitrato de plata (99 %), dietilditiocarbamato de sodio (Na(DDTC), de grado de reactivo analítico ACS), oleilamina (70 %) (OLA), 1-dodecanetiol ( $\leq 98$  %) (DDT), cloruro de zinc, ácido 11-mercaptoundecanoico (95 %) (MUA),  $\text{CHCl}_3$  (99.6 %), etanol (99.9 %), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (99 %), sal de sodio sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinamida) (98%), *O*-(2-aminoetil)-*O'*-metilpolietilenglicol (PEG-NH<sub>2</sub>, Mw= 5000 g/mol), y tabletas de disolución salina amortiguadora de fosfato (PBS) de Sigma-Aldrich. Además, se utilizaron

nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S-PEG comerciales que fueron adquiridas a NIR Optics Technology.

#### 2.4.2. Síntesis del precursor Ag(DDTC)

Para la síntesis del precursor se ha seguido el procedimiento anteriormente descrito por Yaping y col. en 2010, con algunas modificaciones.<sup>71</sup> En dos matraces Erlenmeyer se disuelve respectivamente, con ayuda de sonicación y agitación magnética, una cantidad equimolar de AgNO<sub>3</sub> (4.25 g, 0.05 mol) y Na(DDTC) (5.63 g, 0.05 mol) en H<sub>2</sub>O (200 mL cada uno). Una vez disueltos, se goteó la disolución de AgNO<sub>3</sub> sobre la disolución de Na(DDTC) mediante un embudo de adición. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y protegida de la luz, y se mantuvo durante 12 h con agitación vigorosa. Pasado este periodo, el precipitado amarillento obtenido se filtró mediante un embudo Büchner y se lavó varias veces con H<sub>2</sub>O. El sólido resultante se secó durante 4 h a 60 °C a vacío, y se almacenó protegido de la luz y humedad. Una porción de muestra fue utilizada para su análisis. En la figura 22, incluida a continuación, se esquematiza el procedimiento de síntesis y la reacción que se produce.

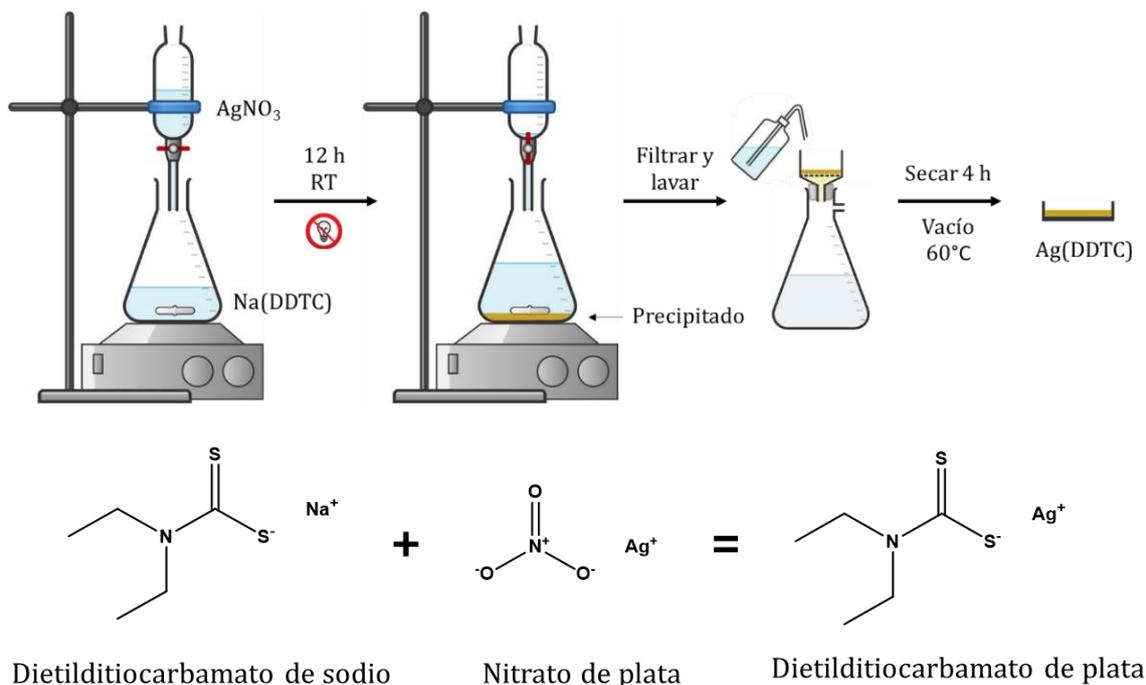


Figura 22. Esquema de la síntesis del precursor Ag(DDTC).

### 2.4.3. Síntesis de nanopartículas Ag<sub>2</sub>S/Ag

La síntesis se realizó por el método de descomposición térmica en medio orgánico. Para lo cual, en un matraz de fondo redondo de dos bocas (25 mL) se introduce Ag(DDTC) (25 mg, 0.1 mmol) a temperatura ambiente, junto con una mezcla de los disolventes oleilamina (OLA) y 1-dodecanetiol (DDT), en un volumen final total de 5 mL.

En este estudio se ha investigado la relación de disolventes OLA/DDT óptima para la síntesis de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S/Ag que proporcionen las mejores propiedades de fluorescencia. Esta relación OLA/DDT se muestra en la Tabla 3,

y está ordenada según la fracción molar del disolvente ( $\mathcal{X}_{DTT}$ ) usada en cada síntesis, donde:

$$\mathcal{X}_{DTT} = [n_{DTT} / (n_{DTT} + n_{OLA})]$$

Tabla 3. Mezcla de disolventes utilizados en cada síntesis.

Nombre síntesis	Fracción molar del disolvente ( $\mathcal{X}_{DTT}$ )	DDT mmol	OLA mmol
A	0	0.0	15.2
B	0.15	2.4	13.7
C	0.3	5.2	11.4
D	0.60	10.4	7.6
E	0.9	18.8	1.5
F	1	20.9	0

Una vez introducidos todos los reactivos en el matraz, se somete a vacío durante 10 min para eliminar el aire con una bomba de alto vacío y agitación magnética suave. A continuación, el matraz se sumerge en un baño de aceite precalentado a 190 °C, observándose un cambio de color en el disolvente, lo que indica la nucleación y crecimiento de las NPs. La velocidad de calentamiento de la reacción fue de 20 °C/min y, una vez alcanzados los 190 °C en el interior del matraz, se mantiene esta temperatura durante 1 h. Pasado este tiempo, el matraz se deja enfriar a temperatura ambiente y, posteriormente, se precipitan mediante la adición de etanol (10 mL), que reduce la estabilidad coloidal de las NPs. Para eliminar el exceso de reactivos, las NPs precipitadas en etanol se centrifugan a 10000 rpm durante 10 min, y se elimina el sobrenadante. Este proceso de limpieza se repite dos veces más. Finalmente, el precipitado que contiene las NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag se dispersa en cloroformo (10 mL), y se almacena a 5 °C protegido de la

luz. En la figura 23 se esquematiza el proceso de síntesis de las nanopartículas de sulfuro de plata denominadas  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  y la reacción producida.

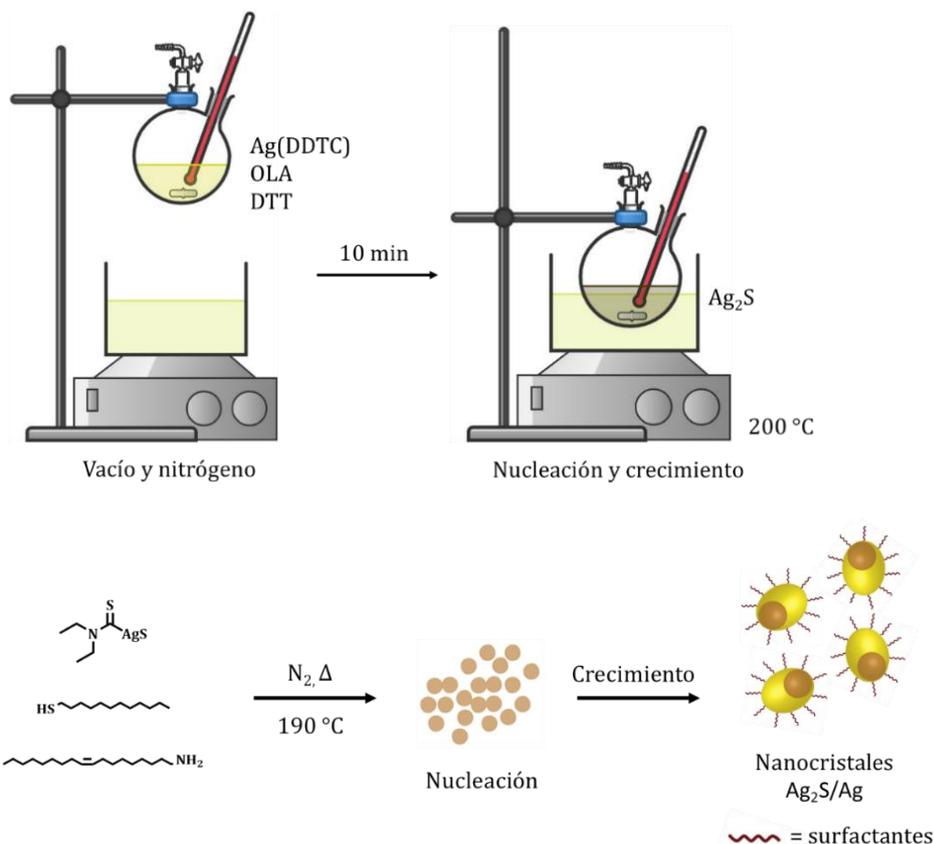


Figura 23. Esquema síntesis nanopartículas de sulfuro de plata.

#### 2.4.4. Transferencia a medio acuoso mediante ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA)

Con el objetivo de obtener NPs estables coloidalmente en agua, es necesario aportar hidrofiliicidad a la superficie de las NPs sintetizadas. Para ello, se trataron con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), molécula capaz de desplazar los

ligandos hidrófobos unidos a la superficie de las NPs mediante el grupo tiol (-SH) e introducir grupos carboxílicos superficiales. Para lo cual, se procedió añadiendo MUA (20 mg, 0.1 mmol) a un Eppendorf con 1 mL de dispersión de 1 mg/mL de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  en cloroformo a temperatura ambiente. Después de esto, la mezcla se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 10 min, favoreciendo la pérdida de la estabilidad coloidal y precipitando las NPs al fondo del Eppendorf. Esta mezcla se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el precipitado se redispersó en PBS (1 mL) a pH 7.4. Se obtiene así, gracias al intercambio de ligandos, NPs estables en agua ( $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ -MUA). En la figura 24 se representa el recubrimiento de la superficie con MUA de las NPs sintetizadas.

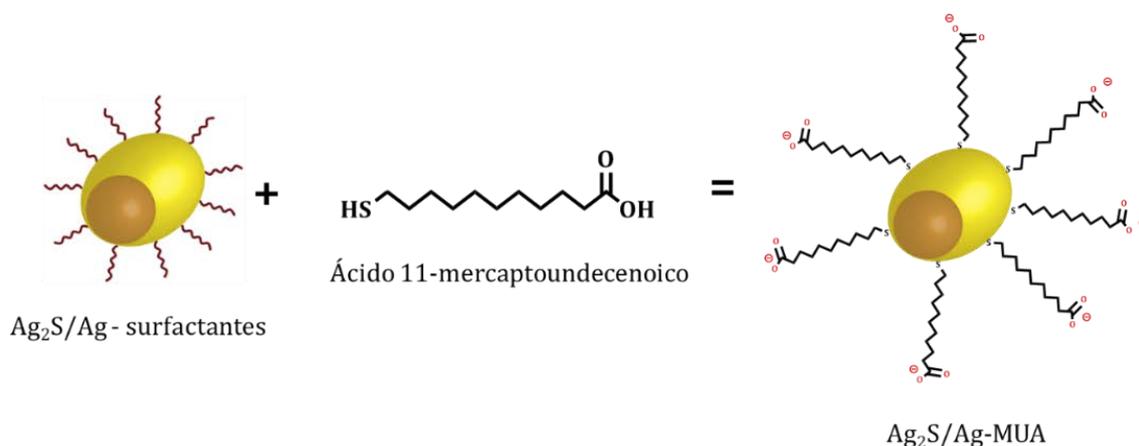


Figura 24. Funcionalización superficial  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  mediante intercambio de ligandos con MUA para obtener nanopartículas solubles en agua ( $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ -MUA).

### 2.4.5. Funcionalización de la superficie con polietilenglicol (PEG)

Se partieron de las NPs preparadas anteriormente en el apartado 2.4.4: *Transferencia a medio acuoso mediante ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA)* ( $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag-MUA}$ ), las cuales se funcionalizaron en la superficie con polietilenglicol (PEG).

Para la formación del conjugado PEG-NH<sub>2</sub> con  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag-MUA}$  se empleó el método de carbodiimida de acoplamiento mediante EDC/NHS en un único paso, estableciendo una unión covalente tipo amida entre ambos. Esta reacción implica la activación mediante EDC de los grupos carboxilos del MUA unido a las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ , formando el intermedio inestable, seguido de la activación de la amina reactiva mediante sulfo-NHS, y finalmente la unión mediante el enlace covalente con PEG-NH<sub>2</sub> (figura 24).

Para hacer esto, se procedió disolviendo EDC (0.5 mg) y sulfo-NHS (0.7 mg) en PBS (1 mL) que contenía 1 mg de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag-MUA}$  junto con 1 mg de PEG-NH<sub>2</sub>. La mezcla se mantuvo en continua agitación vigorosa durante 2 h, y después de este periodo, se recuperaron por centrifugación a 12000 rpm durante 2 h, eliminando el sobrenadante, que contiene el exceso de reactivos. Se repitió este procedimiento tres veces, y las NPs resultantes se dispersaron en PBS (1 mL) a pH 7.4. Finalmente, las NPs se almacenaron a 4 °C para futuros análisis, y la muestra fue etiquetada con el nombre  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag-MUA-PEG}$ . En la figura 25 se esquematiza el proceso de PEGilación mediante el método de carbodiimida.



#### 2.4.7. Síntesis del precursor $\text{Zn(DDTC)}_2$

Para la síntesis del precursor de dietilditiocarbamato de zinc ( $\text{Zn(DDTC)}_2$ ) se siguió un proceso similar al desarrollado en el apartado 2.4.2: *Síntesis del precursor  $\text{Ag(DDTC)}$* . En dos matraces Erlenmeyer (500 mL), se disuelve respectivamente, con ayuda de sonicación y agitación magnética,  $\text{ZnCl}_2$  (1.3628 g, 0.1 mol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) y  $\text{Na(DDTC)}$  (4.5062 g, 0.05 mol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL). Una vez disueltos, se goteó la disolución de  $\text{ZnCl}_2$  sobre la disolución de  $\text{Na(DDTC)}$  mediante un embudo de adición, y para la limpieza y posterior recuperación del producto se procedió conforme al protocolo previamente detallado en el apartado 2.4.2: *Síntesis del precursor  $\text{Ag(DDTC)}$* .

#### 2.4.8. Síntesis de nanopartículas $\text{Ag}_2\text{S/Ag@ZnS}$

En un matraz de fondo redondo (25 mL) de dos bocas, se añadió OLA (10.6 mmol, 3.5 mL) y se calentó en un baño de aceite a 210 °C. Se mantuvo a esta temperatura durante 10 min, aplicando vacío con una bomba de alto vacío, y posteriormente se cerró y se dejó en atmósfera de nitrógeno. Por otro lado, se disolvió en un Eppendorf a temperatura ambiente  $\text{Zn(DDTC)}_2$  (0.3 mmol, 10.8 mg) en OLA (4 mmol, 1.5 mL). La mezcla formada se recuperó en una jeringa y se introdujo lentamente en el interior del matraz a 210 °C. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min más. Las NPs se precipitaron con etanol y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces. Finalmente, el precipitado se dispersó en cloroformo (10 mL) y se

almacenó para su posterior análisis. En la figura 26 se esquematiza el proceso de síntesis mediante inyección del precursor sobre el disolvente a alta temperatura. La muestra obtenida se denominó  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$ .

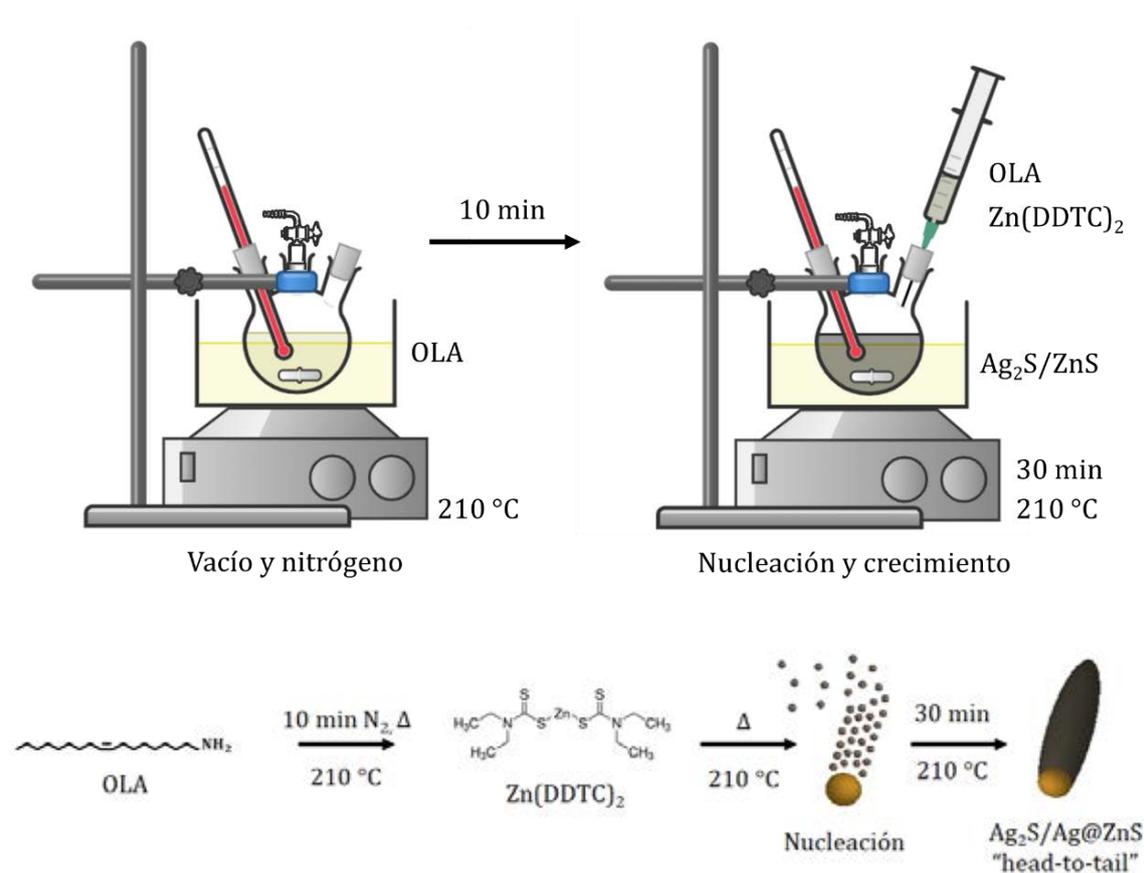


Figura 26. Esquema de síntesis de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$  mediante inyección del precursor  $\text{Zn}(\text{DDTC})_2$  sobre el disolvente OLA a altas temperaturas.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Parte teórica*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## *Capítulo I*

# *Nanopartículas poliméricas con núcleos magnéticos para el transporte y la liberación controlada de fármacos*



## I.1. Antecedentes

Desde hace varias décadas existe un gran interés en la síntesis de micro y nanoesferas poliméricas. Algunas de estas son capaces de cambiar sus propiedades coloidales y fisicoquímicas en respuesta a estímulos externos como pH, temperatura, campos magnéticos, fuerza iónica, etc... Debido a sus características de biodegradabilidad, flexibilidad en la propiedades químicas, tamaño, morfología y funcionalización de la superficie, estos sistemas coloidales tienen multitud de aplicaciones biomédicas, tales como liberación controlada de fármacos, reconocimiento específico molecular, fabricación de biosensores, separación por afinidad e inmovilización celular y enzimática.<sup>72</sup> Entre las principales nanopartículas poliméricas biodegradables figuran las fabricadas a partir de poliésteres, poliaminoésteres, poliamidas, quitosano, poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA) o policaprolactona (PCL), entre otras.<sup>2,73</sup> De manera más específica, estos polímeros han mejorado las aplicaciones biomédicas cuando se han unido a partículas magnéticas. Por ejemplo, los investigadores Zare y col., estudiaron sistemas híbridos de PLGA con MNPs,<sup>74</sup> o más recientemente, los investigadores Hosseini y col. fabricaron un sistema compuesto de PLA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y nanotubos de carbono para el transporte y la liberación de daunorrubicina en células cancerosas de leucemia mieloide aguda.<sup>75</sup>

Las micro y nanoesferas basadas en poli(*N*-isopropilacrilamida) (*p*NIPAM) se han convertido en uno de los sistemas coloidales más estudiadas desde que, en 1986, Pelton y Chibante describieran por primera vez su síntesis.<sup>76</sup> *p*NIPAM es un polímero que forma microgeles coloidales compuestos tanto de grupos amida (-CONH-), de naturaleza hidrófila, como de cadenas laterales isopropilo

(-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), que son hidrófobas. Una de las características más importantes de este polímero es que responde a la temperatura, presentando una temperatura crítica de transición más baja (LCST, lower critical solution temperature) de 32 °C en agua, cercana a la temperatura corporal ~37 °C.<sup>77</sup> Esto significa que el microgel sufre una transición de fase reversible de volumen, o simplemente denominada transición de fase. Por debajo de la LCST, el microgel se expande debido a la incorporación de las moléculas de disolvente, por ejemplo agua, formando puentes de hidrógeno entre el agua y los grupos acrilamida (estado expandido). Por encima de la LCST, las moléculas de agua son expulsadas por la rotura de los enlaces de hidrógeno, lo que hace que el microgel se colapse al predominar las interacciones hidrófobas de los grupos metileno (estado colapsado).<sup>43,78</sup> En la figura 27 se muestra las cadenas hidrófilas e hidrófobas del NIPAM, y el comportamiento del polímero cuando se supera o se está por debajo de la LCST.

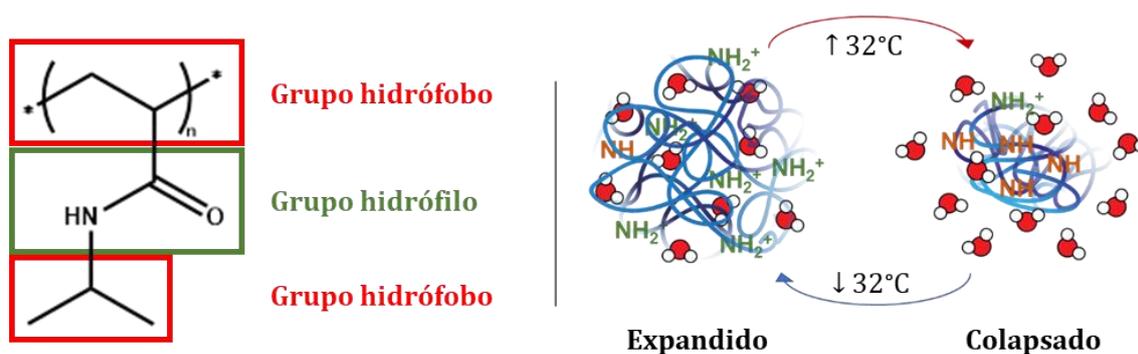


Figura 27. Estructura química de pNIPAM con los grupos hidrófobos marcados en rojo y los grupos hidrófilos en verde (izquierda). Transición de fase entre el polímero hidratado y deshidratado (derecha).

Esta propiedad de hinchamiento-deshinchamiento puede aprovecharse en la fabricación de sistemas para la incorporación, transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas. En concreto, estos sistemas han sido estudiados para la incorporación de agentes antitumorales como 5-fluoruracilo (5FU) y oxaliplatino (OXA), dos de los fármacos más utilizados en quimioterapia. A continuación, se exponen ejemplos concretos del uso de microgeles de *p*NIPAM para la liberación controlada de fármacos y, en concreto la oncoterapia con el fármaco FU. El grupo de Rejinold y col. han desarrollado nanogeles de *p*NIPAM con fibrinógeno en los cuales encapsularon 5FU, obteniendo una mayor apoptosis de las células tumorales de cáncer de mama. Esto es debido a que por encima de la LCST, el sistema de liberación del fármaco desencadena la apoptosis de las células de cáncer de mama en comparación con la dosis equivalente del fármaco libre, por una mayor captación del fármaco.<sup>44</sup> El grupo de Wen y col. sintetizaron partículas de *p*NIPAM en las que encapsularon 5FU y clorhidrato de metformina, presentando un sistema con alta capacidad de carga y liberación controlada.<sup>79</sup> También se han desarrollado sistemas híbridos de *p*NIPAM unido a un silsesquioxano poliédrico oligomérico (MAPOSS) con poli(etilenglicol) para controlar el tamaño de poro, e incorporaron 5FU para el posterior análisis de su liberación,<sup>80</sup> como se muestra en la figura 28.

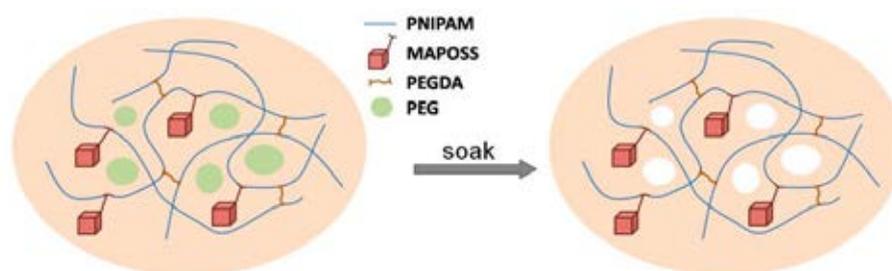


Figura 28. Esquema de la preparación de los hidrogel híbridos *p*NIPAM-MAPOSS.<sup>80</sup>

En relación al fármaco anticancerígeno oxaliplatino; Patil y col. estudiaron polímeros biodegradables de *p*NIPAM con quitosano cargados con OXA,<sup>81</sup> y Peng y col. ensayaron nanogeles, sensibles a pH y temperatura, de polímero de *p*NIPAM combinado con grupos metacrilato, para la liberación de OXA.<sup>82</sup>

Por otra parte, el marcaje del polímero mediante FITC permite monitorizar la incorporación celular de los microgeles en el interior celular. De esta manera, los investigadores Quan y col. conjugaron el tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico (RGD) junto a transferrina a nanogeles de *p*NIPAM con ácido acrílico. Marcaron este sistema con FITC y añadieron como fármaco doxorubicina, de manera que visualizaron la incorporación celular por endocitosis en células tumorales HeLa.<sup>83,84</sup> En la figura 29 se ilustra el proceso de internalización celular del fármaco.

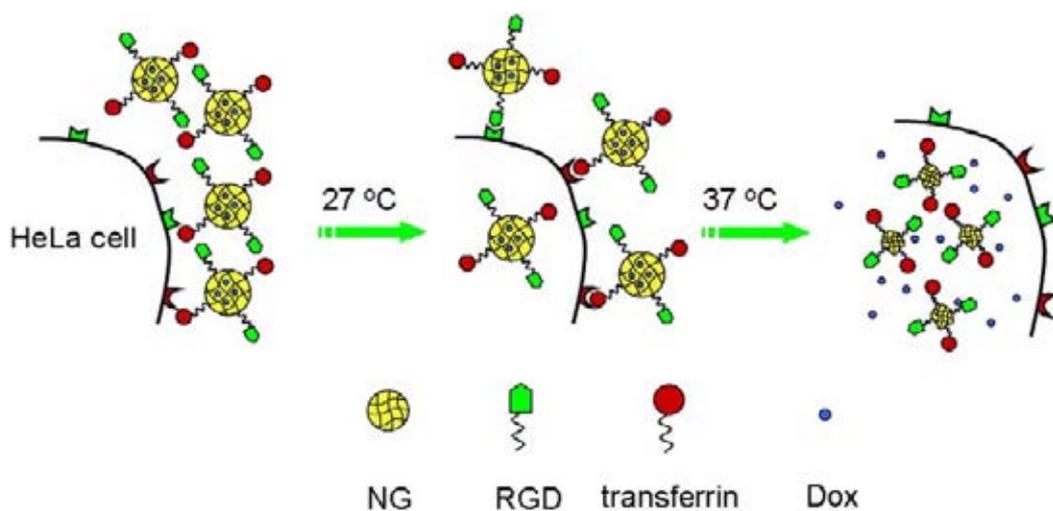


Figura 29. Ilustración del esquema del proceso de internalización celular de los nanogeles por las células HeLa.<sup>84</sup>

A pesar de las características tan favorables para las aplicaciones biomédicas anteriormente mencionadas, los microgeles de *p*NIPAM muestran algunas desventajas, como son la baja biodegradabilidad, la poca resistencia mecánica, la relativamente baja capacidad de carga de fármaco y una liberación poco controlada.<sup>85</sup> Para superar estos inconvenientes, la síntesis de microgeles de *p*NIPAM se lleva a cabo mediante hibridación con otros sistemas coloidales como partículas inorgánicas u otros polímeros. En concreto, la unión a nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, principalmente de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), se ha utilizado en los últimos años en biomedicina para la purificación de biomoléculas, diagnóstico mediante imagen por resonancia magnética (MRI), hipertermia y para la liberación de fármacos o genes.<sup>32</sup> La ventaja de los sistemas de repuesta magnética es que, mediante la aplicación de un campo magnético alterno, se consigue aumentar la temperatura, lo que permite controlar el comportamiento del polímero termosensible. Adicionalmente, la hipertermia generada por la excitación magnética se utiliza para reducir considerablemente el tamaño de los tumores. Por otra parte, mediante la aplicación de un campo magnético es posible guiar los sistemas magnéticos, permitiendo su acumulación en una zona concreta e incrementar así la liberación del fármaco.<sup>86,87</sup> En la siguiente figura 30 se muestra cómo actúa el campo magnético sobre los sistemas híbridos compuestos de *p*NIPAM y nanopartículas magnéticas, acumulando y aumentando la temperatura en la zona.

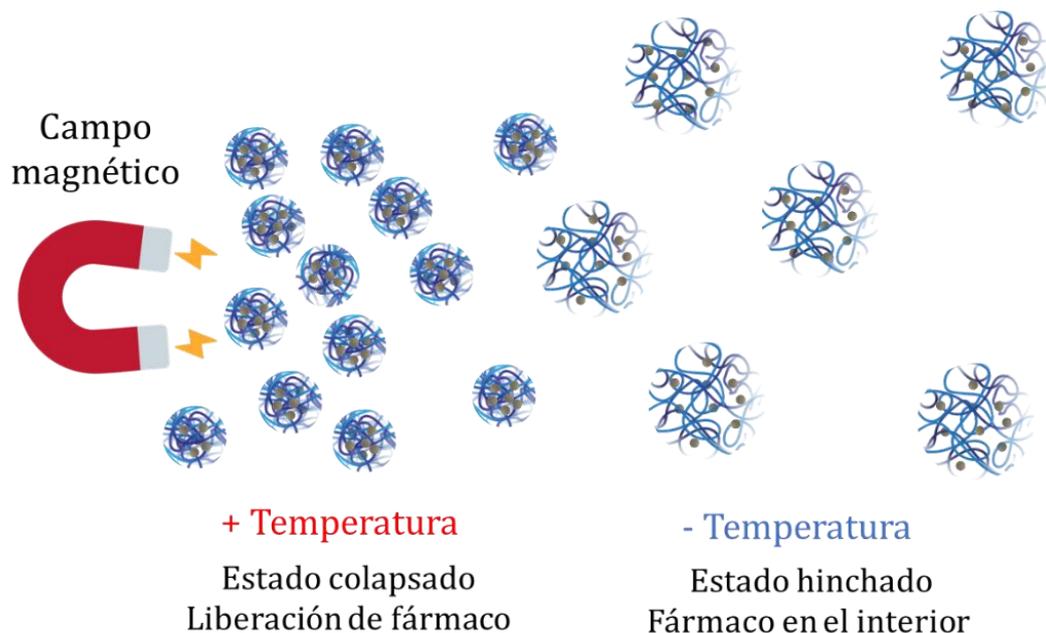


Figura 30. Efecto del campo magnético sobre las nanopartículas híbridas de pNIPAM con MNPs en la liberación controlada de fármacos.

La fabricación de sistemas híbridos entre MNPs y polímeros termosensibles se ha utilizado en multitud de investigaciones con aplicaciones teranósticas, y para la liberación controlada de fármacos. Por ejemplo, el grupo de Massoumi y col. ha formulado nanopartículas poliméricas de pNIPAM con el copolímero ácido itacónico y PEG, a las cuales se les une  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en su superficie, mostrando su potencial aplicación teranóstica.<sup>88</sup> Los investigadores del grupo de Shen también sintetizaron un sistema híbrido termosensible de pNIPAM con nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . A este sistema se le incorporó el fármaco 5FU y se estudió su liberación. La carga de dicho fármaco se mejoró mediante la generación de canales de sílica mesoporosa ( $\text{SiO}_2$ ), además del recubrimiento de la superficie con quitosano (CHI) y rodamina (R6G).<sup>89</sup> En la figura 31 se esquematiza el sistema multirrespuesta desarrollado por estos investigadores.

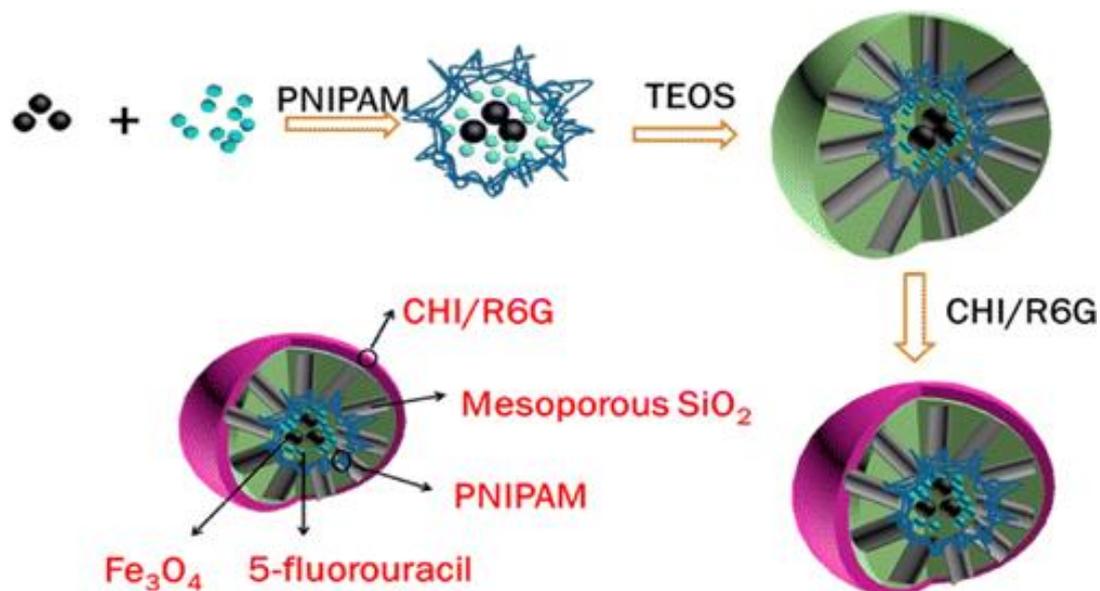


Figura 31. Ilustración del proceso de preparación de los sistemas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{pNIPAM}/5\text{FU}@m\text{SiO}_2\text{-CHI/R6G}$ .<sup>89</sup>

Otros investigadores como Kim y col. han creado sistemas híbridos de pNIPAM con MNPs, y han funcionalizado la superficie del sistema con ácido fólico, aumentando así la especificidad en la liberación del fármaco.<sup>90</sup>

En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado la síntesis de sistemas híbridos del polímero pNIPAM marcado con FITC y con núcleo magnético de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , en los que se ha encapsulado para su vehiculización y liberación guiada dos fármacos quimioterapéuticos, oxaliplatino y 5-fluoruracilo. A continuación, se describe con detalle los resultados obtenidos.



## I.2. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido publicados en un artículo de alto impacto titulado “Magnetically active *p*NIPAM nanosystems as temperature-sensitive biocompatible structures for controlled drug delivery” en la revista *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* en el año 2020.<sup>41</sup>

## I.3. Nanopartículas magnéticas (MNPs)

### I.3.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ )

Las nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se sintetizaron para combinarse con el polímero *p*NIPAM, con el principal objetivo de obtener nanopartículas híbridas metalorgánicas, formadas por componentes orgánicos e inorgánicos. De esta manera se establece una relación simbiótica en la que los microgeles aportan estabilidad coloidal y de atrapamiento, así como características de respuesta a los estímulos tales como temperatura; mientras que los componentes inorgánicos proporcionan propiedades cuánticas como la fotoluminiscencia, la resonancia plasmónica superficial o el magnetismo. En concreto, en este apartado se detallan los resultados de la síntesis de nanopartículas híbridas en las que el polímero es *p*NIPAM, que aporta respuesta a la temperatura, y el componente inorgánico es  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que proporciona propiedades magnéticas. Por tanto, para la formación de

estas estructuras híbridas se comenzó por la síntesis del núcleo magnético, descrito a continuación.

En esta Tesis Doctoral, el método usado para la síntesis de nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ ) ha sido el de coprecipitación en agua, utilizando TMAOH al 25% (en agua o metanol) o NaOH como bases. Este método, desarrollado por Massart en 1981,<sup>91</sup> se basa en la mezcla de iones férrico y ferroso en una proporción molar 2:1 (Fe(III): Fe(II)) en medio básico.

Mediante este método, el tamaño y forma de las MNPs obtenidas depende de diferentes parámetros, como: el tipo de sal empleada (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la proporción de iones férrico y ferroso, los valores del pH, la temperatura de reacción, la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de adición de la disolución básica y la velocidad de agitación. Asimismo, la síntesis en una baja concentración de oxígeno es favorable para prevenir la oxidación de las MNPs y la pérdida de las propiedades magnéticas, por lo que se mantuvo en atmósfera inerte mediante argón.<sup>91</sup>

La principal ventaja de la aproximación de Massart es que las muestras obtenidas son hidrófilas y, por lo tanto, estables en medio acuoso. Se trata de un método rápido, que destaca por la facilidad, la reproducibilidad y el alto rendimiento. Sin embargo, la principal desventaja viene dada por el hecho de que, para obtener una distribución de tamaño estrecha de las MNPs resultantes, deben constatararse de manera estricta algunos parámetros de la reacción.

Para todas las MNPs preparadas, la cantidad de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se determinó midiendo el peso del residuo seco, de manera que se tomó una alícuota de 1 mL y se secó en el horno a 80 °C para evaporar el disolvente. Los resultados muestran la presencia de magnetita en 7.2 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en cada mL de la disolución cuando la síntesis se

realizó con TMAOH en metanol, y 8.66 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en cada mL cuando se utilizó TMAOH en agua. Sin embargo, cuando se añadió NaOH como base para la preparación de partículas, el residuo seco fue solo de 4 mg/mL. Por lo tanto, se obtiene un mayor de rendimiento en la síntesis cuando se utilizó TMAOH en agua, ya que se obtiene mayor cantidad de residuo seco o sólido correspondiente a las MNPs, al compararlo con los otros reactivos utilizados bajo las mismas condiciones de síntesis.

Estos resultados confirman un proceso de síntesis más efectivo cuando se realiza la coprecipitación utilizando como base TMAOH en agua. En la figura 32 se muestra la imagen TEM de las MNPs obtenidas por el método de coprecipitación con TMAOH en agua.

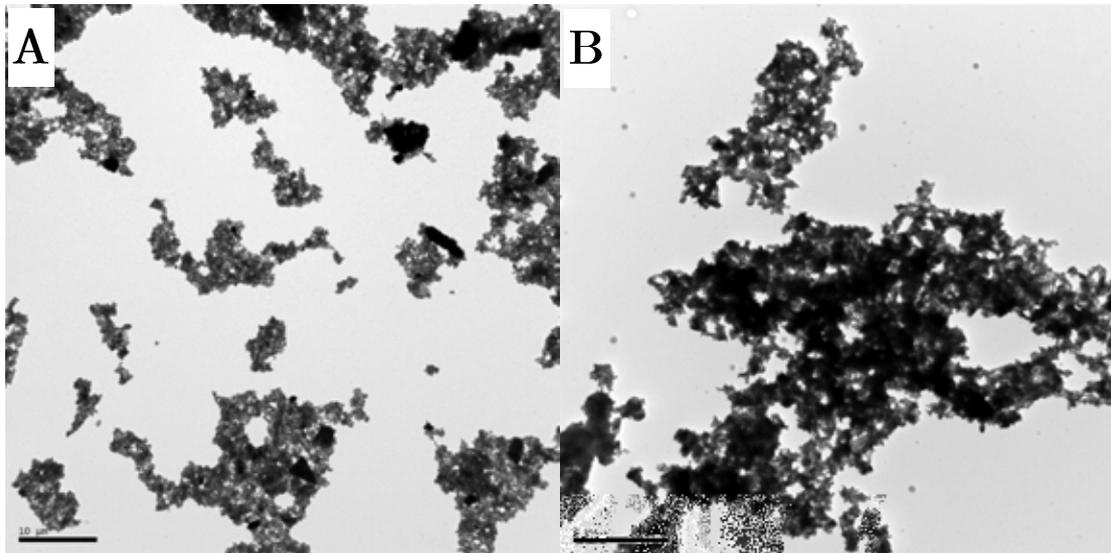


Figura 32. A) Nanopartículas magnéticas sintetizadas por coprecipitación utilizando como base TMAOH en agua. B) Ampliación de una zona.



### I.3.2. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Las MNPs de magnetita muestran algunas desventajas, como la rápida aglomeración, la alta reactividad, la alta energía superficial y la facilidad de oxidación; lo que puede alterar su biocompatibilidad, sus propiedades y su rendimiento. En suspensiones acuosas, la magnetita se agrega fácilmente debido a una combinación de fuerzas de Van der Waals y magnéticas. La formación de agregados puede afectar a la reactividad de estas debido a la pérdida de la actividad específica de una nanopartícula individual. La formación de agregados puede ser irreversible o reversible, pudiéndose romper estos últimos mediante sonicación u otros procesos de mezcla.<sup>70</sup>

Para prevenir estos eventos no deseados, se realizó la funcionalización superficial, es decir, una modificación de la química de la superficie, que conduce a cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas, y evita que se aglutinen de forma irreversible.

La afinidad entre el polímero y las MNPs depende en gran medida de la superficie de las MNPs y de la cabeza del grupo funcional que actúa como ligando. El núcleo de MNPs se eligió por sus propiedades magnéticas, pero presenta una superficie incompatible con la funcionalidad química del polímero deseado. Para superar esto, la superficie puede revestirse con una fina capa de material por la que el ligando tiene una gran afinidad.<sup>29</sup>

Para poder conseguir el recubrimiento de las MNPs con el polímero *p*NIPAM, se incorporó un doble enlace terminal en la superficie mediante el tratamiento de las MNPs con ácido acrílico o ácido but-3-enoico (Figura 33). Mediante este recubrimiento se impide la oxidación de la superficie de las MNPs y se permite el

crecimiento del polímero de pNIPAM dejando el núcleo magnético en el interior de la partícula polimérica.<sup>67,68,92</sup> Este proceso se llevó a cabo bajo calentamiento y sonicación para evitar la agregación de estas.

Es importante señalar que este paso de funcionalización solo afecta ligeramente al tamaño de las partículas, las mediciones del DLS de los clústeres de MNPs de magnetita funcionalizadas con ácido 3BA mostraron un diámetro de  $144.3\text{nm} \pm 7.9$ , mientras que las MNPs modificadas con AA presentaron un diámetro más pequeño pero similar ( $140.3\text{ nm} \pm 8.0$ ). Este tamaño de partícula concuerda con los previamente publicados por Laurenti y col.,<sup>67</sup> donde el tamaño de los clústeres de magnetita en las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  disminuyó con la cantidad de 3BA añadida durante la funcionalización de las partículas.

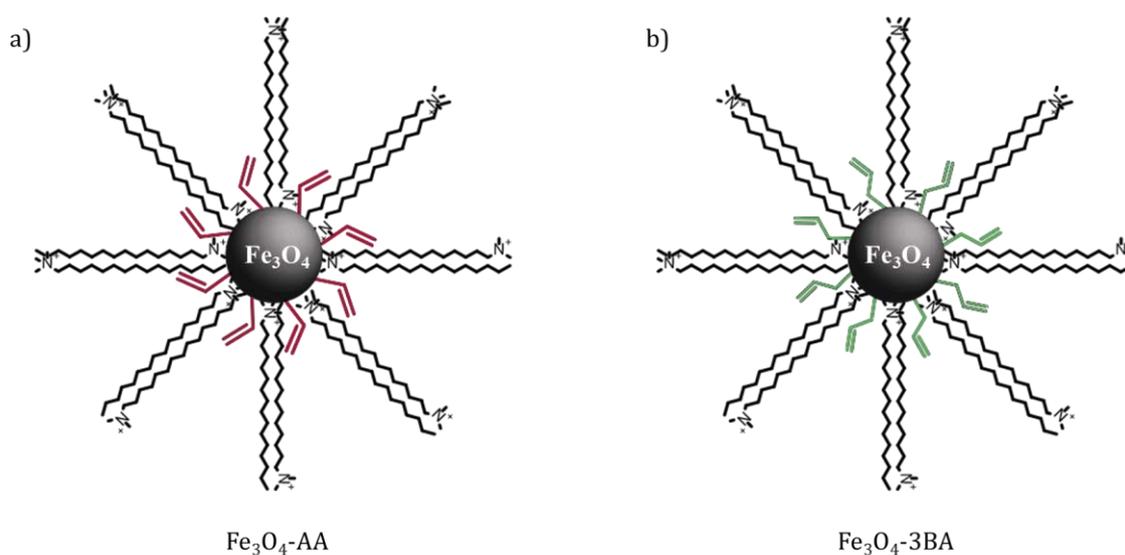


Figura 33. Representación esquemática de la modificación de la superficie de las MNPs: a) ácido acrílico (@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}$ ) y b) ácido but-3-enoico (@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-3BA}$ ).

## I.4. Nanopartículas poliméricas

### I.4.1. Síntesis de los sistemas $pNIPAM@MZ$

Una vez conseguido el núcleo de nanopartículas magnéticas, se pasó a la síntesis del polímero  $pNIPAM$ . La preparación de las nanopartículas de  $pNIPAM$  macizas ( $pNIPAM@MZ$ ) se realizó en condiciones de polimerización radicalaria de  $N$ -isopropilacrilamida en disolución acuosa, utilizando un amidinopropano (V50) como iniciador radicalario y  $N,N'$ -metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. La síntesis se llevó a cabo a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo atmósfera inerte. En la figura 34 se muestra una imagen TEM de las nanopartículas de  $pNIPAM@MZ$  obtenidas mediante esta síntesis.

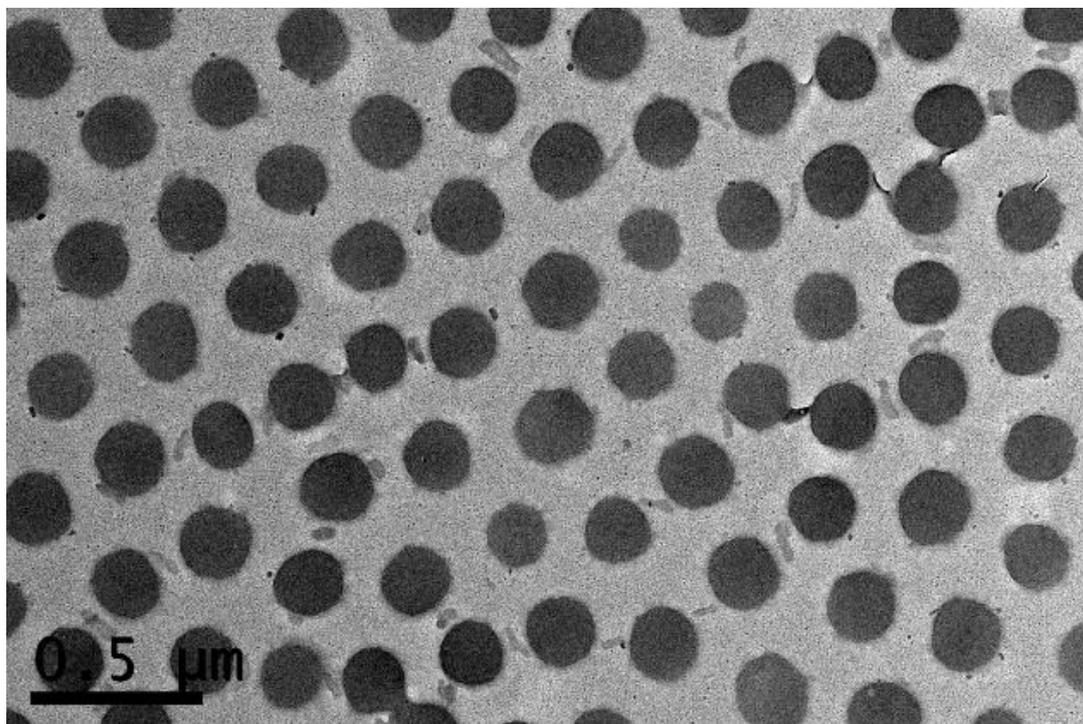


Figura 34. Nanopartículas de  $pNIPAM@MZ$  libre.



En este trabajo se han utilizado varias concentraciones de monómero y distintos porcentajes de agente reticulante con el fin de optimizar el tamaño de las partículas, la monodispersidad y la estabilidad o agregación de partículas tanto en el exterior como en el interior del microgel. El control preciso de las condiciones de síntesis nos permite obtener polímeros altamente reproducibles, y con las características óptimas para su utilización como posibles sistemas para la liberación controlada de fármacos, dado que el tamaño va a influir de manera directa con la interacción celular y la biodistribución del polímero *in vitro* e *in vivo*.<sup>93</sup>

Inicialmente se realizó la reacción de polimerización a varias concentraciones de monómero, de 50 a 250 mM, mientras que el porcentaje molar del entrecruzante BIS se modificó en el rango de 0 a 10% con respecto al monómero (Tabla 4). En la columna del entrecruzante BIS se muestra el porcentaje molar de este respecto al monómero NIPAM. El iniciador radicalario se utilizó en todos los casos en una concentración constante (100 mM). Las muestras sintetizadas se analizaron mediante TEM para determinar su morfología y tamaño.

Tabla 4. Condiciones de polimerización de pNIPAM.

	N-isopropilacrilamida (NIPAM)			N,N'-Metilenbisacrilamida (BIS)		
	g	mmol	mM	g	mmol	%mol
1	0.113	1.0	50	0.015	0.10	10
2	0.170	1.5	75	0.023	0.15	10
3	0.226	2.0	100	0.031	0.20	10
4	0.339	3.0	150	0	0	0
5	0.339	3.0	150	0.015	0.075	2.5
6	0.339	3.0	150	0.023	0.15	5
7	0.339	3.0	150	0.032	0.21	7.5
8	0.339	3.0	150	0.046	0.30	10
9	0.453	4.0	200	0.062	0.40	10
10	0.566	5.0	250	0.077	0.50	10

A continuación se analiza los resultados obtenidos en cada síntesis. Cuando se utilizó una concentración de monómero de 150 mM y un 5 % de entrecruzante, se observó una baja agregación de las NPs y una alta monodispersidad (Tabla 4, muestra 6). Las muestras fueron analizadas por TEM mostrando tamaños en el rango de  $490 \pm 3.0$  nm y  $530 \pm 5.5$  nm de diámetro. Sin embargo, cuando se utilizó la preparación con una concentración de monómero más alta (Tabla 4, muestras 9 y 10), se observó una importante agregación, que no mejoró al reducir la concentración del entrecruzante (Tabla 4, muestra 7). Por otra parte, se observaron bajos rendimientos en las NPs con una menor concentración de monómero y manteniendo constante (al 10 %) la concentración del BIS (Tabla 4, muestras de 1 a 3); de hecho, cualquier intento de mejorar la monodispersidad de

la muestra mediante la adición de menores concentraciones de entrecruzante fue infructuoso (Tabla 4, muestras 4 y 5).

Se deduce por tanto de los resultados experimentales, que las condiciones ideales para la síntesis de nanopartículas de *p*NIPAM@MZ libres, con alta monodispersidad y baja agregación son utilizando 150 mM del monómero *N*-isopropilacrilamida, 5% del entrecruzante *N,N'*-metilénbisacrilamida respecto al monómero y 100 mM del iniciador 2,2'-azobis(2-metilpropionamida).

#### **I.4.2. Adición de comonómeros a *p*NIPAM@MZ: nanopartículas copoliméricas**

La adición de comonómeros permite una modificación de la superficie de las NPs manteniendo los monómeros principales, lo que permite seleccionar los grupos funcionales que se incorporan a la superficie para el anclaje de otras moléculas. El revestimiento de la superficie es fundamental para determinar las propiedades, estabilidad y solubilidad de las NPs.

Como se detalló en la sección de la parte experimental 2.3.3: *Preparación de nanopartículas copoliméricas*, la síntesis de las NPs copoliméricas se llevó a cabo utilizando ácido but-3-enoico, ácido acrílico o alilamina como comonómeros. La preparación de las NPs se llevó a cabo siguiendo las condiciones óptimas determinadas para las NPs de *p*NIPAM@MZ libre (Tabla 4, muestra 6), y añadiendo a la mezcla de polimerización los tres comonómeros en estudio. En la figura 35 se muestra la estructura de los polímeros resultantes de la adición de comonómeros.

La correcta adición del comonomero a la red polimérica se demostró mediante análisis del potencial Z. Los resultados manifiestan que los sistemas de *p*NIPAM-co-3BA@ a pH= 8 muestran un potencial de  $-16 \pm 0.305$  mV y los sistemas de *p*NIPAM-co-AA@ valores de  $-14 \pm 0.244$  mV. Esto demuestra el anclaje de los grupos COOH a la red polimérica, dado que a pH=8 se da una desprotonación parcial de los grupos de ácido carboxílico en la red del microgel. Estos mismos sistemas a condiciones de pH neutro o ácido mostraron un valor 0 mV de potencial Z.

Por otro lado, cuando se polimeriza NIPAM en presencia de alilamina para obtener *p*NIPAM-co-AL@, se añade grupos NH<sub>2</sub> a la red polimérica. Esto queda demostrado analizando el potencial Z a pH= 2, donde se produce la protonación de los grupos amina. Este hecho concuerda con el valor obtenido de  $7.08 \pm 0.63$  mV en la medida de potencial Z.

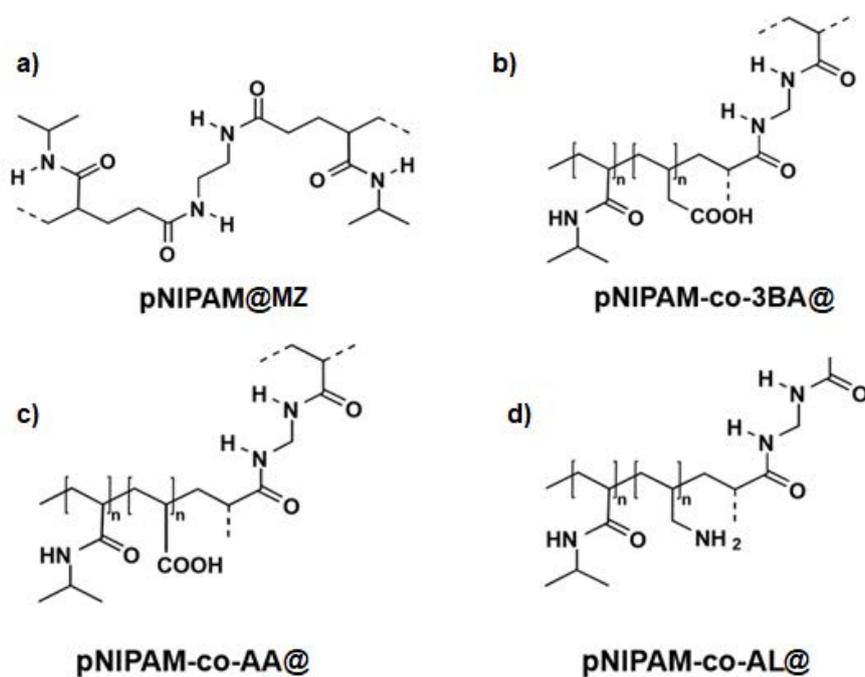


Figura 35. Estructuras del polímero. a) *p*NIPAM@MZ, b) funcionalizado con ácido but-3-enoico, c) ácido acrílico, d) alilamina.

Los análisis mediante TEM mostraron que la morfología de las NPs no se vio afectada por la adición de comonómeros a los polímeros, siendo sus datos morfológicos muy similares. Como se observa en la figura 36, las imágenes muestran una baja polidispersidad y tamaños de entre  $519 \pm 3.0$  nm y  $540 \pm 5.5$  nm de diámetro, similares al de pNIPAM@MZ. Por lo tanto, se deduce que la morfología de las partículas no se ve afectada por la composición química, ni se produce agregación de estas.

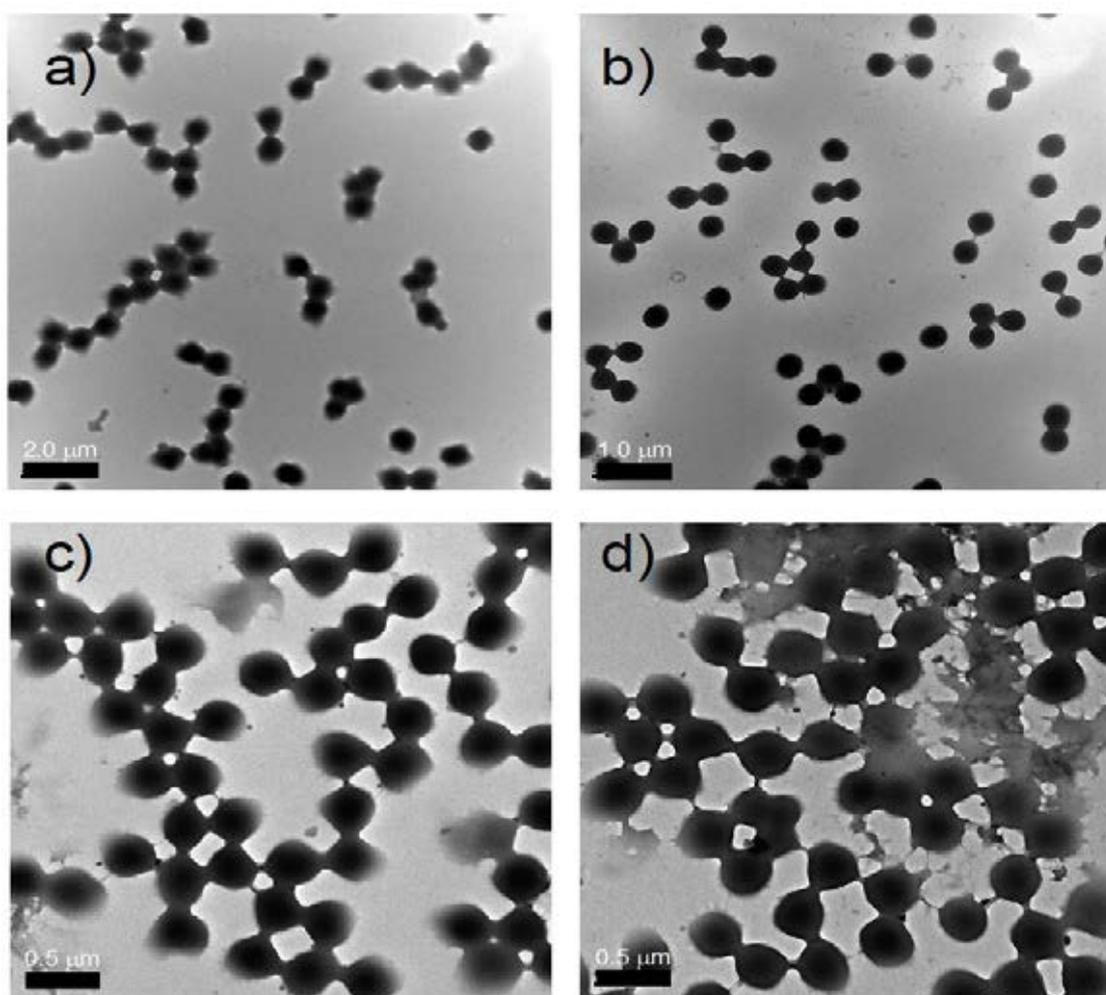


Figura 36. Imagen de TEM de NPs de pNIPAM con concentración de monómero de 150 mM y 5% de entrecruzante BIS. a) pNIPAM@MZ, b) pNIPAM-co-3BA@, c) pNIPAM-co-AA@, d) pNIPAM-co-AL@.

## I.5. Sistemas híbrido de *p*NIPAM con núcleo magnético

Como se detalló en la sección de la parte experimental 2.3.4: *Preparación de sistemas híbridos con núcleo magnético*, se sintetizaron NPs híbridas coloidales con núcleo magnético, por crecimiento del polímero *p*NIPAM y *p*NIPAM-co-AL sobre @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA y @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA, que actuaron como semillas. En la figura 37 se muestra una imagen donde se observa el efecto del campo magnético de un imán de neodimio sobre las NPs con núcleo de magnetita.



*Figura 37. Aspecto de la emulsión en agua de sistemas híbridos de *p*NIPAM con nanopartículas magnéticas en el interior. Se observa que en la zona del imán de neodimio hay un cúmulo marrón formado por los sistemas poliméricos con núcleo magnético.*

Se midió el ZP de los sistemas híbridos magnéticos, obteniendo un valor de  $-14 \pm 0.3$  mV, tanto para las NPs *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA como para *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, a pH= 8. Estos valores indican la presencia de ácidos carboxílicos desprotonados en la red polimérica. Por otro lado, para los sistemas copoliméricos de *p*NIPAM-co-AL@, a pH= 8 obtuvo un valor de  $-11 \pm 0.3$  mV,



y a pH= 2 de  $2.03 \pm 0.6$  mV, indicativo este último de la protonación de los grupos amina. Estos valores son coherentes con la composición química de las partículas, así como con los datos obtenidos anteriormente para las redes de pNIPAM sin núcleos magnéticos.

### **I.5.1. Optimización del tamaño: variación de la concentración de monómero y entrecruzante**

La morfología y tamaño de las NPs obtenidas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS). Resaltamos que los tamaños del microgel medidos por DLS son mayores que los obtenidos por TEM. Esto se debe a que la medida generada por el DLS refleja el tamaño de microgel expandido en disolución, mientras que en la imagen TEM se visualiza la morfología y tamaño del microgel colapsado, en estado deshidratado. Esto es causado por que en microscopía TEM es necesario secar la muestra sobre una rejilla previamente a la obtención de la imagen.

- *Variación de la cantidad de monómero*

Con el objetivo de estudiar la dependencia del tamaño final de las partículas con la concentración de monómero, hemos realizado la polimerización del pNIPAM sobre las MNPs funcionalizadas @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA y @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA a varias concentraciones de monómero NIPAM. En concreto se ha estudiado 50, 75, 150 y 200 mM de NIPAM, todas ellas manteniendo al 10 % del entrecruzante BIS respecto al monómero. En la figura 38 se muestra las imágenes obtenidas con

TEM de las nanopartículas híbridas  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-3BA}$  preparadas con las concentraciones de monómero mencionadas. Al igual que en el caso anterior para los microgeles de  $p\text{NIPAM}@MZ$  puro, cuando la concentración de monómero es menor (50 mM), se obtienen los microgeles más pequeños.

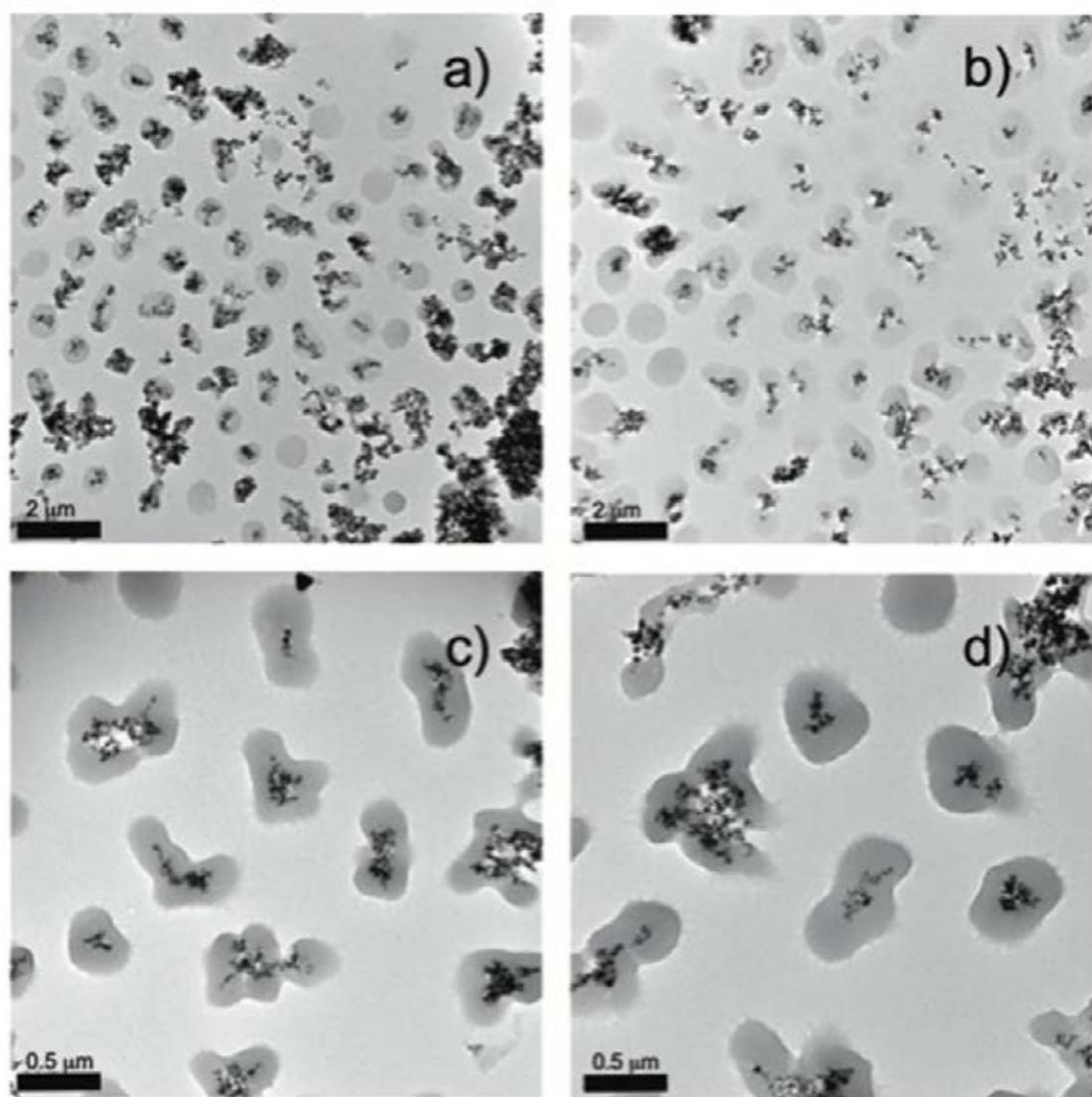


Figura 38. Imágenes al TEM de muestras de  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-3BA}$  preparadas con distintas concentraciones de monómero (a) 50, (b) 75, (c) 150 y (d) 200 mM.



Como vemos en las imágenes, se confirma la formación de los sistemas híbridos, dado que en el centro de los microgeles se muestra un clúster de alto contraste formado por esferas metálicas de óxido de hierro, recubiertas por una capa de polímero monodisperso, que se observa de menor contraste en las imágenes.

Cuando se utiliza una concentración 50 mM de monómero NIPAM y 10 % de entrecruzante BIS (Figura 38 a), se observa que en la mayoría de los casos los cúmulos magnéticos están recubiertos por un polímero esférico, sin embargo, hay una importante presencia de agregados de magnetita libre no recubiertos, y de algunos cúmulos magnéticos recubiertos por una cubierta de polímero de morfología irregular.

Con una concentración de NIPAM de 75 mM (Figura 38 b), el número de agregados de magnetita libre no recubierta se reduce, comparado con la muestra de 50 mM. Sin embargo, la cantidad de microgeles con morfología no definida que recubren el clúster magnético aumentan.

En el caso de las síntesis realizadas con concentraciones 150 mM y 200 mM de NIPAM (Figura 38 c y d, respectivamente), es importante destacar que los agregados libres de magnetita no recubiertos casi desaparecen, probablemente debido a la mayor cantidad de monómero, sin embargo, los cúmulos de magnetita se encuentran recubiertos por microgeles con morfología irregular. Algunos de estos núcleos de magnetita y el recubrimiento de los polímeros parecen ser dos microgeles *p*NIPAM fusionados con el clúster magnético en el centro, lo que puede deberse a la elevada concentración de monómero. Este mayor aglutinamiento de las MNPs puede también deberse a que el cambio en el medio producido por el aumento de la cantidad de NIPAM produzca mayor inestabilidad de estas y por ende formen mayores agregados de cúmulos magnéticos. De esta manera, no



encontramos agregados de MNPs libres ya que, debido al mayor tamaño de estos, sedimentan con mayor facilidad y se han limpiado por decantación magnética, eliminando los clústeres de MNPs libres.

Basándonos en estos resultados, consideramos que 50 mM es la concentración óptima de NIPAM para obtener MNPs recubiertas por microgeles pNIPAM esféricos.

- *Variación de la concentración de entrecruzante*

Una vez definida la concentración óptima de monómero NIPAM, hemos analizado el efecto de diferentes concentraciones de entrecruzante (BIS) durante la preparación de sistemas magnéticos híbridos. Para ello se mantiene a una concentración constante de monómero NIPAM (50 mM). La figura 39 incluye imágenes TEM representativas para el sistema pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, el cual se ha preparado empleando concentraciones de 0, 2.5, 5 y 7 % de entrecruzante BIS respecto a la concentración de monómero.

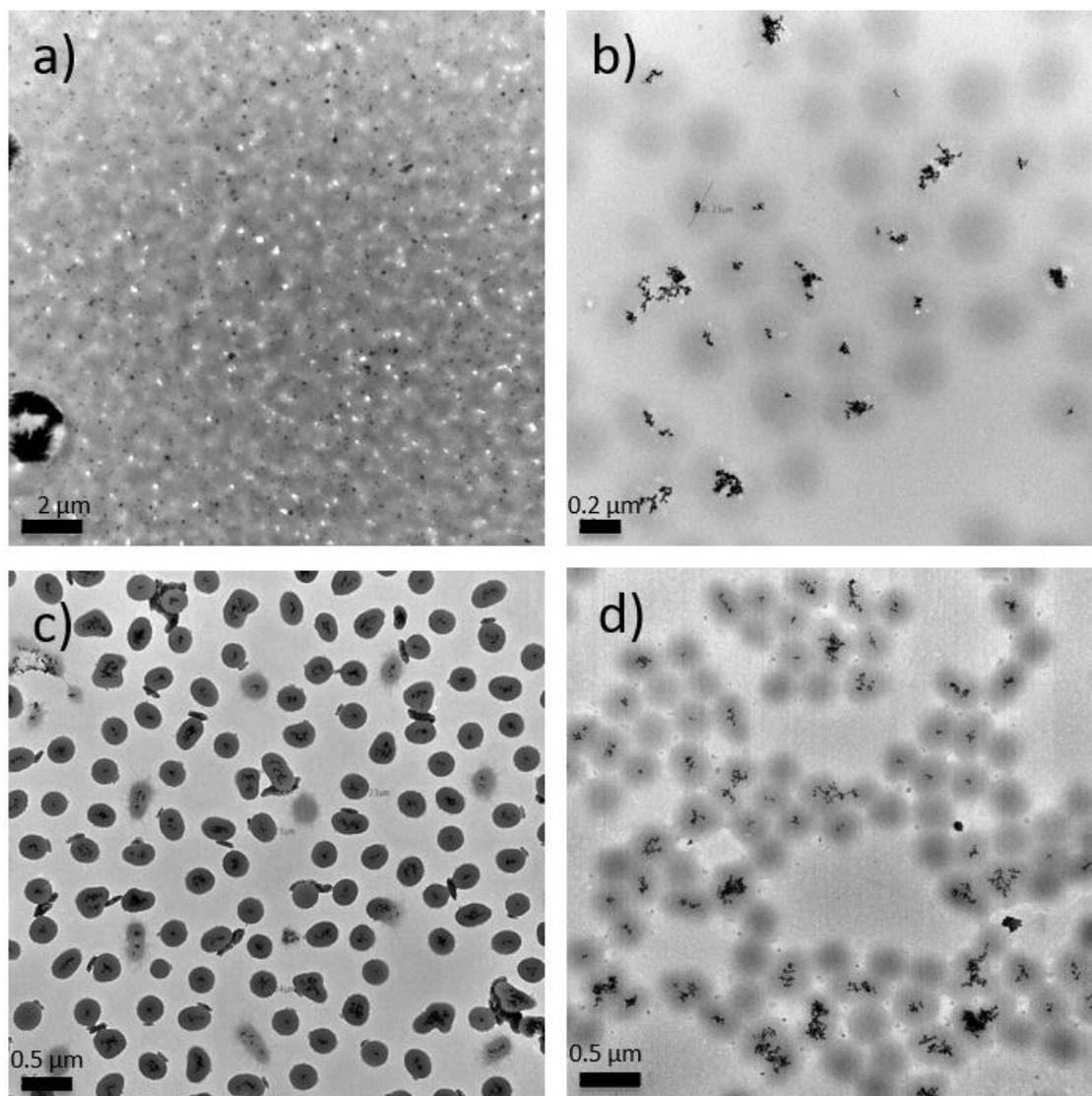


Figura 39. Imágenes TEM de  $pNIPAM@Fe_3O_4-AA$  preparadas con diferentes porcentajes de entrecruzante respecto al monómero (a) 0 %, (b) 2.5 %, (c) 5 % y (d) 7 %.

Como se observa en la figura 39 (a), con 0 % de entrecruzante, hay una ausencia total de microgeles, la estructura híbrida núcleo@corteza se perdió totalmente y se observa una red continua que contiene NPs de  $Fe_3O_4$  dispersas. En estas condiciones se forma partículas de reticulación ultra-baja (ULC, del inglés *Ultra-low cross-linked*), las cuales muestran una alta deformabilidad.<sup>94,95</sup>



La muestra preparada con 2 % de BIS (Figura 39 b) presenta sistemas híbridos tipo núcleo@corteza que contienen grupos de magnetita recubiertos por microgeles esféricos, pero con un bajo número de MNPs dentro de cada microgel, y una alta cantidad de microgeles libres. Esta muestra presentará una baja respuesta magnética.

La muestra preparada con 7 % de BIS (Figura 39 d) muestra sistemas híbridos que contienen agregados magnéticos con un número muy variable de MNPs de magnetita. Sin embargo, para el sistema híbrido preparado al 5 % BIS se obtuvieron núcleos homogéneos que contenían clústeres magnéticos con un número regular y constante de MNPs de magnetita y recubiertos completamente por un microgel esférico (Figura 39 c). Estos datos también confirman que la presencia del núcleo magnético no afecta al proceso de reacción de polimerización, sino que está influenciado solo por la cantidad de monómero y entrecruzante.

Por tanto, podemos concluir que las condiciones óptimas para la fabricación de partículas híbridas con morfología (núcleo@corteza) bien definida y similar contenido de magnetita ( $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$ ) son las que emplean 50 mM de monómero *N*-isopropilacrilamida, 5 % de entrecruzante *N,N'*-metilbisacrilamida respecto al monómero, y 100 mM de iniciador 2,2'-azobis(2-metilpropionamida). Con estas condiciones, se alcanza un tamaño medio de nanopartícula de  $255 \pm \text{nm}$  de diámetro, tamaño ideal para utilizar estas NPs como sistema para el transporte y liberación de fármacos. En la figura 40 se esquematiza las condiciones óptimas de síntesis.

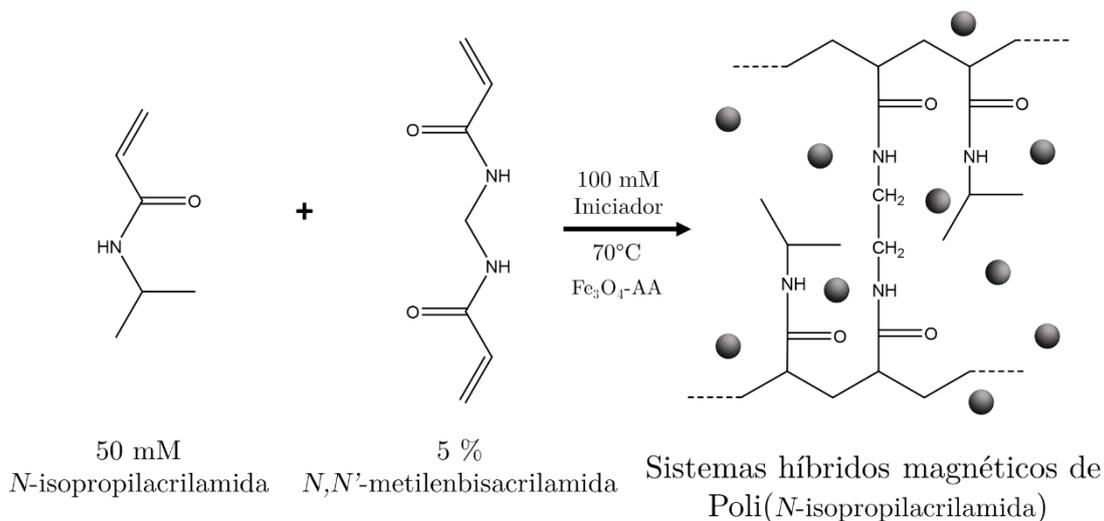


Figura 40. Esquema de las condiciones óptimas de síntesis de sistemas híbridos de *p*NIPAM. El tamaño medio aproximado es de 255 nm de diámetro.

En la figura 41 se visualiza una ampliación de una NP de *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA obtenida en las condiciones óptimas de síntesis establecidas. En la figura 41 (a), donde se incluye la imagen de *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, se diferencia claramente el clúster magnético en el centro del polímero. Asimismo, se determinó el tamaño de las NPs sobre las imágenes obtenidas TEM mediante el software de análisis de imagen *ImageJ*. Los valores de los tamaños de partícula obtenidos se representan en la figura 41 (b) en un histograma de distribución de tamaños que muestra la frecuencia y la curva de distribución normal. Se observa que el tamaño mínimo de partícula es de 212 nm y máximo de 308 nm, muy cercanos a la media de 255 nm.

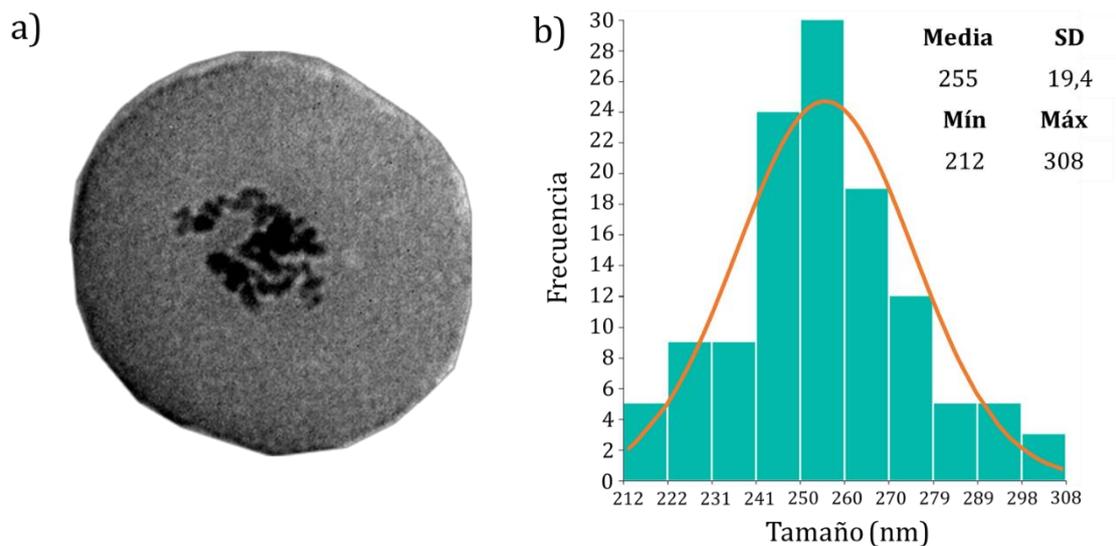


Figura 41. (a) Imagen ampliada del sistema  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$  sintetizada en las condiciones óptimas. (b) Histograma de la distribución del tamaño de las NPs, donde se representa el diámetro frente a su frecuencia.

### I.5.2 Diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) y temperatura crítica de transición de fase (LCST)

Se ha determinado la temperatura crítica de transición de fase (LCST) para los sistemas magnéticos híbridos ( $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$ ) preparados siguiendo las condiciones óptimas obtenidas en el apartado anterior, establecidas en 50 mM concentración de monómero y 5 % de entrecruzante respecto al monómero. Para ello, se ha medido el diámetro hidrodinámico tal y como se detalla en el apartado experimental 2.1.3: *Dispersión dinámica de luz (DLS)*.

En la figura 42 (a) se representa la medida del diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) en función de la temperatura para  $p\text{NIPAM}@MZ$  puro y para el sistema  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$ . Las medidas se tomaron cada 2 °C en un intervalo de



temperatura entre 24 °C, temperatura a la que se observa un diámetro de 590 nm, y 46 °C, temperatura a la cual los microgeles tienen un diámetro de 252 nm. Los diámetros medidos son similares para ambos sistemas coloidales:  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$  y  $p\text{NIPAM}@MZ$  puro. En este rango de temperaturas se observa los dos estados del microgel: el estado colapsado cuando se calienta y el estado expandido cuando se enfría.

En la figura 42 (b) se representa el cambio del tamaño de las partículas en nanómetros en función de la temperatura para ambos sistemas. En esta gráfica, el valor máximo (34 °C) indica la temperatura crítica de transición de fase (LCST), es decir, la temperatura a la cual se produce el cambio del estado expandido al colapsado, y viceversa. Como puede además observarse, el diámetro hidrodinámico en función de la temperatura para los sistemas  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$  (línea negra) es muy similar al diámetro hidrodinámico para los microgeles puros de  $p\text{NIPAM}@MZ$  (línea roja). De hecho, la LCST se establece a 34 °C en ambos casos. Estos datos apoyan la afirmación que la presencia de núcleo magnético no influye ni en el tamaño final de las partículas ni en el valor de la temperatura crítica de transición de los sistemas híbridos  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$ .

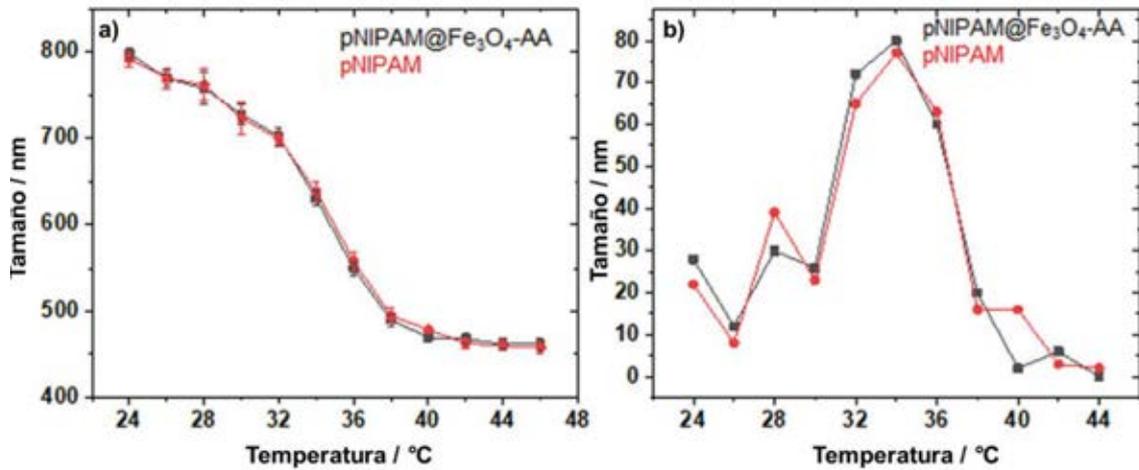


Figura 42. a) Diámetro hidrodinámico de microgeles de pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA (línea negra) y pNIPAM@MZ (línea roja) en función a la temperatura; b) cambio del tamaño de partícula pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA (línea negra) y pNIPAM@MZ (línea roja) en función de la temperatura. La temperatura crítica en ambos casos es 34 °C.

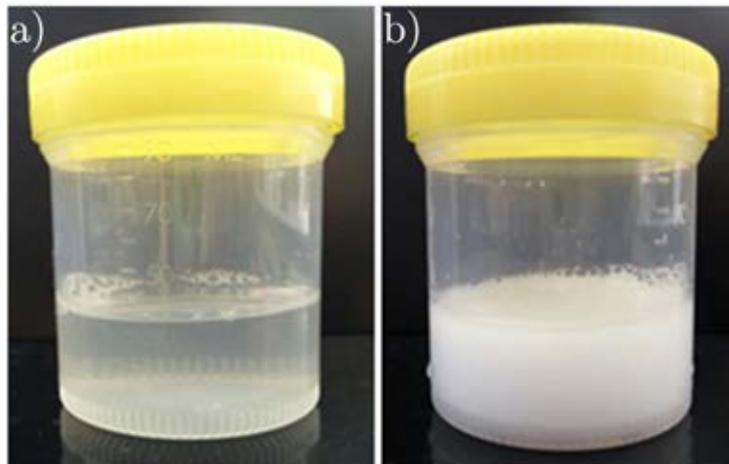
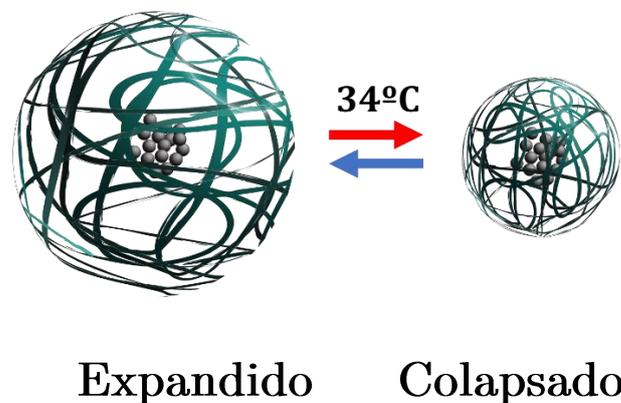


Figura 43. Cambio de aspecto del polímero pNIPAM con la temperatura del estado (a) expandido (b) colapsado (LCST 34 °C).

El tamaño final de las NPs por debajo del LCST depende de la relación entre la cantidad de agente entrecruzante dentro de la red polimérica y los de las unidades repetidas de monómero. A mayor concentración de agente entrecruzante, se alcanzará un mayor entrecruzamiento. Los microgeles muy entrecruzados tienen

una estructura más compacta y se expanden mucho menos comparándolos con el mismo microgel con un nivel de entrecruzamiento menor. Por tanto, el entrecruzamiento dificulta la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo así la expansión. En la figura 44 se muestra una representación de las cadenas poliméricas de pNIPAM entrecruzadas formando la red del microgel con el núcleo magnético en su interior y su comportamiento expandido y colapsado según la temperatura.



*Figura 44. Cambio del tamaño de las partículas en función de la temperatura para las partículas de pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA. La temperatura LCST para pNIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA se encuentra a 34°C*

Por encima de la LCST, el microgel de pNIPAM se encuentra totalmente colapsado debido a que las moléculas de agua son expulsadas de la red del microgel. Esto significa que los microgeles de pNIPAM muestran una naturaleza hidrófila por debajo de su LCST y una naturaleza hidrófoba por encima de ella.

El comportamiento de expansión-contracción puede explicarse con la teoría de Flory,<sup>96</sup> que establece que en un microgel la presión osmótica de expansión viene dada por las contribuciones de tres términos:

$$\Delta\Pi_{\text{expansión}} = \Delta\Pi_{\text{mezcla}} + \Delta\Pi_{\text{elástica}} + \Delta\Pi_{\text{ión}} = 0$$

Donde  $\Delta\Pi_{\text{mezcla}}$  es la contribución a la presión osmótica del equilibrio polímero/disolvente,  $\Delta\Pi_{\text{elástica}}$  es la contribución elástica de las cadenas de polímero deformadas desde su estado de referencia, y  $\Delta\Pi_{\text{ión}}$  representa la contribución debida a la presencia de iones libres y enlazados (por ejemplo, mezcla ion/disolvente y efectos electrostáticos). Según esta expresión, un polímero con una baja densidad de entrecruzamiento tendrá una transición de fase más intensa debido a un menor componente elástico.

Por tanto, como hemos indicado y siguiendo la teoría de Flory, el tamaño final de los microgeles por debajo del LCST vendrá definido por la cantidad de entrecruzamiento del polímero. Para comprobar esto, hemos analizado los valores de  $D_H$  para las NPs de *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA a 24 °C y a cuatro densidades de entrecruzante diferentes (0, 2.5, 5 y 7 %). En la Tabla 5 se indican los resultados obtenidos.

Tabla 5. Diámetro hidrodinámico a 24 °C y tanto por ciento de entrecruzante respecto al monómero.

% Entrecruzante	Diámetro hidrodinámico (nm)
0	148
2.5	668
5	590
7	500

### I.5.3. Análisis de contenido en hierro

Se ha analizado también el contenido de hierro mediante la técnica de absorción atómica en los sistemas  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-3BA}$  y  $p\text{NIPAM}@Fe_3O_4\text{-AA}$  con 150 mM de NIPAM y 5 % de BIS. Según esta técnica, los sistemas presentan 205 mg/g y 198 mg/g de hierro (RSD 3.8 %), respectivamente.

### I.5.4. Marcaje fluorescente: preparación de FITC- $p\text{NIPAM-co-AL}@Fe_3O_4\text{-AA}$

Con el objetivo de visualizar los sistemas híbridos con un microscopio confocal de fluorescencia, y poder además seguir la internalización en entornos biológicos; se sintetizaron los sistemas híbridos polímero-núcleo magnético y se marcaron con isocianato de fluoresceína (FITC). Para ello, se partió de núcleos magnéticos funcionalizados con ácido acrílico ( $@Fe_3O_4\text{-AA}$ ) y a estos se creció un copolímero  $p\text{NIPAM}$  aminoterminal, es decir, que presenta grupos alilamina en su estructura ( $p\text{NIPAM-co-AL}@Fe_3O_4\text{-AA}$ ) (figura 45). La preparación se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas de síntesis que se han establecido anteriormente, es decir, NIPAM (50 mM), y BIS (5%). La incorporación del cromóforo FITC se realizó mediante la reacción del grupo amina libre presente en la red polimérica (proporcionado por la alilamina) con el grupo isotiocianato del FITC, como se representa en la figura 45.

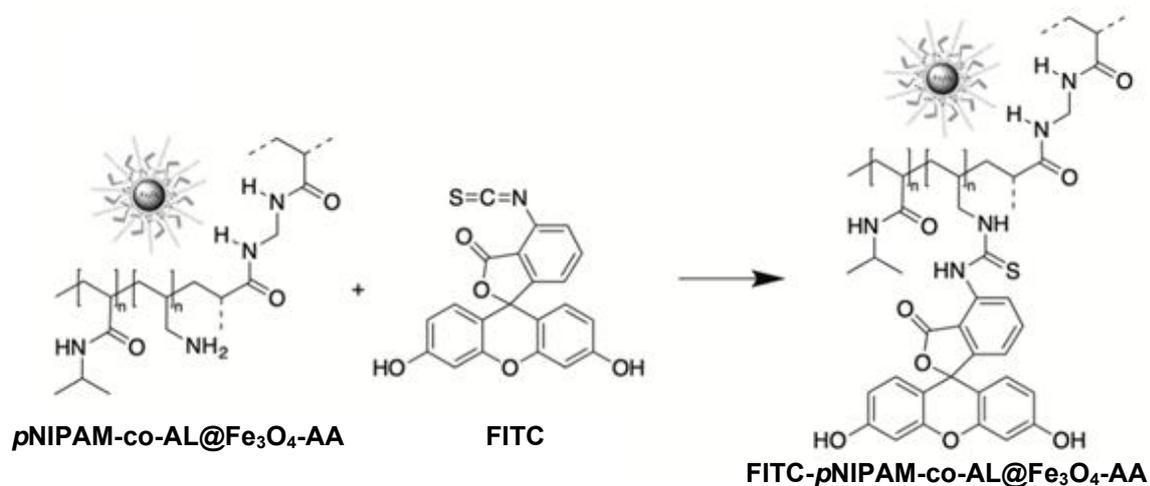


Figura 45. Esquema del marcaje fluorescente con FITC de las NPs híbridas pNIPAM-co-AL@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA.

En la figura 46 se muestra imágenes TEM de las NPs híbridas FITC-pNIPAM-co-AL@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA. El tamaño medio determinado mediante TEM de las NPs es 255 nm de diámetro. De nuevo, se observan microgeles esféricos bien dispersos que contienen clústeres magnéticos de agregados de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en el centro de la estructura.

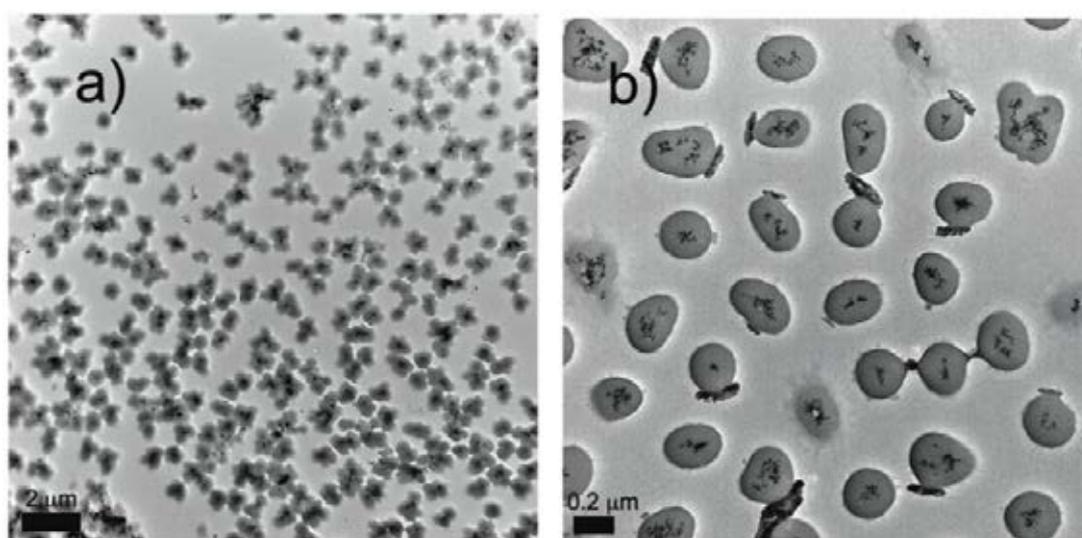


Figura 46. Imágenes TEM las NPs de FITC-pNIPAM-co-AL@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA marcadas.

Como se observa en la figura 46, los microgeles mantienen una alta monodispersidad en tamaño y forma, confirmando la estabilidad después de las reacciones llevadas a cabo.

La presencia de FITC en los sistemas híbridos se confirmó mediante microscopía confocal de fluorescencia, excitando la muestra a 492 nm, y recogiendo su emisión a 518 nm. En la figura 47 se observa las imágenes obtenidas con un microscopio confocal (figura 47 a y b), también se incluyen la imagen del espectro de absorción y emisión de la molécula de FITC (figura 47 c) y las muestras bajo una lámpara UV (figura 47 d)

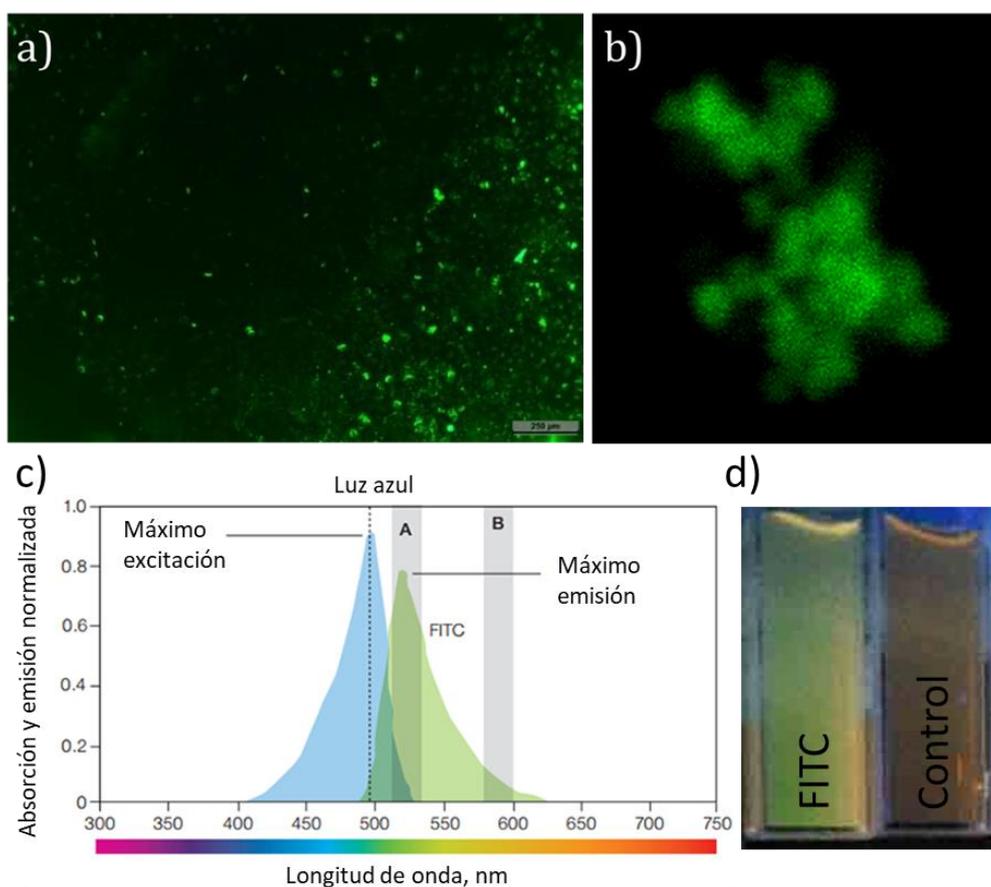


Figura 47. (a) Visualización FITC-NIPAM-co-AL@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA con el microscopio confocal de fluorescencia. (b) Ampliación de un grupo de NPs marcadas. (c) Espectro de absorción y emisión de FITC. (d) Muestras bajo lámpara de UV.



El marcaje fluorescente del polímero ofrece la ventaja respecto a los sistemas no marcados, de poder estudiar de la internalización celular de las NPs.<sup>41,83,84</sup>

Mediante el seguimiento por microscopía confocal de cultivos celulares tratados con los sistemas marcados *in vitro* se puede establecer el movimiento de los sistemas híbridos y la liberación de fármacos de manera direccionada hacia las células tumorales.

## I.6. Encapsulación de 5-fluoruracilo y oxaliplatino

La encapsulación de fármaco 5FU se llevó a cabo en los sistemas *p*NIPAM@MZ, *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA y *p*NIPAM-co-AL@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AA, mientras que el fármaco OXA se incluyó en las partículas *p*NIPAM@MZ y *p*NIPAM@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-3BA. La incorporación de los fármacos anticancerígenos se realizó a 20 °C debido a que a esta temperatura la red polimérica del *p*NIPAM se encuentra en estado expandido.

Para llevar a cabo la encapsulación de los fármacos, se añadió de 3 a 20 mg del compuesto activo a una dispersión en agua de los sistemas *p*NIPAM@MZ (Tabla 6). La eficiencia de encapsulación (EE %) se define como el porcentaje de fármaco que queda atrapado en la NP. La EE% se calcula dividiendo el fármaco total añadido menos el fármaco libre no atrapado entre el fármaco total añadido, multiplicado por 100.

$$EE \% = \frac{D_T - D_L}{D_T} \cdot 100$$



En la fórmula de eficiencia de encapsulación (EE %),  $D_T$  indica la concentración inicial añadida del fármaco y  $D_L$  es la concentración del fármaco libre después de la centrifugación.

La EE % del fármaco en los sistemas poliméricos fue establecida por espectrofotometría UV. Para ello, se midió la absorción en un espectrofotómetro UV-Vis a 257 y 248 nm, para 5FU y OXA, respectivamente, en las muestras previamente centrifugadas para eliminar el exceso no encapsulado.<sup>90</sup> Los resultados se muestran en la Tabla 6 como un promedio de dos mediciones.

Tabla 6. Eficiencia de encapsulación (EE %) en los sistemas de pNIPAM con los fármacos oxaliplatino (OXA) y 5-fluoruracilo (5FU).

Muestra	Fármaco (mg)	Precursor pNIPAM (mg)	Sistema pNIPAM	EE %
1	5FU (20)	10	pNIPAM@MZ+5FU	36.3
2	5FU (20)	10	pNIPAM@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -3BA+5FU	60.7
3	5 FU (3)	6	pNIPAM-co-AL-FITC@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA+5FU	60.0
4	5FU (6)	17	pNIPAM-co-AL@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA+5FU	65.0
5	OXA (10)	10	pNIPAM@MZ+OXA	38.5
6	OXA (10)	10	pNIPAM@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -3BA+OXA	77.5
7	OXA (10)	10	pNIPAM-co-AL@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AA+OXA	73.5



Como se puede observar en los valores incluidos en la Tabla 6, se obtuvo una buena eficiencia de encapsulación en todos los casos, entre 37 y 77 % aproximadamente. Se destaca de estos resultados que la EE % para los sistemas híbridos con núcleos magnéticos fue mayor (Tabla 6, muestras 2-4, 6 y 7) que para los sistemas pNIPAM@MZ puros (Tabla 6, muestras 1 y 5). Este efecto es constante para todos los sistemas preparados y se atribuye al mayor tamaño de las NPs en estado expandido (hasta 800 nm) de los sistemas híbridos. El hecho de presentar un mayor tamaño permite una mayor acumulación del fármaco, aumentando así la capacidad de carga.

Analizando las eficiencias de encapsulación para cada fármaco, se observa que se obtienen mejores resultados para el fármaco OXA (hasta 77.5 %, Tabla 6, muestra 6) que para 5FU (65.0 % máximo, Tabla 6, muestra 4). Este hecho puede ser atribuido a una mejor solubilidad en agua de 5FU, lo que aumenta su tendencia a permanecer en la disolución acuosa y, por tanto, se mantiene en el medio y se encapsula menos en el polímero.

## I.7. Liberación *in vitro* de 5-fluoruracilo y oxaliplatino

La liberación *in vitro* de 5FU y OXA se estudió utilizando una bolsa de diálisis de celulosa colocada en un Erlenmeyer que contenía una disolución de buffer PBS a  $\text{pH} = 7.4$  como fase estacionaria y a una agitación constante de 100 rpm. Se recogieron alícuotas de 3 mL de la disolución a intervalos de 10 min, durante los primeros 60 min, y cada 12 h durante un período de 48 h. El medio de liberación

fue reemplazado por el mismo volumen de PBS extraído para mantenerlo constante.

Para determinar el efecto de la temperatura en la liberación del fármaco, el ensayo se realizó a 4, 20 y 40 °C (figura 48). La liberación del fármaco se midió por espectrofotometría UV (257 nm para 5FU y 248 nm para OXA).

La figura 48 muestra los resultados la liberación del fármaco para  $p\text{NIPAM@MZ}+5\text{FU}$  y  $p\text{NIPAM-co-AL@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}+\text{OXA}$  frente al tiempo.

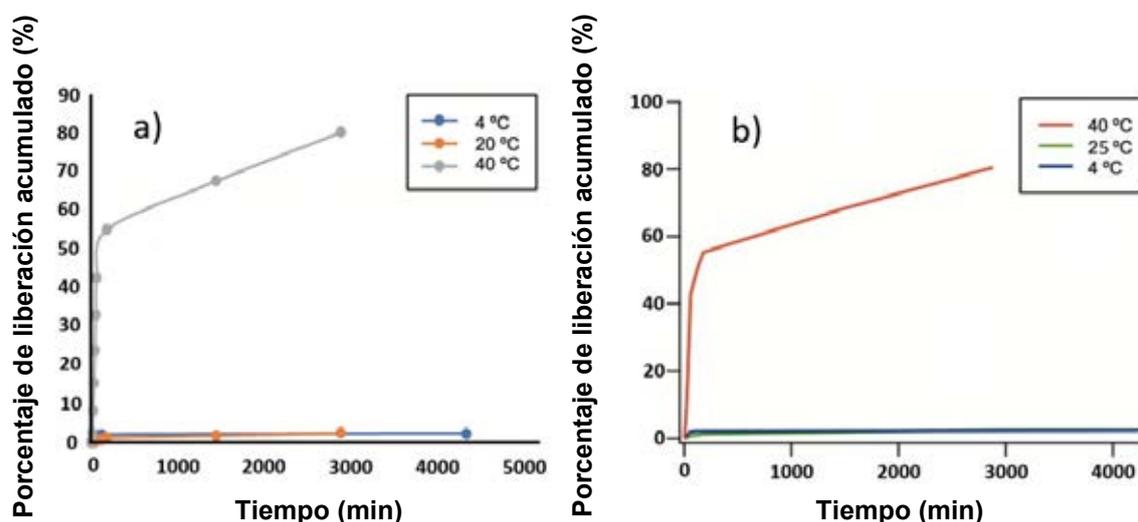


Figura 48. Ensayo de liberación de fármacos. Liberación acumulada de (a)  $p\text{NIPAM@MZ}+5\text{FU}$ , (b)  $p\text{NIPAM@Fe}_3\text{O}_4\text{-AA}+\text{OXA}$ .

Como se puede observar, a las temperaturas de 4 y 20 °C, solo ha habido liberación acumulada de alrededor del 2.5 % para ambos fármacos. Esto significa que el fármaco se retiene fuertemente dentro de la matriz polimérica expandida dado que a esta temperatura el microgel se encuentra por debajo de la LCST. Sin embargo, a 40 °C el porcentaje de liberación acumulada es de casi 42 % a lo largo



de los primeros 60 min, alcanzando el 81 % después de 48 h, lo que se atribuye al colapso del microgel, dado que se encuentra por encima de la LCST.

Estos datos muestran el potencial para el transporte y la liberación controlada de ciertos fármacos anticancerígenos, como por ejemplo 5-fluorouracilo y oxaliplatino, en el interior del cuerpo humano, dado que a esta temperatura, los microgeles se encuentran en estado colapsado, favoreciendo la liberación. Además, se destaca que las células tumorales muestran una temperatura superior a las células normales, por lo que se incrementa la liberación específica en estas células. Estos resultados sugieren la posible aplicación de una terapia combinada (5FU y OXA) utilizando una única NP, que podría ser dirigida directamente al tumor a través de un campo magnético externo. Así pues, los sistemas híbridos presentados poseen aplicaciones potenciales en la administración localizada de fármacos, lo que los convierte en una herramienta muy prometedora para la terapia del cáncer de colon.

Concretamente, la investigadora de la Universidad de Granada García-Pinel, Beatriz, et al.<sup>41</sup> ha estudiado *in vitro* estos sistemas sintetizados en esta Tesis Doctoral, destacando entre los resultados que las NPs muestran una gran biocompatibilidad, una excelente capacidad de carga de fármacos específicos contra células de cáncer de colon y una alta sensibilidad a la temperatura, lo que permite aumentar la liberación de fármacos y mejorar la terapia citotóxica en este tipo de tumores.

## *Capítulo II*

# *Nanopartículas de sulfuro de plata para bioimagen por fluorescencia*



## II.1. Antecedentes

El campo de la imagen biomédica se ha ido desarrollando en las últimas décadas, permitiendo obtener información de órganos y tejidos de organismos vivos, algo que es muy útil para el diagnóstico o pronóstico de diferentes enfermedades. Entre las distintas técnicas de imagen más utilizadas se encuentran: TC (Tomografía Computerizada), PET (Tomografía por Emisión de Positrones), SPECT (Tomografía Computerizada de Emisión Monofotónica), imagen por ultrasonidos y resonancia magnética (MRI). Sin embargo, estas técnicas tan ampliamente utilizadas muestran varios inconvenientes, entre los que debemos resaltar el uso de radiación ionizante. Por ejemplo, para la TC se utilizan agentes de contraste basados en yodo/bario; para MRI, basados en gadolinio; y para PET, indicadores metabólicos radiactivos de fluorodeoxiglucosa/fluorotimidina. Además, muestran baja sensibilidad, baja resolución espacial y una compleja instrumentación con coste elevado.<sup>97</sup>

Con la introducción de la microscopía de fluorescencia a principios del siglo XX se han desarrollado multitud de marcadores fluorescentes, es decir, agentes de contraste capaces de emitir luz de una determinada longitud de onda bajo excitación óptica, y que permiten visualizar distintos procesos y estructuras a escala celular tanto *in vitro* como en organismos vivos (*in vivo*-bioimagen). Desde la proteína verde fluorescente (GFP),<sup>98</sup> determinada en 1994 y los colorantes orgánicos, hasta las actuales nanoestructuras fluorescentes,<sup>99</sup> los marcadores fluorescentes han experimentado un gran desarrollo gracias al avance en las técnicas de síntesis química y de imagen. Los nuevos nanomateriales fluorescentes son capaces de superar las limitaciones de otras técnicas de imagen utilizadas de

forma habitual. Así, estos marcadores muestran ventajas tan interesantes como la ausencia de radiaciones ionizantes, la elevada estabilidad fotoquímica, la posibilidad del control de la longitud de onda de emisión, la relativa simplicidad, la alta sensibilidad y el bajo coste del equipamiento necesario. Sin embargo, las técnicas de imagen fluorescente presentan inconvenientes que no debemos olvidar: los tejidos biológicos muestran autofluorescencia, lo que provoca interferencias con el fondo y problemas en cuanto a la relación señal/ruido, y la baja penetración debido a la absorción y *scattering* de la luz por los tejidos biológicos. En la figura 49 se muestran los procesos de interacción de la luz con un tejido. La reflexión, dispersión, absorción, *scattering* y la autofluorescencia contribuyen a la pérdida de señal de fluorescencia y al aumento del ruido.

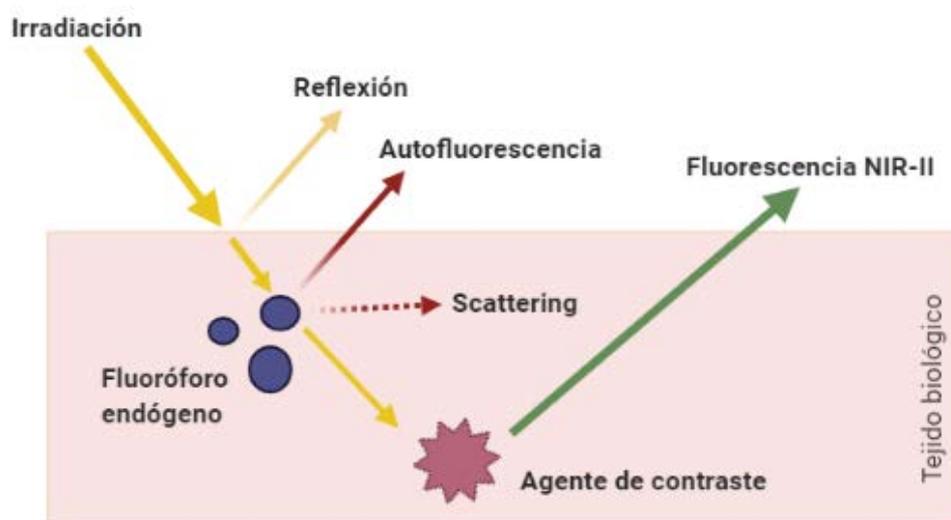


Figura 49. Interacción de la luz con tejido biológico. Se visualizan los procesos de reflexión, autofluorescencia y *scattering* al interactuar con un tejido biológico, lo que contribuye a la pérdida de señal.<sup>100</sup>

Estas limitaciones pueden superarse mediante fluoróforos que trabajen en un rango determinado del espectro electromagnético llamado ventanas biológicas, favoreciendo las imágenes biomédicas por la reducción de la autofluorescencia y *scattering* de los tejidos, y aumentando la penetrancia en los mismos.<sup>100-102</sup> En la figura 50a se ilustra la capacidad de penetración de la luz en los tejidos, mostrando que la excitación en la región NIR-II permite llegar a una mayor profundidad en el tejido, comparado con el Vis y el NIR, y por tanto, proporciona mejores ventajas en la obtención de imágenes. En la figura 50b se representa los coeficientes de absorción de diferentes tejidos biológicos en función de la longitud de onda en la región de 400 a 1700 nm, que abarca las ventanas del espectro visible, NIR-I y NIR-II (regiones sombreadas en azul, verde y rojo, respectivamente). Como se observa, todos los tejidos muestran una dispersión reducida en las longitudes de onda más largas.

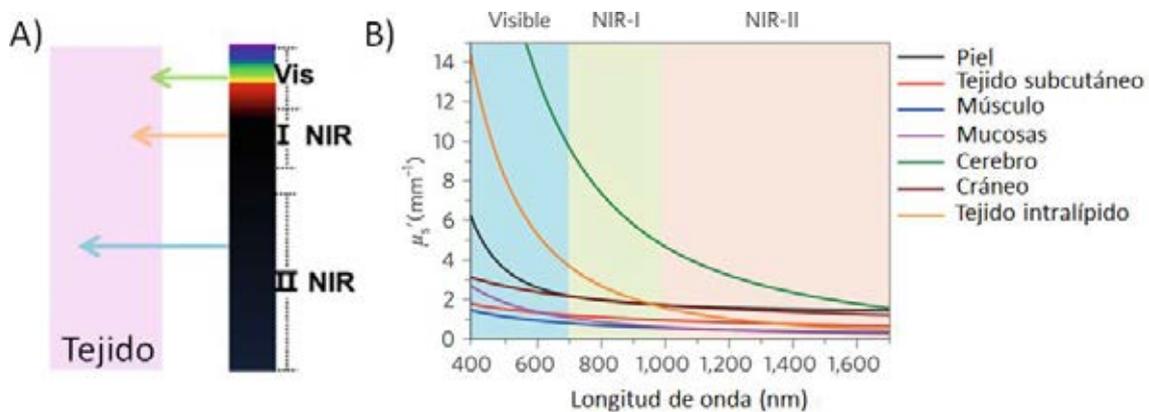


Figura 50. a) Ilustración esquemática de la penetración en los tejidos por la luz visible, NIR-I y NIR-II. b) Coeficiente de absorción de diferentes tejidos biológicos.<sup>100</sup>

En la figura 51 se muestra la relación entre la longitud de onda de excitación y emisión con la autofluorescencia de los tejidos en un ratón con los órganos

expuestos. En la imagen de la figura 51a se visualiza al ratón con luz blanca, en el que vemos los órganos y fluidos corporales, útil para la comparación con las distintas imágenes posteriores. Se señala con flechas la vesícula biliar (GB), intestino delgado (SI) y vejiga (BI). En la figura 51b se puede observar con el filtro de luz azul/verde (460-500 nm/505-560 nm) y en la figura 51c con verde/rojo (525-555 nm/590-650 nm). Como se observa, los tejidos y fluidos corporales muestran autofluorescencia, lo que interfiere en la obtención de imágenes en estas longitudes de ondas. Cuando se utiliza el filtro de infrarrojo cercano (NIR) (725-775 nm/790-830 nm), figura 51d, la autofluorescencia queda reducida, demostrando que es la región más útil para la bioimagen al no tener ruido de los propios tejidos.<sup>103</sup>

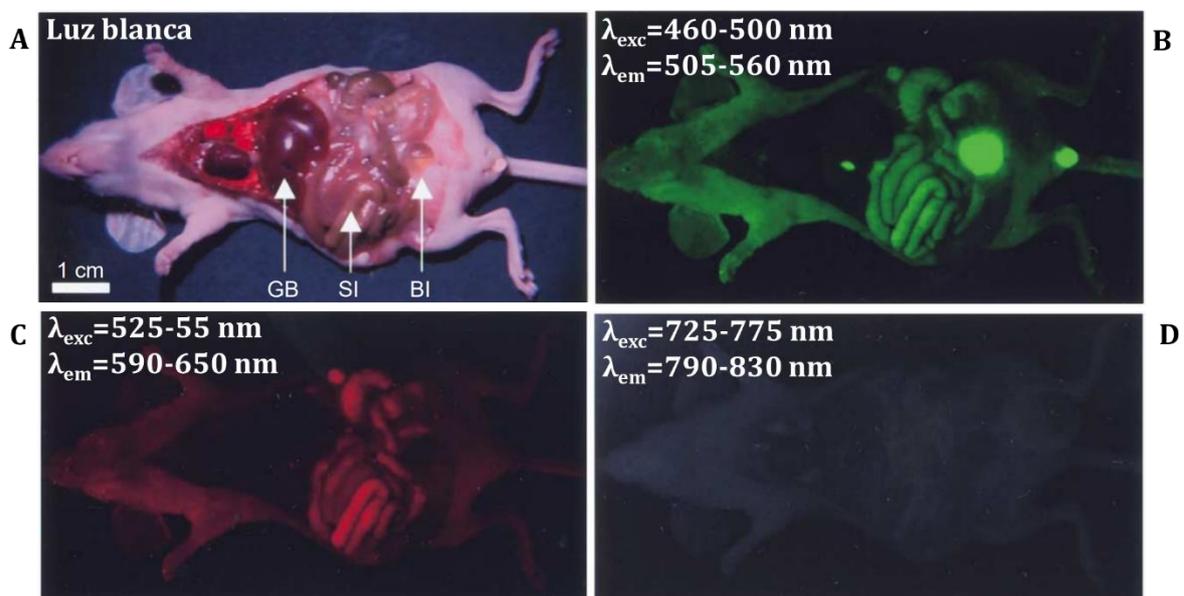


Figura 51. Autofluorescencia de los tejidos de un ratón a diferentes rangos de longitudes de onda de excitación y emisión. En la región del espectro NIR la autofluorescencia se reduce.<sup>103</sup>



Cada tejido muestra unos valores de *scattering* y absorción distintos, lo que está relacionado con la proporción relativa de agua, hemoglobina, o grasas, presentes en él. Así, el rango del espectro que presenta las mejores condiciones para obtener imágenes de fluorescencia biomédica abarca la ventana del NIR-II, con rangos entre 1000 – 1700 nm.<sup>100</sup> Para aprovechar estas longitudes de onda es necesario recurrir al uso de NPs fluorescentes, entre las que encontramos nanotubos de carbono, *quantum dots*, nanopartículas de tierras raras y nanopartículas orgánicas e inorgánicas.<sup>104</sup>

Las nanopartículas que emiten en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR-NPs) son muy atractivas en aplicaciones biomédicas por varias razones: a) la fotoexcitación en la región NIR no desencadena la luminiscencia de la materia biológica, lo que minimiza la fluorescencia de fondo a casi cero, b) se permite una mayor profundidad de penetración de la luz de excitación y c) la luz emitida en el infrarrojo también puede penetrar en los tejidos sin mostrar fototoxicidad. Asimismo, las NIR-NPs son químicamente estables y muestran una baja citotoxicidad.

En este contexto, las NPs destacan por su versatilidad, pudiéndose utilizar tanto para bioimagen como marcadores fluorescentes, como para transporte y liberación controlada de fármacos. Por ello, se pueden definir como plataformas teranósticas, es decir, capaces de actuar simultáneamente como agente terapéutico y de diagnóstico.<sup>105</sup> La síntesis química de las NPs permite el control y optimización de las características fisicoquímicas, espectrales, tamaño y carga de la superficie, pudiendo dirigir estas hacia un *targeting* pasivo o activo con aplicaciones biomédicas en investigación y en uso clínico.<sup>106,107</sup>



Adicionalmente, además de la biocompatibilidad, la fotoestabilidad y la intensidad de emisión, una de las principales características más deseadas en los marcadores fluorescentes es la eficiencia cuántica (QY, del inglés *quantum yield*). Se define la QY como la medida directa de la eficiencia de la conversión de los fotones absorbidos en fotones emitidos.

Aprovechando las características de las NIR-NPs, se ha conseguido obtener imágenes de alto contraste. Con este tipo de agentes de contraste se ha demostrado, por ejemplo, la posibilidad de monitorizar, en tiempo real y de forma no invasiva, una anomalía del flujo sanguíneo en un modelo de accidente cerebrovascular de oclusión de la arteria cerebral media del ratón.<sup>108</sup> Para ello, Hong y col. utilizaron nanotubos de carbono, capaces de emitir en la región NIR-IIa, llegando a una profundidad de  $>2$  mm en el cerebro del ratón y con una resolución inferior a  $10\ \mu\text{m}$ , evitando la craneotomía. En la figura 52 se muestra las imágenes obtenidas con los nanotubos de carbono como agente de contraste.

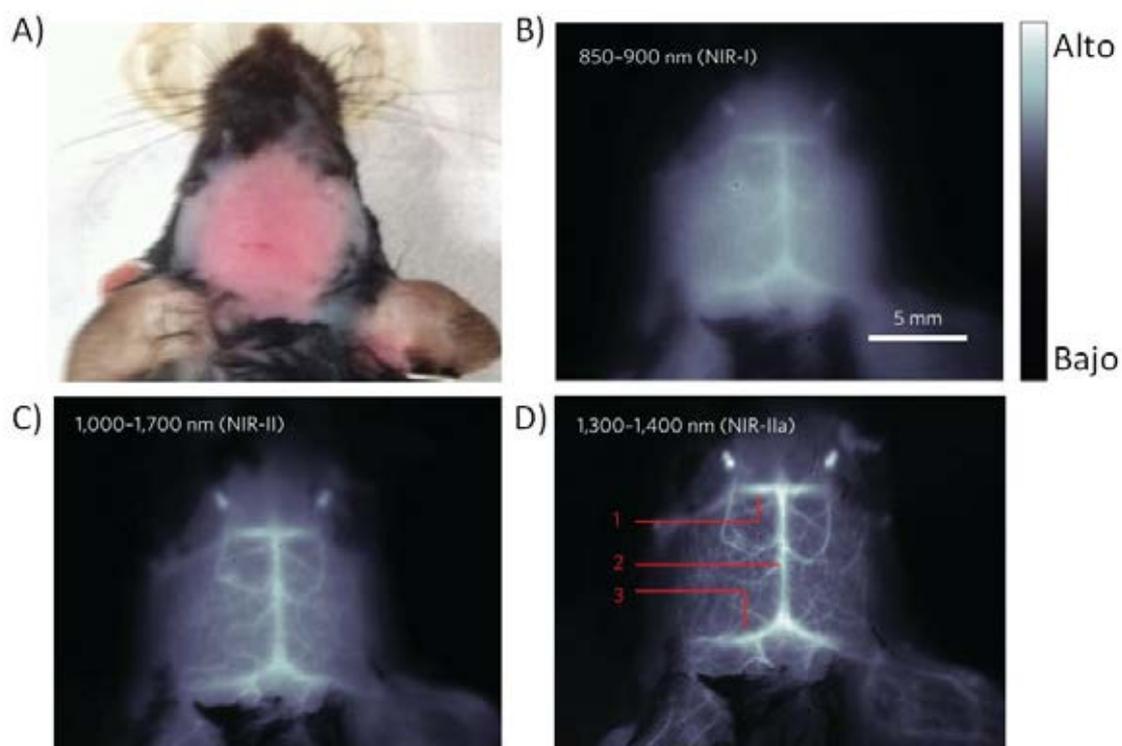


Figura 52. Imágenes in vivo en diferentes subregiones NIR del cerebro del ratón empleando como marcador nanotubos de carbono. a) Cabeza de ratón sin pelo. b-d), Imágenes de fluorescencia de la misma cabeza de ratón en las regiones NIR-I, NIR-II y NIR-IIa. En d), se etiquetan con 1, 2 y 3, la vena cerebral inferior, el seno sagital superior y el seno transversal, respectivamente.<sup>108</sup>

El grupo de Li y col. han sintetizado NPs basadas en lantánidos que son capaz de ser excretadas, evitando la retención usual de la mayoría de los fluoróforos NIR-II en el sistema reticuloendotelial (RES), como el hígado y el bazo. Estas sondas, que emiten en el NIR-II, pueden eliminarse rápidamente del cuerpo tras su administración intravenosa, evitando las preocupaciones de seguridad a largo plazo. Además, las propiedades ópticas permiten la aplicación biomédica tanto como para cirugías, monitorización sanguínea, problemas vasculares, visualización de tumores.<sup>109</sup> En la figura 53 se muestra un esquema de las posibles aplicaciones de las NPs.

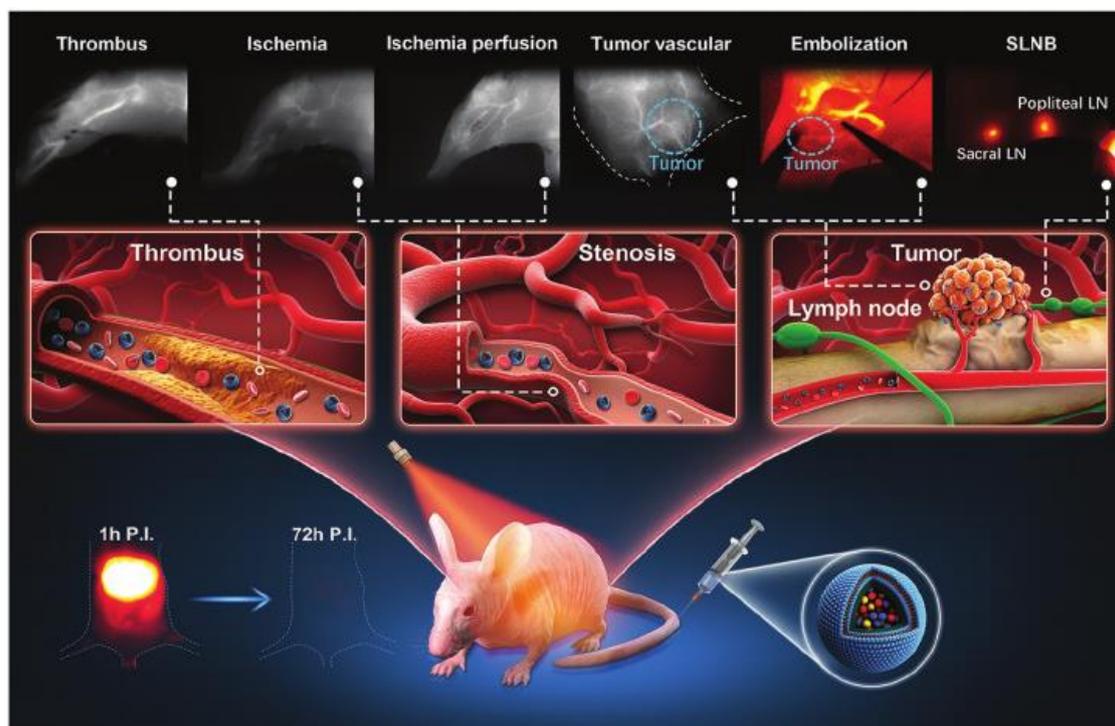


Figura 53. Esquema resumen de la utilidad de las nanopartículas excretadas basadas en lantánidos para la imagen biomédica multifuncional y cirugía gracias a la emisión en la segunda ventana del infrarrojo cercano.<sup>109</sup>

Otra característica que protege las propiedades ópticas de las NPs que emiten en el NIR-II es la utilización de estructuras núcleo@corteza (del inglés, *core@shell*). En ellas el recubrimiento desempeña un papel fundamental en la protección del núcleo contra la oxidación y en la conservación de su fluorescencia. Los investigadores Zhang y col. han desarrollado *quantum dots* núcleo@corteza de sulfuro de plomo@sulfuro de cadmio (PbS@CdS) sintetizados en fase orgánica, los cuales emiten en la ventana de NIR-IIb, alrededor de 1.600 nm.<sup>110</sup> Utilizando estas NPs estos autores han obtenido imágenes en tiempo real del flujo sanguíneo en la vasculatura de ratones a través de la piel. Estas sondas son útiles para la investigación biomédica dado que permite la visualización de tumores, gracias a

la acumulación en la zona por el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) y emiten a  $\sim 1.600$  nm, región del espectro en el que la autofluorescencia es prácticamente nula, por lo que no existirá ruido de los propios tejidos. En la figura 54a se esquematiza el proceso de obtención de imágenes del ratón, en las figuras 54b y c se observa las imágenes obtenidas con los *quantums dots* de las NPs núcleo@corteza de PbS@CdS y en la figura 54e el esquema de las NPs empleadas.

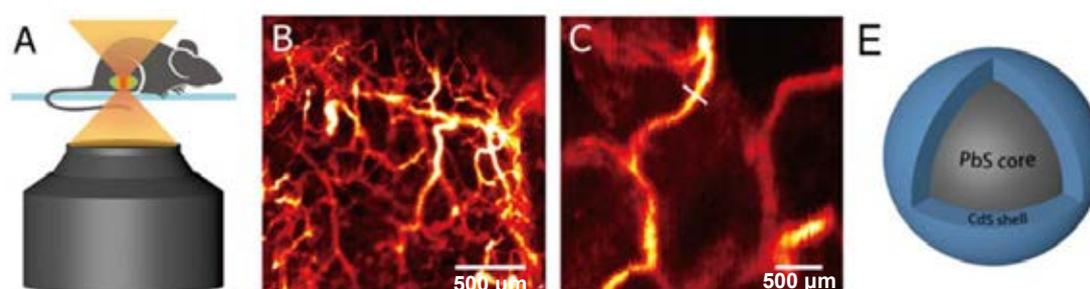


Figura 54: a) Esquema de la visualización in vivo del ratón a través de la piel. b y c) Imagen confocal de fluorescencia in vivo de los vasos de la extremidad posterior del ratón después de la inyección los QDs. E) Representación esquemática de las NPs núcleo@corteza de sulfuro de plomo@sulfuro de cadmio.<sup>110</sup>

Utilizando también este tipo de estructuras núcleo@corteza, son varios los grupos de investigación que han buscado mejorar la eficiencia cuántica de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$  mediante el recubrimiento con  $\text{ZnS}$ ,<sup>111-113</sup>  $\text{AgCl}$ ,<sup>114</sup>  $\text{CdS}$ ,<sup>115</sup>  $\text{SnS}_2$ ,<sup>116</sup>  $\text{SiO}_2$ ,<sup>117</sup> y  $\text{Ag}_2\text{WO}_4$ .<sup>118</sup> Los sulfuros de zinc ( $\text{ZnS}$ ) y plata ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ) son compuestos semiconductores muy utilizados debido a la biocompatibilidad de ambos y a que no se interfiere en la emisión del  $\text{ZnS}$  sobre la del núcleo de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  que emite en el NIR-II.<sup>119</sup> Por tanto, en esta tesis se ha estudiado la protección del núcleo de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  mediante  $\text{ZnS}$  que reduce los defectos estructurales del núcleo, en

busca de una mejora de la eficiencia cuántica, y con perspectivas futuras de continuar la investigación en busca de NPs para bioimagen.



Son muchas las aplicaciones biomédicas de las NPs que emiten en la región del NIR-II, principalmente debido a las buenas propiedades ópticas. En concreto, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado NPs de sulfuro de plata, que forman cristales semiconductores muy compactos, compuestos por cientos o miles de átomos ordenados en una estructura cristalina de forma habitualmente esférica. Cuando las NPs de sulfuro de plata son excitadas a 800 nm, son capaces de emitir en la segunda ventana del infrarrojo cercano, utilidad estudiada *in vivo* mediante inyección en un ratón. Además, mediante el recubrimiento núcleo@corteza de las NPs de sulfuro de plata con sulfuro de zinc se pretende aumentar las propiedades ópticas mediante la protección del núcleo de plata. A continuación, se detallan los resultados obtenidos.



## II.2. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido publicados en un artículo de alto impacto titulado “10-Fold Quantum Yield Improvement of Ag<sub>2</sub>S Nanoparticles by Fine Compositional Tuning” en la revista ACS Applied Materials & Interfaces en el año 2020.<sup>120</sup>

### II.2.1 Síntesis del precursor Ag(DDTC)

El crecimiento de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S/Ag se lleva a cabo empleando como precursor dietilditiocarbamato de plata (Ag(DDTC)). Este compuesto se sintetizó siguiendo el procedimiento indicado en la parte experimental 2.4.2: *Síntesis del precursor Ag(DDTC)*. El producto se identificó mediante FTIR (figura 55), en la que se observan los grupos funcionales asociados al compuesto Ag(DDTC) y se verificó por comparación con la base de datos espectral para compuestos orgánicos (SDBS No.: 527). Las medidas fueron tomadas de 4000–400 cm<sup>-1</sup>.

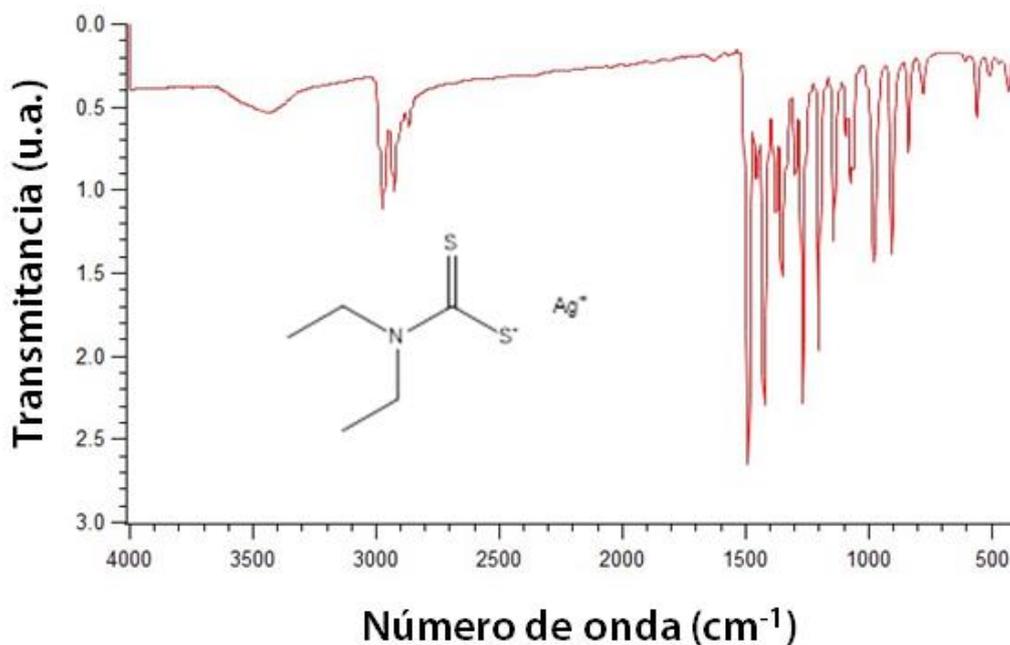


Figura 55. Espectro FTIR del precursor  $\text{Ag}(\text{DDTC})$ .

### II.2.2 Síntesis de nanopartículas $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$

Partiendo del precursor sintetizado ( $\text{Ag}(\text{DDTC})$ ), se estudió las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  en cuanto a la relación entre la mezcla de los disolventes oleilamina (OLA) y 1-dodecanetiol (DDT). El método de síntesis seguido fue mediante descomposición térmica a  $190\text{ }^\circ\text{C}$  en atmósfera inerte, durante 1 hora. Esto permitió la transformación total del precursor  $\text{Ag}(\text{DDTC})$  presente en la mezcla de disolventes orgánicos en nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ . En la figura 56 se representa el proceso de síntesis, mostrando el paso primordial de nucleación, cuando se define el tamaño final de las NPs y las características de estas. En la Tabla 7 se indican las concentraciones estudiadas para cada disolvente.

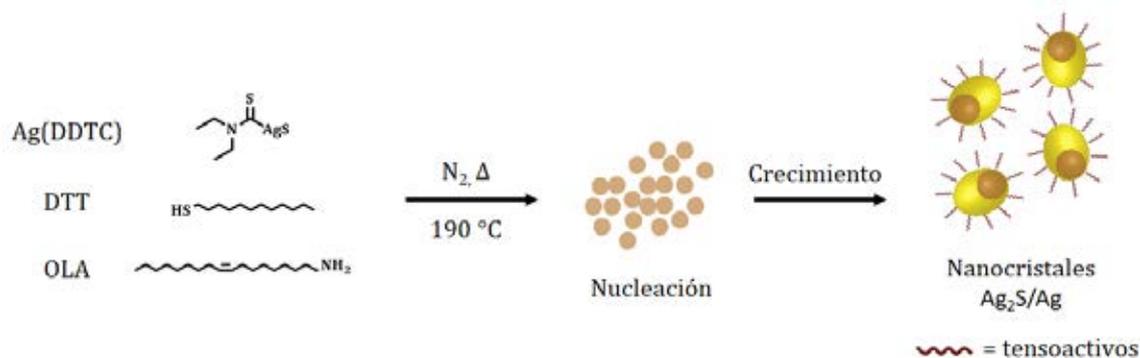


Figura 56. Esquema síntesis nanopartículas de sulfuro de plata.

Tabla 7. Mezcla de disolventes utilizados en cada síntesis.

Nombre síntesis	Fracción molar del disolvente ( $X_{\text{DTT}}$ )	DDT mmol	OLA mmol
A	0	0.0	15.2
B	0.15	2.4	13.7
C	0.3	5.2	11.4
D	0.60	10.4	7.6
E	0.9	18.8	1.5
F	1	20.9	0

Todas las muestras sintetizadas se almacenaron en viales, dispersadas en tolueno, a 4 °C y protegidas de la luz. Las dispersiones mostraron un aspecto de color negro con diferentes niveles de brillo, perceptibles a simple vista. En la figura 57 se incluye una fotografía de los viales de las muestras.

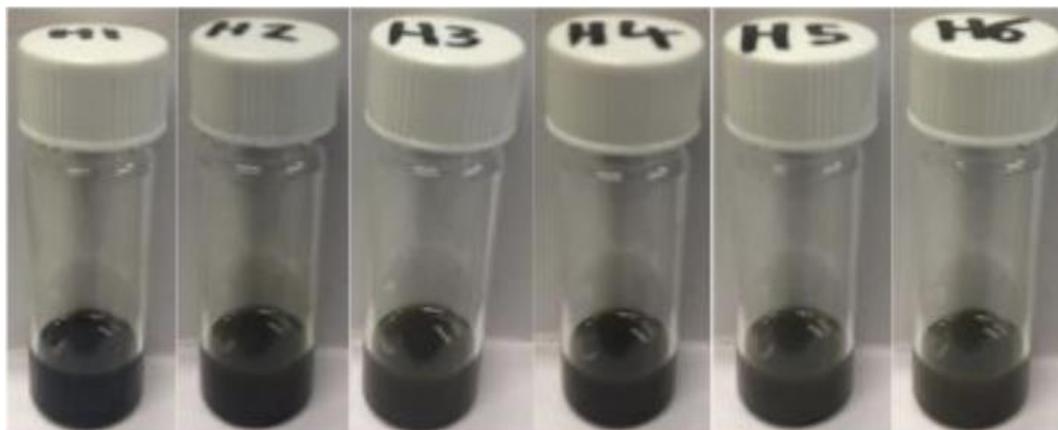


Figura 57. Muestras sintetizadas almacenadas en viales para su posterior análisis. Las muestras, etiquetadas de H1 a H6 corresponden con las etiquetas de la A - F conforme a la Tabla 7.

Todas las muestras obtenidas fueron estudiadas mediante TEM, para determinar su morfología y tamaño; y se determinó la distribución de tamaño de partículas mediante la representación de histogramas de tamaño para cada síntesis. La figura 58 muestra imágenes obtenidas mediante TEM correspondientes con las seis condiciones de estudio anteriormente indicadas y la distribución de tamaño correspondientes a cada síntesis. Como se observa, hay una disminución de tamaño en función al ratio DDT/OLA pasando de  $\sim 13$  nm a  $\sim 5$  nm (Tabla 8).

Este cambio de tamaño se debe principalmente a que la reacción se lleva a cabo con distinta relación de disolventes en cada caso, y por tanto, varía la composición final de las NPs. Sin embargo, en todos los casos se observa que las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$  muestran geometría esférica, y se apilan de forma organizada y regular en “panales”.

Cuando no se añade nada del disolvente DDT o solo 2.4 mmol y el resto es de OLA (muestras A y B), se obtienen los mayores tamaños de partícula, 13 y 13.7 nm respectivamente. Esto se debe a que en estas condiciones se ha producido una

nucleación más lenta, lo que ha permitido el crecimiento de las NPs a un mayor tamaño.

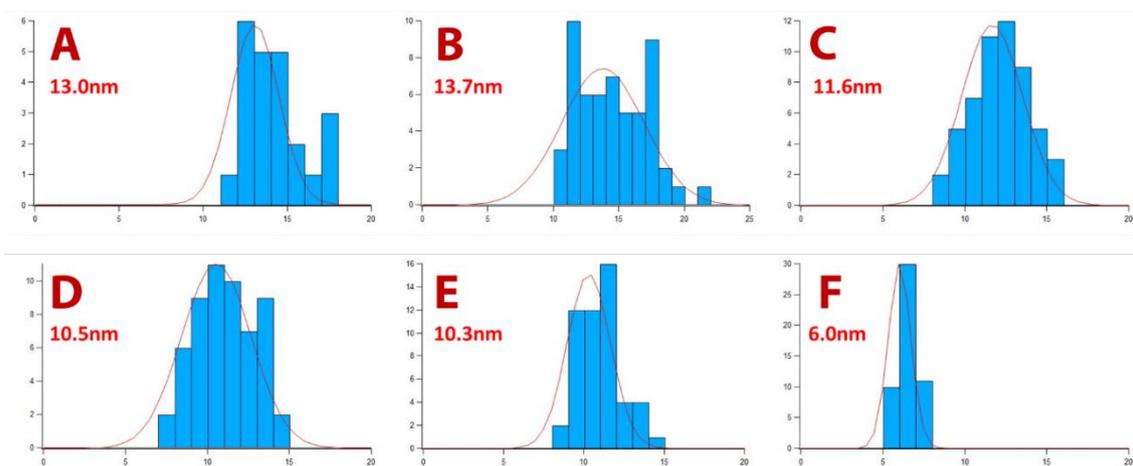
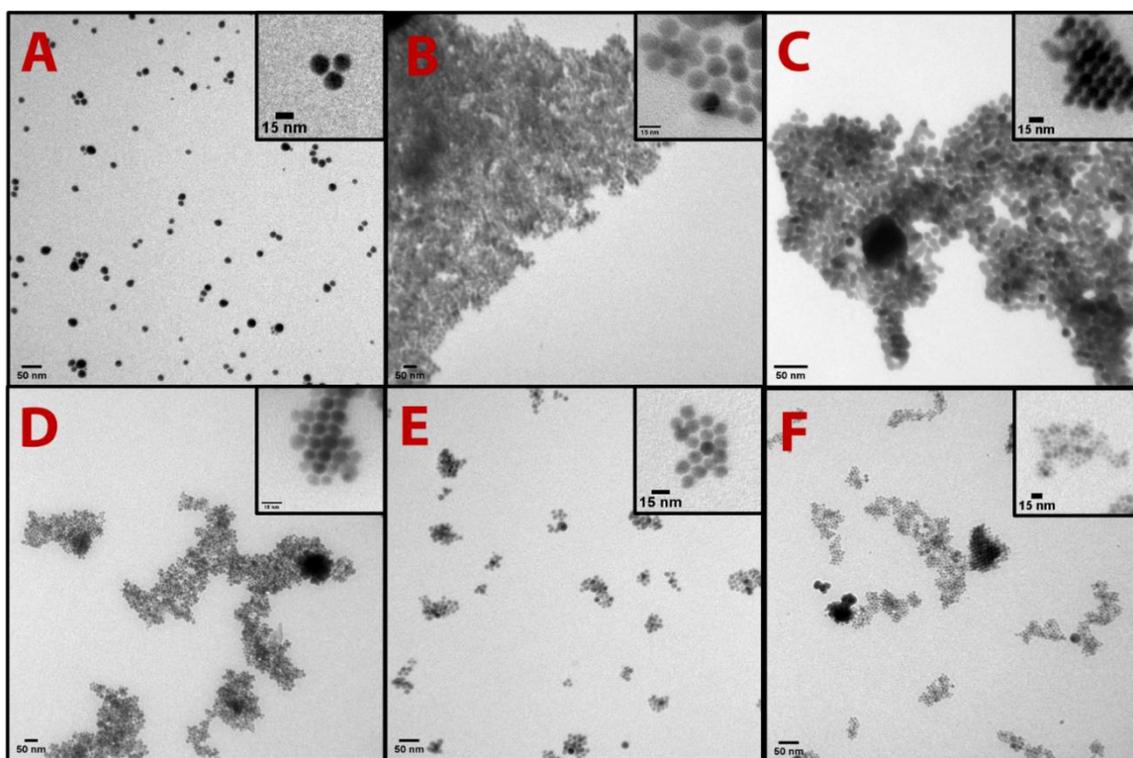


Figura 58. Arriba: visualización al TEM de todas las síntesis realizadas a distinto ratio de mezcla de disolventes. Abajo: histogramas de tamaños de las NPs a diferentes ratios de mezcla de disolventes.

Tabla 8. Tamaño respecto a la relación de disolvente para cada muestra.

Nombre síntesis	Fracción molar del disolvente ( $X_{\text{DDT}}$ )	Tamaño (nm)
A	0	13.0
B	0.15	13.7
C	0.3	11.6
D	0.60	10.5
E	0.9	10.3
F	1	6.0

Las muestras C, D y E tienen tamaños muy similares: 11.6, 10.5 y 10.3 nm, respectivamente. Aquí se relaciona la velocidad de la reacción con el tamaño de partícula, así como la cantidad de DDT en cada reacción.

Por último, la muestra F produce las nanopartículas más pequeñas, este hecho se relaciona con que solo se utiliza DDT como disolvente y nada de OLA, y por tanto se ha producido una reacción mucho más rápida.

En resumen, podemos deducir que el tamaño de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  se controla de forma sencilla cambiando la proporción de disolventes DDT/OLA. Desde el punto de vista estructural, en este estudio se observa una clara disminución del tamaño de las NPs relacionado con un aumento del DDT, lo que se asocia a una mayor estabilización de las NPs pequeñas debido al disolvente portador de grupos tioles (DDT). Esto significa que, en el momento de la nucleación, cuando las NPs son muy pequeñas, al existir una mayor cantidad de grupos tioles debido al disolvente DDT, se produce una reacción más rápida, lo que impide el lento crecimiento de estas, y por tanto quedan estabilizadas con un menor tamaño. Sin embargo, cuando solo se utiliza OLA como disolvente, se da una reacción más lenta, formándose unas NPs de un tamaño mayor, gracias a que el proceso de nucleación es menos reactivo y permite el lento crecimiento.

### II.2.3. Caracterización HAADF-STEM y EDS

Para una mejor comprensión de la estructura cristalina de las NPs, se llevaron a cabo análisis mediante microscopía de difracción de ángulo alto en campo oscuro (HAADF-STEM), y se realizaron mapas de la composición de la muestra (EDS, o también abreviado EDX). En la figura 59 se muestra imágenes representativas tomadas para cada una de las muestras preparadas, agrupadas según la relación de los disolventes DDT/OLA, y nombradas de la A – F (Tabla 7).

Comenzaremos analizando las imágenes HAADF-STEM (figura 59; A1 - F1). Mediante esta técnica, se obtienen imágenes en las que los materiales más electrodensos aparecen en el detector como una señal brillante sobre un fondo oscuro, debido a que el contraste de las fases va a depender del cuadrado de su masa atómica ( $Z^2$ ).

Como se observa, todas los NPs muestran una morfología similar, con dos regiones diferenciadas en cuanto a la electrodensidad. La zona blanca o más clara situada excéntricamente, que corresponde a la parte más electrodensa de las NPs y que absorbe menos electrones. La zona gris o más oscura, que constituye la mayor parte de la NP, es la zona menos electrodensa. Probablemente, la diferencia de zonas se deba a la presencia de plata metálica (zona blanca) y sulfuro de plata (zona gris). Esto se debe a que en el interior de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$  se forman núcleos de plata metálica, los cuales pueden actuar directamente sobre las propiedades luminiscentes de estas. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis de composición mediante EDS, que permitirá determinar que elemento químico predomina en cada región.

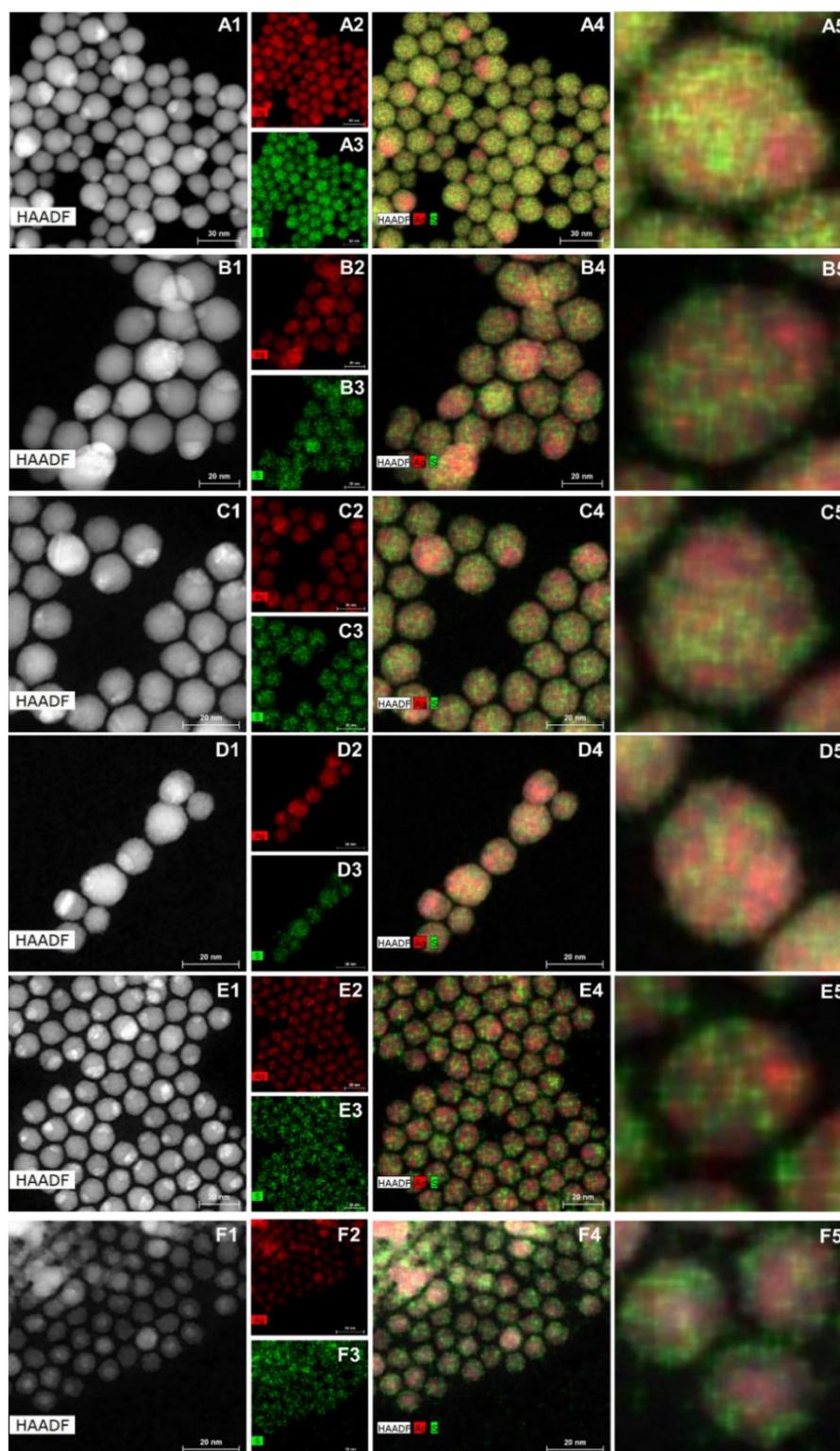


Figura 59. Micrografías HAADF-STEM de NP obtenidas bajo diferentes condiciones sintéticas A1 - F1. Las imágenes A2 - F2 representan la cartografía elemental EDS de la plata, y las A3 - F3 representan la cartografía elemental EDS del azufre. En las imágenes A4 - F4, se muestra la superposición de las imágenes del análisis elemental de HAADF-STEM y EDS y las imágenes A5 - F5 sus aumentos.



A continuación se analizarán los mapas elementales de espectrometría de dispersión de energía (EDS) (Figura 59, A2 a F5), para mostrar la distribución espacial anisotrópica de Ag (rojo) y S (verde) dentro de las NPs. En las imágenes de A – F número 2, se muestra en rojo las regiones enriquecidas en Ag, que se superponen coincidiendo con las regiones que exhiben un mayor contraste Z (regiones blancas en las micrografías HAADF-STEM, A1 – F1). Del mismo modo, en las imágenes de A – F número 3, se muestra en verde las regiones enriquecidas en S, las cuales coinciden con las zonas de menor contraste en las micrografías HAADF-STEM, A1 – F1. Las imágenes correspondientes a – F número 4, son una superposición de las regiones de Ag, S e imágenes HAADF-STEM. Finalmente, de la A – F número 5 es un *zoom* a unas NPs concretas para poder visualizarlas con más detalle. De estas imágenes se pueden obtener las conclusiones de que, aunque la plata se encuentre por la totalidad de las NPs, se observa que en cada una de ellas se ha formado un núcleo predominantemente de plata metálica, recubierto por una capa de sulfuro de plata, por lo que verificamos que hemos obtenido correctamente NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ . Además, existen variaciones en el tamaño y posición del núcleo de plata según la composición de la muestra.

Estudiando las imágenes, podemos observar que el núcleo de plata metálica aparece de manera más excéntrica cuando se utiliza un  $\mathcal{X}_{\text{DDT}}$  más bajo durante la síntesis; es decir, en las muestras A, B y C. De esto se puede deducir que las condiciones de síntesis inducen variaciones en la estructura y propiedades de las NPs sintetizadas. De hecho, la disminución del tamaño total de las NPs está claramente correlacionada con un aumento de  $\mathcal{X}_{\text{DDT}}$  durante la reacción.

Por tanto, ha quedado claro que el tamaño de estos núcleos de plata metálica y de la capa de sulfuro de plata están determinados por la relación de disolventes utilizada. A continuación se estudiará la relación entre  $X_{\text{DDT}}$  utilizada y el tamaño de estos núcleos, para clarificar de qué modo influye la relación de disolventes utilizada.

Para ello, hemos relacionado el tamaño medio de las NPs de cada síntesis con el tamaño medio de la región electrodensa correspondiente con el núcleo de plata. En la figura 60 se representa esta relación, mostrando en verde el tamaño de las NPs completas y en rojo el tamaño de solo la parte del núcleo de plata. Como observamos en la gráfica, el tamaño del núcleo de plata metálica se mantiene prácticamente constante, y lo que varía es el tamaño de la región del sulfuro de plata, lo que va a influir sobre el tamaño final de las NPs.

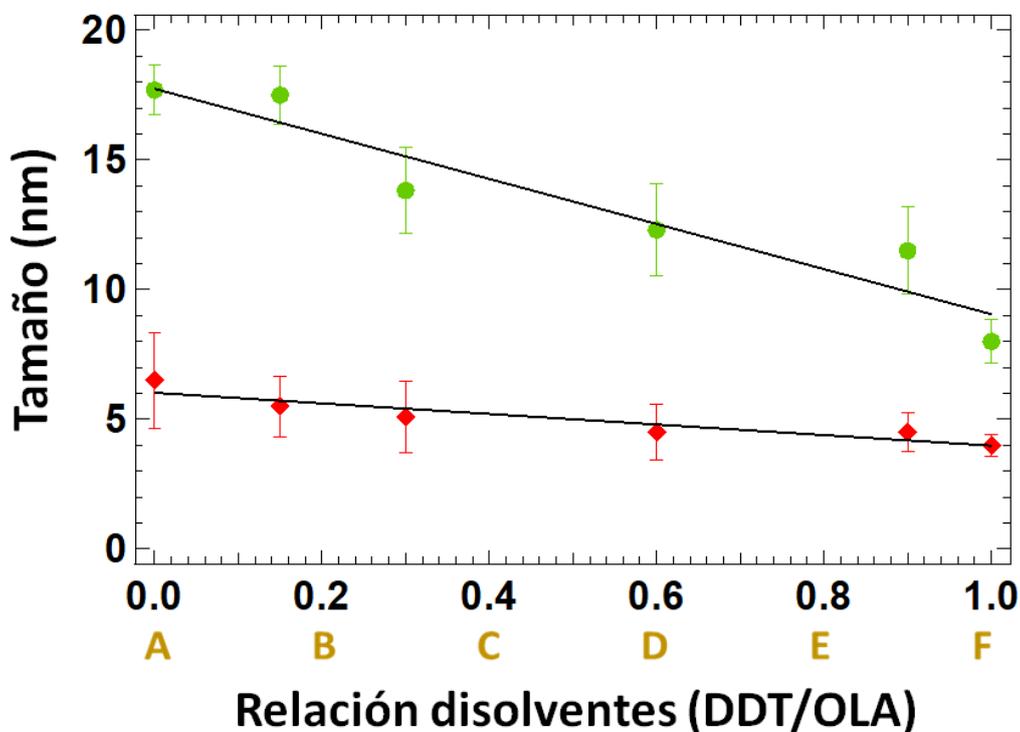


Figura 60. Tamaño medio de las nanopartículas  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  (verde) y de los núcleos de  $\text{Ag}$  (rojo) en función de la relación  $\text{DDT}/\text{OLA}$ .



Las muestras A, B y C, que son las que menos porcentaje de DDT presentan, crecieron hasta un mayor tamaño total de NPs. Por el contrario, las muestras D, E y F, con mayor concentración del disolvente DDT, generaron NPs de menores tamaños. Sin embargo, a pesar de la disparidad del tamaño total de NP, la totalidad de muestras, independientemente de la concentración de DDT/OLA, muestran un tamaño del núcleo de plata metálico de alrededor de 5 nm.

Para explicar estos resultados debemos destacar que el disolvente DDT presenta un grupo tiol, capaz de interactuar con los metales nobles con energías de enlace de alrededor de los 200-300 kJ/mol, y la disociación puede producirse a temperaturas cercanas a los 200 °C. Además, el DDT es un compuesto orgánico de naturaleza poco polar, muy adecuado para el uso como precursor para la generación de metales de tamaño nanométrico.<sup>121</sup>

Por tanto, los tamaños de las NPs obtenidas se relacionan directamente con la capacidad de interacción de los disolventes con los metales nobles. Es decir, debido a que el disolvente DDT posee mayor capacidad para interactuar con las NPs a través del grupo tiol, que presenta una mayor energía de enlace hacia los metales nobles (200 kJ/mol), se van a generar reacciones más rápidas que el disolvente OLA, produciendo por tanto NPs más pequeñas.<sup>122</sup>

En otras palabras, un alta  $\mathcal{X}_{DTT}$  (cantidad elevada de DDT y menor de OLA) da lugar a reacciones de mayor velocidad y estabilidad coloidal de los precursores de las NPs formadas durante la nucleación en el curso de la reacción. Esto resulta en que estas pequeñas NPs, al no encontrarse agregadas, van a dar a lugar a unas NPs finales de menor tamaño (condiciones E y F, Tabla 7).

#### II.2.4. Difracción de rayos X de polvo (XRD)

Para corroborar estos resultados, se realizó un análisis por difracción de rayos X de polvo (XRD), que permite la identificación de la fase de un material cristalino. En la figura 61 se muestra los patrones obtenidos para cada síntesis. Se estudiaron las fases cristalinas de cada síntesis (A – F, Tabla 7) mediante la comparación de las intensidades relativas y las posiciones de las reflexiones con los datos existentes en la base de datos JCPDS (Comité Conjunto de Estándares de Difracción de Polvo, del inglés *Joint Committee for Power Diffraction Sources*).

Los patrones de XRD de estas NPs revelan la presencia de dos fases cristalinas, que podrían atribuirse a la  $\text{Ag}_2\text{S}$  monoclinica y a la Ag cúbica. Si observamos las reflexiones a  $2\theta = 28.97, 31.49, 33.57, 34.48, 34.83$  ó  $36.9$  grados, se pueden asignar a la fase de  $\text{Ag}_2\text{S}$  monoclinica (entrada JCPDS N<sup>o</sup> 14-0072; constantes de red:  $a = 4.229 \text{ \AA}$ ,  $b = 6.931 \text{ \AA}$ , y  $c = 7.862 \text{ \AA}$ ).

Además, podemos observar algunas pequeñas reflexiones a  $2\theta = 38.15$  y  $44.18$  grados, que pueden ser asignadas al Ag metálico cúbico (entrada JCPDS N<sup>o</sup>. 04-0783; constantes de la red:  $a = 4.0862 \text{ \AA}$ ).

Estos patrones de XRD concuerdan con los resultados previos: en las muestras de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$  existe una fase de plata metálica, que se organiza formando un núcleo metálico excéntrico, en el interior de una estructura predominante de sulfuro de plata.

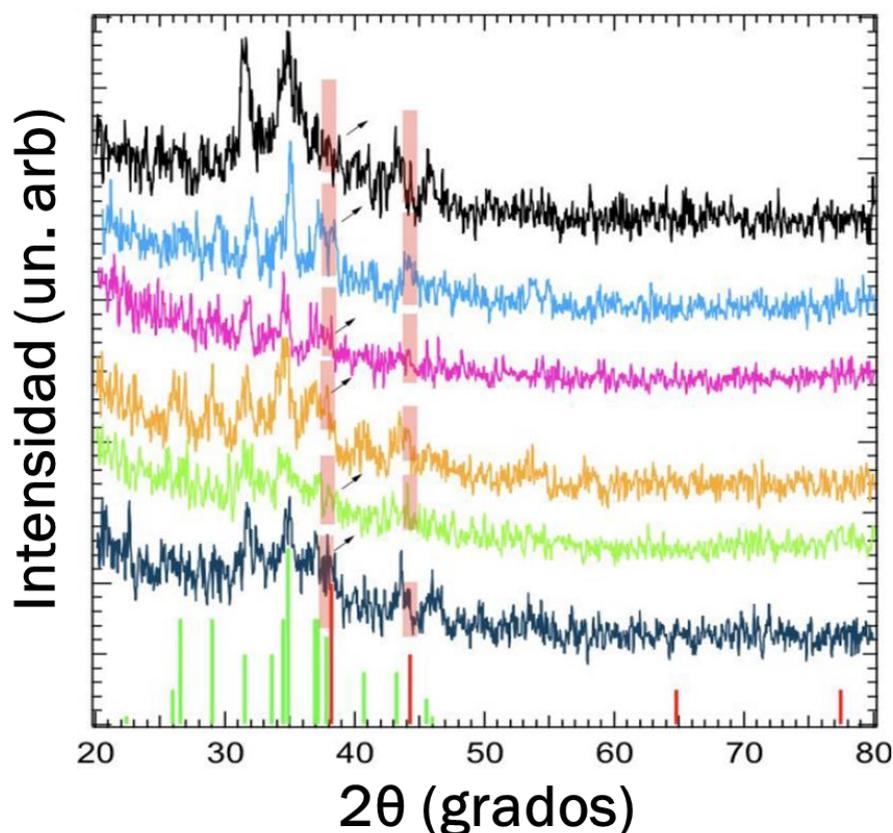


Figura 61. Patrones XRD de nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  sintetizadas usando diferentes ratios entre DDT/OLA: 1 (F) negro, 0.60 (D) azul, 0.15 (B) rosa, 0.9 (E) naranja, 0.3 (C) verde, 0 (A) cian. Las reflexiones atribuidas a la fase cúbica de Ag están resaltadas en rojo. Muestras A – F (Tabla 7).

### II.2.5. Absorción ultravioleta (UV-Vis)

La Figura 62 muestra los espectros de absorción normalizados para todas las muestras en el rango entre 300 y 900 nm. En todos los casos, se observa una fuerte absorción en la región del espectro visible con un hombro débil a 465 nm y una larga cola hasta la región NIR. El hombro a  $\sim 465$  nm puede atribuirse a la contribución plasmónica de la plata metálica presente en las NPs.<sup>123–125</sup>

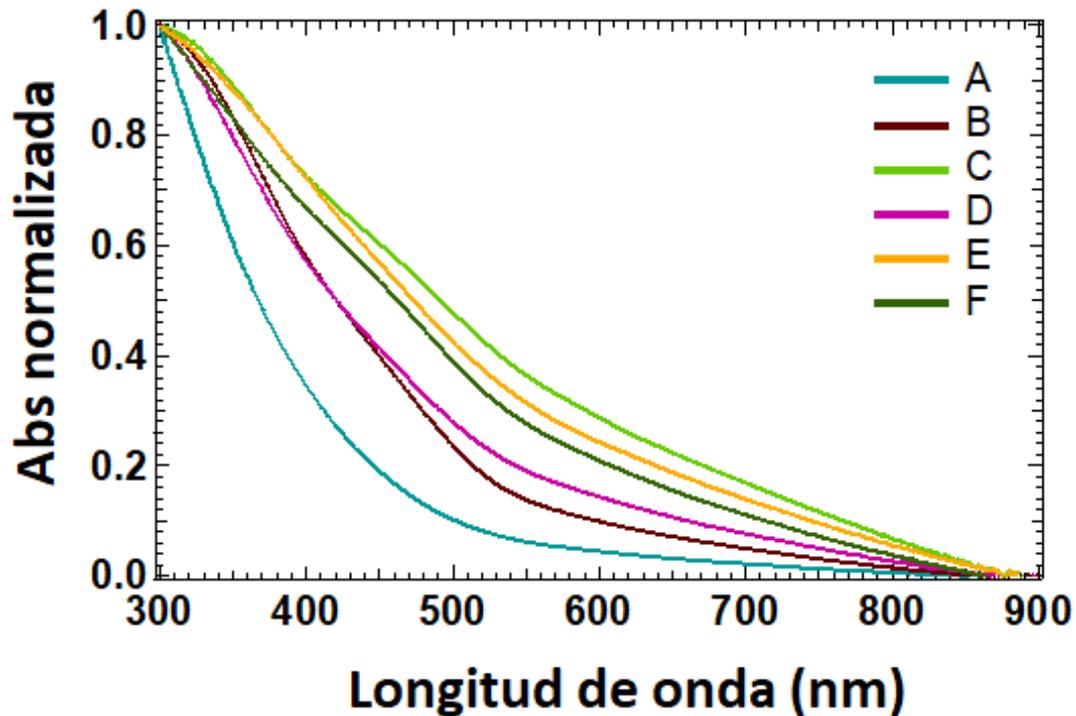


Figura 62. Espectro normalizado de absorción UV para las NPs sintetizadas en los diferentes ratios DDT/OLA. Muestras A – F (Tabla 7).

El hombro a  $\sim 465$  nm puede atribuirse a la contribución plasmónica de la plata metálica presente en las NPs.<sup>123-125</sup> En la figura 63 se representa el fenómeno de resonancia del plasmón superficial localizado de una nanopartículas metálica de tamaño nanométrico. El plasmón superficial localizado se define como la oscilación colectiva de la nube de electrones libres en las cercanías de una superficie metálica. La resonancia del plasmón superficial localizado aporta a los materiales metálicos nanométricos propiedades ópticas únicas, como una mayor capacidad de absorción y esparcimiento de la luz incidente.

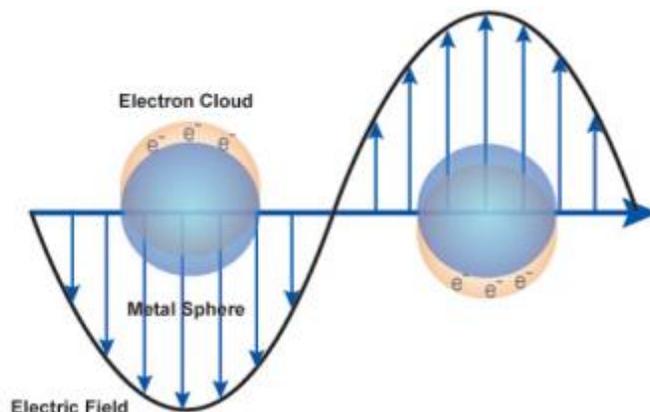


Figura 63. Resonancia del plasmón superficial de la plata. Los electrones libres de la nanopartícula metálica pueden interactuar con la radiación electromagnética de baja frecuencia, y como consecuencia oscilan en resonancia con ésta debido a un fuerte acoplamiento con una longitud de onda específica de la luz incidente.

Como se observa en la figura 62, se destaca que el hombro alrededor de los 400 nm solo aparece en aquella síntesis en las que se ha utilizado OLA. Esto indica la importancia de los grupos amino en la formación de plata metálica durante la síntesis de las NPs a altas temperaturas.<sup>126</sup>

De hecho, es bien sabido que durante la síntesis de las NPs de Ag<sub>2</sub>S mediante la descomposición térmica de un precursor de plata, como el monotiobenzoato de plata o el dietilditiocarbamato de plata, se forman nanocristales de plata metálica como productos secundarios.<sup>127,128</sup> Esto es debido a que en una reacción térmica, se produce preferentemente la rotura de los enlaces Ag-S frente a los enlaces S-C, y por tanto se liberarán iones de Ag<sup>+</sup> en ausencia de azufre reactivo. Si observamos las energías de disociación de enlace Ag-S (206.45 kJ/mol) vemos que es inferior a la del enlace S-C (265.95 kJ/mol).<sup>127</sup>

La adición de alquilaminas -en este caso oleilamina- en la reacción puede llevar a cabo una función activadora, de manera que reduce la energía de disociación de los enlaces S-C del precursor de plata mediante la adición nucleófila de una amina



al sitio del carbono del grupo tiocarbonilo del  $\text{Ag}(\text{DDTC})_2$ . De esta manera, se proporciona una mayor cantidad de azufre reactivo en la reacción, lo que da lugar a un aumento del tamaño de la matriz de  $\text{Ag}_2\text{S}$ .<sup>129</sup>

### II.2.6. Análisis elemental por energía dispersa (EDS)

Para determinar las condiciones de síntesis óptimas para la producción de NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ , se ha analizado la composición de las NPs nombradas con la letra A, D y E en la Tabla 7. Para ello, se ha realizado un perfil de mapeo EDS, el cual permite determinar la composición en cada zona de las NPs, útil para detectar el núcleo de plata metálica respecto a la cobertura de sulfuro de plata. Así, se puede definir perfectamente la composición de cada una de ellas, y poder determinar cuál tendrá mejores propiedades luminiscentes.

Como hemos visto previamente, las condiciones de cada síntesis repercuten directamente sobre el tamaño, forma y posición del núcleo enriquecido con plata metálica, así como la relación atómica de  $\text{Ag}:\text{S}$  dentro de las NPs. Además, las propiedades ópticas del núcleo de plata metálica están relacionadas con su tamaño.<sup>130</sup> Una NP de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  sin irregularidades cabría esperar que obtenga una relación atómica  $\text{Ag}:\text{S}$  de 2:1 o cercana, como se indica en la figura 64.

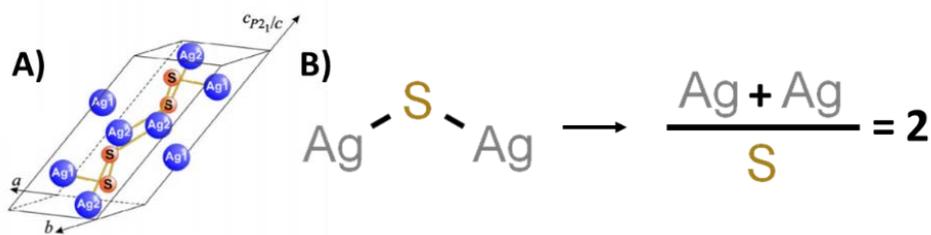


Figura 64. A) Disposición de los átomos de Ag y S en la red cristalina perfecta.<sup>131</sup> B) La relación atómica perfecta Ag:S de una matriz de sulfuro de plata es igual a 2.

A continuación, examinamos los resultados obtenidos del análisis EDS para las síntesis con  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.0, 0.60 y 1.00.

- **Muestra A:  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0**

Mediante el análisis del perfil de rayos X de las NPs sintetizadas con el 100 % OLA ( $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.00 – muestra A; Figura 65) podemos determinar la relación atómica Ag:S en estas NPs, representado en rojo Ag y verde S.

Como se observa en la figura 65 A y B; en las regiones más electrodensas, se obtiene mayor intensidad de Ag que de S, por lo que se confirma que se han generado núcleo enriquecidos en plata metálica.

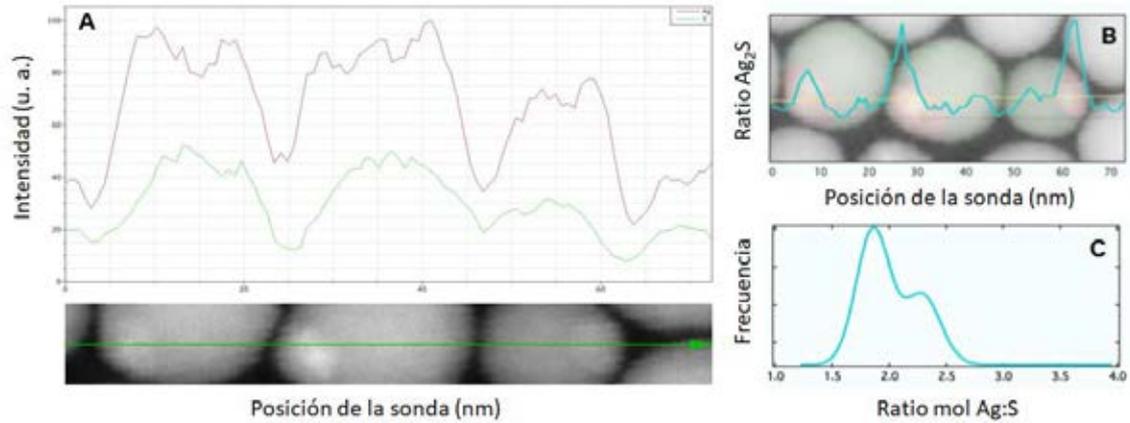


Figura 65. Perfil de mapeo EDS muestra A con  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0. A) Intensidad en u.a. de Ag (rojo) y S (verde) con respecto a la posición de la sonda en la imagen. B) Imágenes STEM junto con la relación Ag:S en cada zona de la NP y frente a la posición de la sonda. C) Distribución de frecuencia de la relación Ag:S en las NPs, excluyendo el núcleo de plata.

Cuando representamos la distribución de frecuencias de la relación Ag:S obtenida en esta síntesis (Figura 65-C), podemos observar la presencia de dos poblaciones gaussianas, una centrada en 1.8 y la otra en 2.2; lo que difiere de una relación teórica de 2, que debería corresponder a una matriz perfecta de  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Esto es debido a la presencia de heterogeneidades en la composición de la matriz de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  que podrían dar lugar a defectos estructurales, formando NPs con peores propiedades ópticas, fundamentales para su utilización en bioimagen.

- **Muestra D:  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.6**

Como es de esperar, cuando en las condiciones de síntesis se utiliza un  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.60 muestra D; se observa que se obtiene un perfil de rayos X diferente de las NPs anteriores (Figura 66).

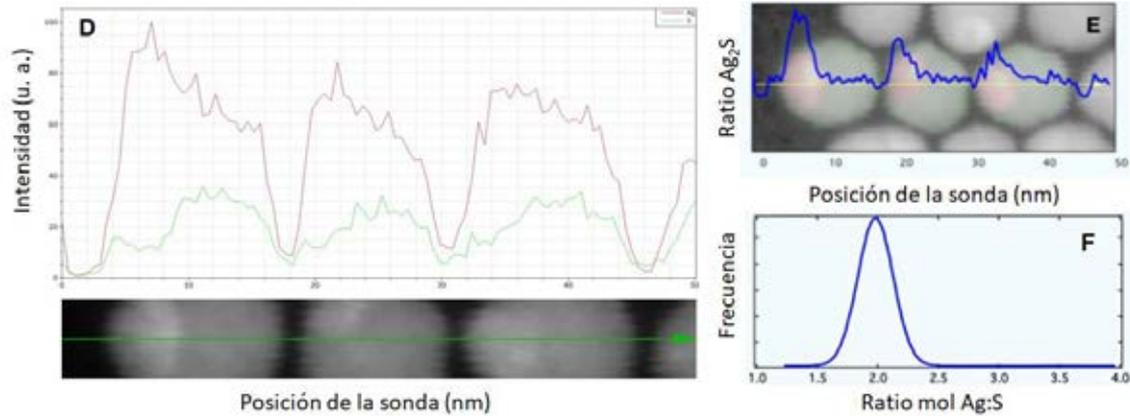


Figura 66. Perfil de mapeo EDS muestra D con  $\chi_{DTT}$  de 0.6. D) Intensidad en u.a. de Ag (rojo) y S (verde) con respecto a la posición de la sonda en la imagen. E) Imágenes STEM junto con la relación Ag:S en cada zona de la NP y frente a la posición de la sonda. F) Distribución de frecuencia de la relación Ag:S en las NPs, excluyendo el núcleo de plata.

Analizando la figura 66 D y E, podemos concluir que hay una diferencia más acusada entre las regiones predominantemente plata y las regiones de sulfuro de plata. Estas NPs están constituidos por una fase predominante de Ag<sub>2</sub>S y una parte de Ag metálica.

Representando la distribución de frecuencias de la relación Ag:S (figura 66-F), obtenemos un valor medio centrado en 1.9; que se acerca más a la relación hipotética de 2 de la matriz perfecta de Ag<sub>2</sub>S. Esto indicaría la reducción de posibles defectos estructurales. Sería de esperar que estas NPs mostrasen mejores propiedades ópticas que las anteriores al no tener heterogeneidades en la matriz de la NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag, lo que se vería reflejado en un incremento de la fluorescencia, así como de la eficiencia cuántica y el tiempo de vida media de fluorescencia.

- *Muestra F:  $X_{DTT}$  de 1*

Finalmente, analizaremos el caso de las NPs sintetizadas en presencia de DDT puro ( $X_{DTT}$  de 1.00 – muestra F; figura 67), es decir, sin presencia del disolvente OLA.

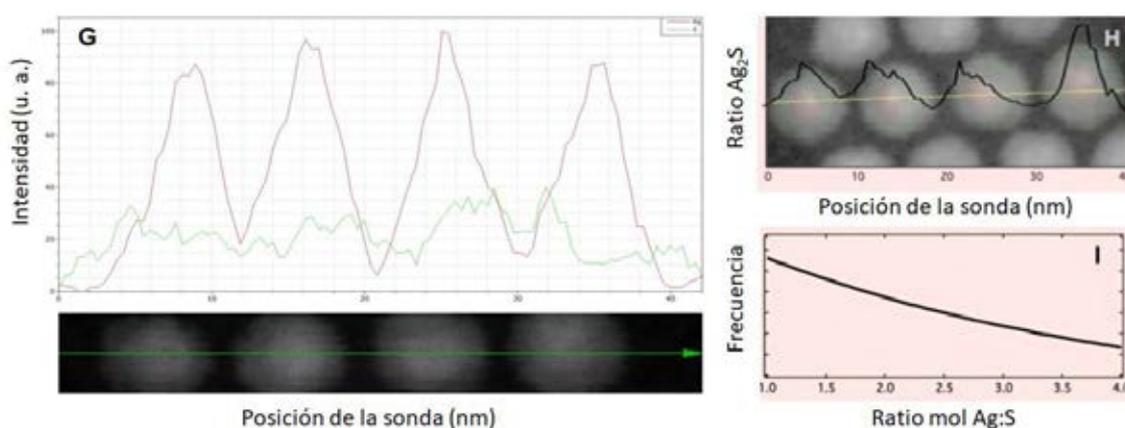


Figura 67. Perfil de mapeo EDS muestra F con  $X_{DTT}$  de 0. G) Intensidad en u.a. de Ag (rojo) y S (verde) con respecto a la posición de la sonda en la imagen. H) Imágenes STEM junto con la relación Ag:S en cada zona de la NP y frente a la posición de la sonda. I) Distribución de frecuencia de la relación Ag:S en las NPs, excluyendo el núcleo de plata.

Observando el perfil de rayos X (figura 67-G), destacamos la presencia de una alta concentración de plata, localizada preferentemente en el núcleo central de las NPs.

Este perfil crea un rápido incremento de la relación atómica Ag:S desde una superficie enriquecida con S hasta un núcleo enriquecido con Ag, lo que da lugar a una región muy pequeña en la que la composición de la matriz podría ser  $Ag_2S$ , como se puede observar en la figura 67-H. Esta relación atómica de Ag:S tan



irregular podría tener consecuencias sobre las propiedades ópticas, disminuyendo la fluorescencia NIR de estas NPs.

Representando la distribución de frecuencias de la relación atómica Ag:S, se observa que no existe ningún máximo cercano a 2, matriz teórica perfecta del cristal de sulfuro de plata, como se grafica en la figura 67-I. Según estas observaciones, se deduce que existe una región delgada de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , que se encuentra rodeada de defectos estructurales de Ag y S. Cabe esperar que estas NPs no tengan buenas propiedades luminiscentes debido a la alta cantidad de defectos en el cristal.

Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis del tiempo de vida media, el rendimiento cuántico y la emisión de fluorescencia en el NIR de todas las NPs sintetizadas. En la figura 68 se muestra los espectros de emisión de fluorescencia en la región NIR después de excitar las muestras a 800 nm. Las muestras analizadas (A – F) pueden consultarse en la tabla 9.

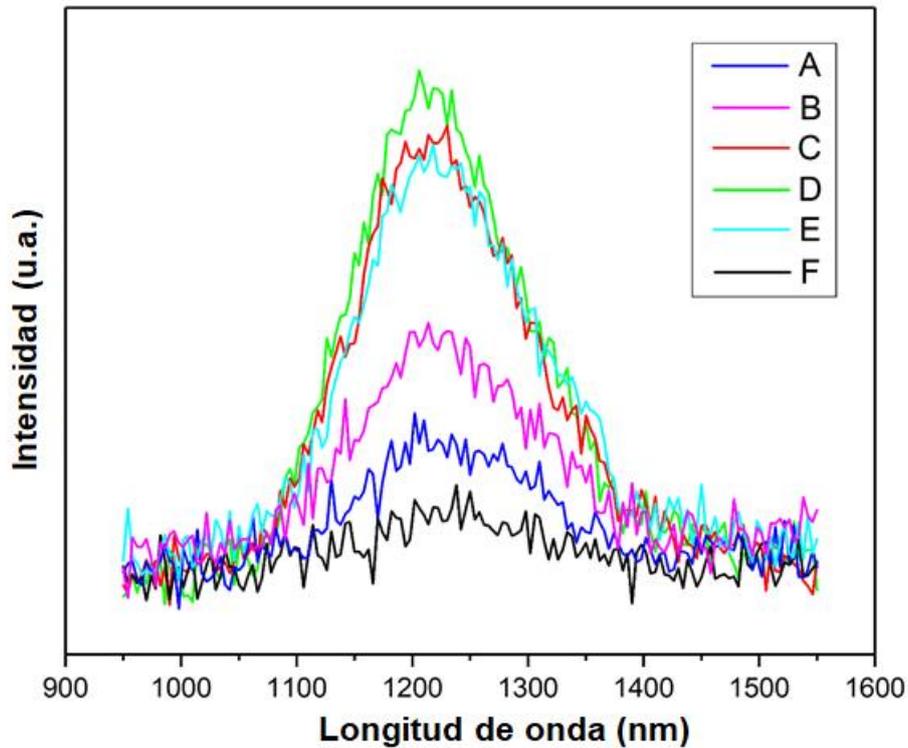


Figura 68. Espectro de emisión fluorescente de las muestras sintetizadas bajo diferentes condiciones de concentración de disolventes.

Se observa un pico máximo a 1220 nm, con un máximo de intensidad de emisión de luminiscencia para la muestra D. Los resultados indican que la variación de las condiciones de síntesis para cada muestra ha generado distintos espectros con distintas intensidades de emisión. Por lo tanto la síntesis que obtuvo mejores características para la utilización en bioimagen fue la muestra D, sintetizada con fracción molar de DDT ( $\chi_{DDT}$ ) de 0.6. Estos resultados concuerdan con lo analizado por los perfiles de EDS, en los que hemos deducido que son las NPs con menos irregularidades en la matriz.

### II.2.7. Transferencia a medio acuoso y funcionalización superficial con PEG

Una vez establecidos los parámetros de la síntesis mediante la que se obtiene las NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag con mejores propiedades lumínicas ( $\chi_{DTT}$  de 0.6) y analizados los resultados de las NPs con mayor QY y tiempo de vida media de luminiscencia, se modificaron en la superficie para que puedan ser utilizados como agentes de contraste *in vivo* en la región NIR-II.

Las NPs sintetizadas se encuentran en un medio hidrófobo, dado que al finalizar la síntesis y, después de eliminar los disolventes (OLA/DDT), se almacenan en cloroformo, por lo que en primer lugar es necesario la transferencia a medio acuoso. Esto se lleva a cabo mediante una reacción de intercambio de ligandos, según el protocolo descrito en la sección experimental 2.4.4: *Transferencia a medio acuoso mediante ácido 11 mercaptoundecanoico (MUA)*.

El proceso de intercambio de ligandos se realizó con la molécula ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), la cual aporta un grupo tiol que se une a la superficie de las NPs; y en el otro extremo de la cadena carbonada posee un grupo carboxílico, que puede adquirir cargas negativas y quedar estabilizado en medio acuoso.

Esta reacción se confirmó mediante mediciones del potencial Z, que dan un valor de  $\sim -27$  mV. El diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) de las NPs funcionalizadas con MUA es de  $14 \pm 7$  nm en PBS. Además, a simple vista se puede observar que las NPs se mantuvieron estables en PBS sin generar agregados ni precipitar, confirmando así de manera instantánea y visual la correcta transferencia a medio

acuoso. En la figura 69 se esquematiza el proceso de transferencia y los resultados obtenidos para las NPs-MUA.

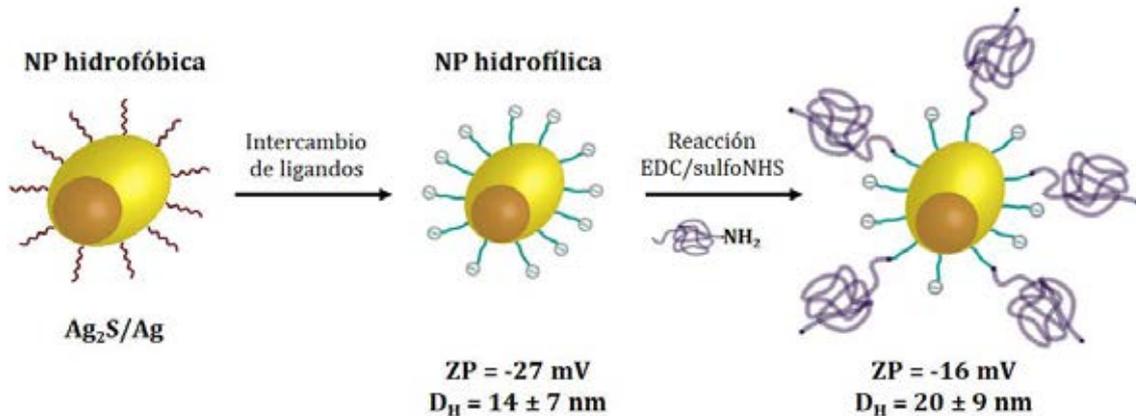


Figura 69. Representación esquemática de la modificación de la superficie de los NP por reacción de enlace e intercambio con el MUA y su posterior PEGilación a través de la reacción de acoplamiento EDC/sulfo-NHS.

Una vez obtenidas las NPs estables en medio acuoso, se procedió a la biofuncionalización con polietilenglicol (PEG) o PEGilación. PEG es un poliéter polimérico con grupos hidroxilos en sus extremos, que es soluble tanto en agua como en muchos disolventes orgánicos. La unión de las moléculas de 2 a 3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno genera un tamaño unas 5 o 10 veces mayor que una proteína soluble de masa molecular comparable.<sup>132</sup>

La principal ventaja de estas propiedad que aporta el PEG, además de la biocompatibilidad, es que se prolonga la circulación de las NPs en la sangre debido a la repulsión estérica de las opsoninas (moléculas, como los anticuerpos, que potencian la fagocitosis), por lo que confiere una mayor longevidad *in vivo* de las NPs. Asimismo, reduce la inmunogenicidad y antigenicidad y mejora la



acumulación en los tumores mediante la reducción de la unión inespecífica a las proteínas de la superficie y la disminución de la captación celular debido al tamaño de las NPs con PEG.<sup>54,61,133-136</sup> Por tanto, la modificación de la superficie con PEG aporta a las NPs la capacidad para el reconocimiento de tumores, la acumulación en estos y la obtención de imágenes *in vivo*.

Para la PEGilación, se siguió el procedimiento detallado en la sección caracterización y métodos 2.4.5: *Funcionalización de la superficie con polietilenglicol (PEG)*. Se partió de los grupos carboxílicos presentes en las MUA-NPs que sirvieron como puntos de anclaje, permitiendo el enlace de las moléculas de PEG-NH<sub>2</sub> (5 kDa) a través del grupo amino terminal, que fueron las empleadas en este proceso. Esta reacción se realizó mediante el método de acoplamiento de carbodiimida mediada por EDC y sulfo-NHS. Se comprobó que la reacción se había llevado a cabo comparando los potenciales zeta y diámetro hidrodinámicos antes y después de la reacción (representados en la figura 69). Así, las NPs PEGiladas producto de esta reacción mostraron un diámetro hidrodinámico de  $20 \pm 9$  nm y un potencial zeta de -16 mV. Las NPs han pasado de -27 mV a -16 mV, gracias a la unión del PEG, pero siguen teniendo carga negativa debido a la presencia de los grupos carboxílicos restantes en la superficie de las NPs que no reaccionaron con PEG, lo que aporta la carga negativa. Además, el tamaño es mayor debido al gran volumen de las moléculas de PEG.

Estas partículas tienen la posibilidad de ser utilizadas *in vivo* como marcador fluorescente para bioimagen o como nanotermómetros luminiscentes en hipertermia. De hecho el estudio de estas NPs se comenzó y se han obtenido los resultados preliminares: previo al estudio *in vivo*, se analizó la citotoxicidad en



cultivos celulares, demostrando que son NPs biocompatibles y por tanto no generan respuesta citotóxica. A continuación, se realizaron ensayos en ratón de las NPs optimizadas y recubiertas con PEG, mostrando una biodistribución por todo el organismo.<sup>120</sup> Las NPs se acumularon preferentemente en los huesos, lo que permite obtener imágenes de alta resolución del esqueleto por medio de imágenes de fluorescencia infrarroja. Además de obtener imágenes avanzadas *in vivo* de la estructura ósea, también puede utilizarse para efectos terapéuticos por su utilidad como nanotermómetros luminiscentes. Esto significa que podrían ser potencialmente utilizados para medir la temperatura del interior del hueso, esencial para lograr un control total sobre las terapias fototérmicas de los huesos, que recientemente han demostrado ser de alta eficacia para promover la regeneración ósea.<sup>120,137-139</sup>

### II.2.8. Síntesis y caracterización de nanopartículas Ag<sub>2</sub>S/Ag@ZnS

Una vez que se ha demostrado el potencial de las NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag para la utilización en bioimagen, se abre un nuevo camino para la mejora de las estrategias de síntesis, con el objetivo de perfeccionar aún más las propiedades luminiscentes. Para tal fin, a continuación, se lleva a cabo el recubrimiento de las NPs con ZnS. El ZnS muestra una baja toxicidad, un bajo coste y una alta estabilidad, por lo que resulta oportuno para la utilización como recubrimiento de la superficie. Asimismo, las estructuras tipo núcleo@corteza mejoran las propiedades luminiscentes de las NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag ya que su recubrimiento en la superficie con una capa inorgánica aislante elimina el efecto *quenching* de la superficie y los defectos estructurales, y además, se disminuye la influencia de los



factores ambientales (como el oxígeno, el pH, etc.), aumentando así el tiempo de vida, el rendimiento cuántico y la estabilidad de las NPs, y por ello, mejoran las características para ser utilizados en bioimagen.<sup>140</sup>

- *Síntesis del precursor Zn(DDTC)<sub>2</sub>*

Para la preparación de nanopartículas Ag<sub>2</sub>S/Ag@ZnS, en primer lugar, es necesario la formación del precursor dietilditiocarbamato de zinc (Zn(DDTC)<sub>2</sub>), el cual se sintetiza siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental 2.4.7: *Síntesis del precursor Zn(DDTC)<sub>2</sub>*. La verificación de la correcta síntesis se realizó mediante FTIR, figura 70, en la que se observan los grupos funcionales asociados al compuesto Zn(DDTC)<sub>2</sub>. Se confirmó que el espectro IR era correcto por comparación con la base de datos espectral para compuestos orgánicos (SDBS No.: 2959).

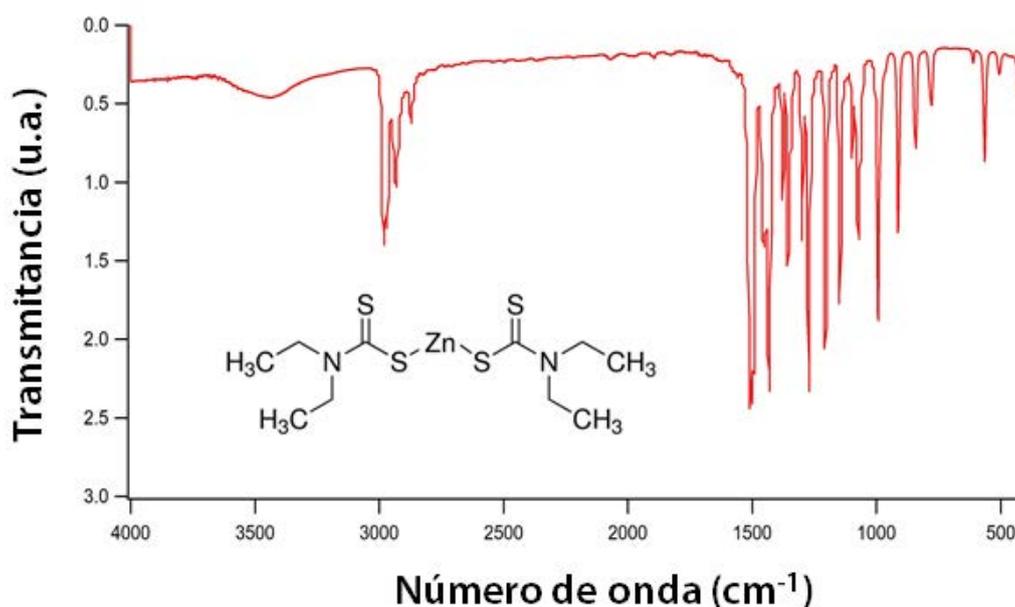


Figura 70: Espectro FTIR del precursor Zn(DDTC)<sub>2</sub>.

Los métodos de síntesis del recubrimiento de la superficie pueden ser mediante inyección en caliente del precursor o el método de no-inyección. En esta Tesis Doctoral se ha seguido el método de inyección en caliente a 210 °C, detallado en la sección experimental 2.4.8: *Síntesis de nanopartículas  $Ag_2S/Ag@ZnS$* . De tal modo, el precursor de  $Zn(DDTC)_2$  preparado se inyectó gota a gota sobre el matraz a 210 °C que contenía el disolvente OLA, para producir la reacción de los núcleos de  $Ag_2S/Ag$  con el recubrimiento de ZnS.

- *Caracterización  $Ag_2S/Ag@ZnS$*

Las NPs sintetizadas fueron visualizadas mediante TEM. Las imágenes obtenidas muestran que se han sintetizado NPs de  $Ag_2S$  con recubrimiento en forma de cabeza-cola de ZnS. Estas estructuras han sido previamente reportadas en otros estudios.<sup>141,142</sup>

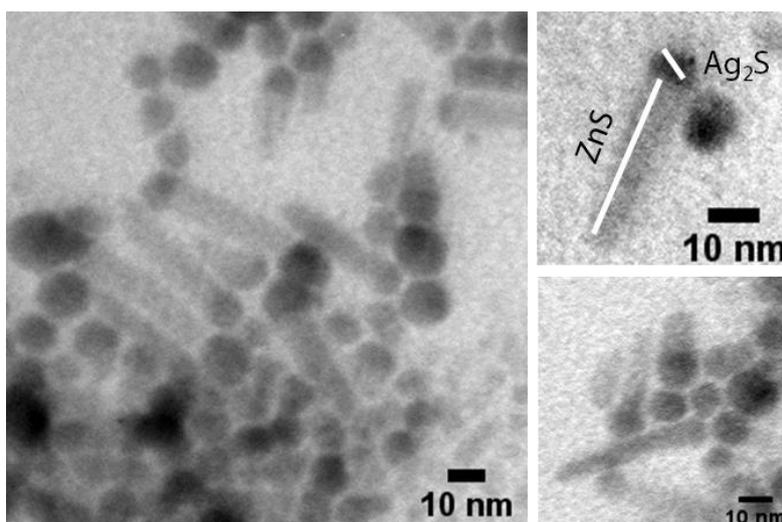


Figura 71. Visualización con microscopía TEM de la síntesis de  $Ag_2S/Ag@ZnS$  y ampliación a zonas donde se observa las tres poblaciones de NPs: NPs con la estructura característica cabeza-cola, núcleos de NPs y NPs con el recubrimiento en crecimiento.

Como se observa en la figura 71, se han obtenido NPs con aspecto de cometa o cabeza-cola (del inglés *head-to-tail*), y NPs circulares. Esto indica que el recubrimiento no se ha realizado al 100 %, y han quedado tres poblaciones de NPs. En figura 72 se esquematiza el proceso de nucleación y posterior crecimiento de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  con recubrimiento en forma de cabeza-cola de  $\text{ZnS}$ .

El tamaño medio de las NPs fue determinado mediante el software ImageJ de las imágenes obtenidas por TEM. La media de tamaño del grupo de NPs sin crecimiento de corteza fue de  $8.23 \pm 1.1$  nm de diámetro;  $18.4 \pm 2.7$  nm de las NPs con recubrimiento en crecimiento y  $37.3 \pm 5.1$  nm de las NPs con forma “head-to-tail” de  $\text{ZnS}$ , como se representa en la figura 72. Por tanto, el crecimiento en tamaño se debe la adición del precursor  $\text{Zn}(\text{DDTC})_2$  que ha generado estas estructuras y que pueden tener un papel fundamental para mejorar las propiedades luminiscentes de los núcleos de  $\text{Ag}_2\text{S}$ .

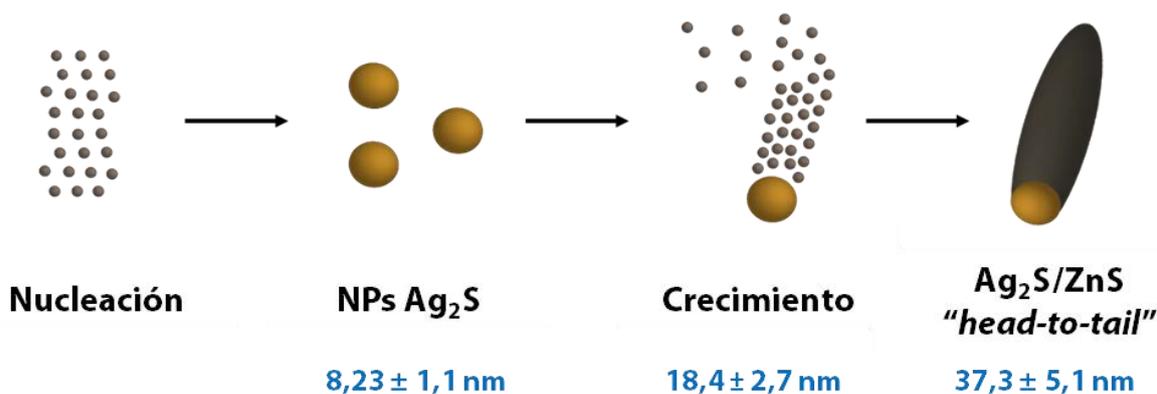


Figura 72. Representación esquemática del proceso de Nucleación y crecimiento de nanopartículas de sulfuro de plata con sulfuro de zinc en forma “cabeza-cola”. Se indica el tamaño medio de cada NPs visualizadas al TEM.

Se ha analizado las NPs sintetizadas midiendo el espectro de absorción UV-Vis. En la figura 73 se representa el resultado obtenido. Se observa a alrededor de 320-350 nm un pico de absorción, que se debe a la presencia de ZnS.<sup>141</sup> Además, por la zona de 400 nm muestra una alta absorción que se puede asociar a la resonancia del plasmón superficial de la plata metálica del núcleo, como se ha explicado previamente.

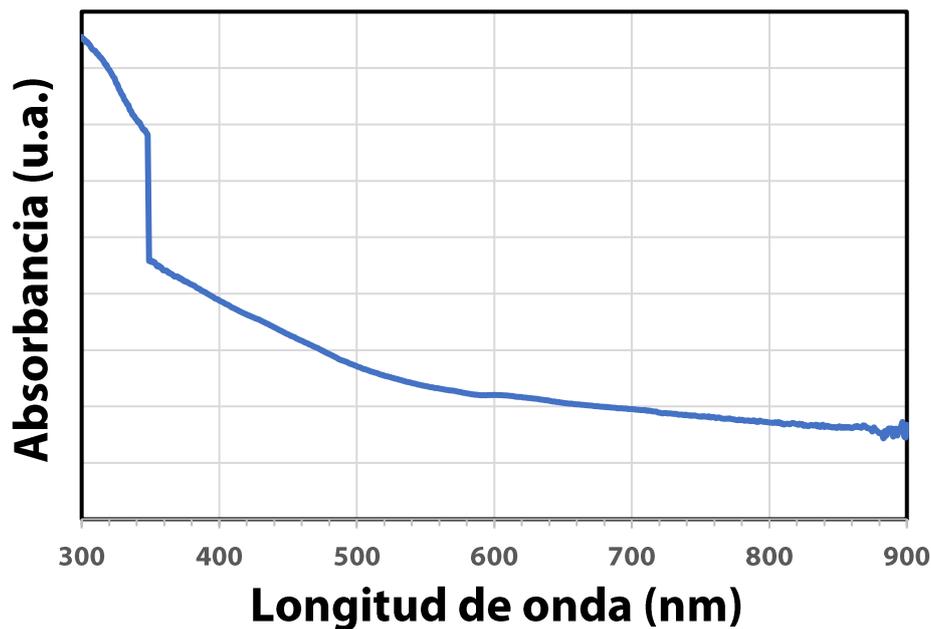


Figura 73. Espectro de absorción UV de las NPs Ag<sub>2</sub>S/Ag@ZnS.

Para determinar la mejora en cuanto a la emisión de fluorescencia en la región del NIR, se ha medido la muestra de NPs de Ag<sub>2</sub>S/Ag puras y recubiertas con ZnS excitándolas a 800 nm. En la figura 74 se representa el espectro de fluorescencia en la región NIR.

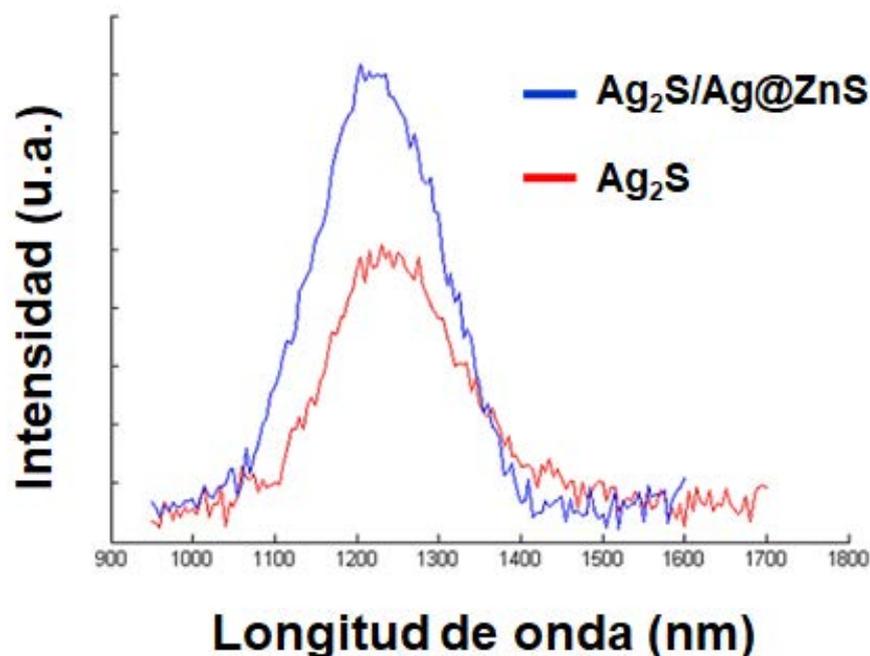


Figura 74. Espectro de emisión de fluorescencia de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$  preparadas. En rojo emisión de NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , en azul emisión NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$ .

Se han sintetizado unas NPs tipo cabeza-cola de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$  en las que el pico de emisión en la región NIR es a 1250 nm. Como se detalla en la gráfica, existe un incremento de emisión de la muestra de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$  respecto a las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Este incremento de la intensidad de emisión de luminiscencia de las muestras medidas indica la formación de la capa de  $\text{ZnS}$ .<sup>111,143</sup> El grosor de la capa de  $\text{ZnS}$ , y la forma en la que se recubren las NPs tiene una gran influencia en las propiedades ópticas. Solo un espesor adecuado de la capa de  $\text{ZnS}$  podría mejorar el rendimiento de la fluorescencia de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$ . En concreto, se ha conseguido disminuir los defectos de la superficie mediante una corteza delgada de  $\text{ZnS}$ , mejorando la emisión de fluorescencia de las NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Sin embargo, cortezas gruesas y mal orientadas disminuirían la emisión de fluorescencia debido al aumento de la compresión de la red.<sup>112</sup>



En conclusión, se ha conseguido optimizar un método de síntesis de estructuras cabeza-cola de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}@\text{ZnS}$  los cuales mejoran las propiedades ópticas de estas, proporcionando numerosas oportunidades para aplicaciones potenciales como bioimagen. Son necesarios estudios futuros de las NPs sintetizadas para determinar la eficiencia cuántica y los tiempos de vida media además de otras caracterizaciones como XRD y EDS. Con este estudio se abre una nueva ruta para la síntesis de NPs núcleo@corteza mediante el control de la reactividad relativa de los precursores y las concentraciones de los disolventes.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Conclusiones*



Con el desarrollo de este trabajo de investigación de Tesis Doctoral en el área de la nanomedicina, se pueden extraer las siguientes conclusiones sintetizadas por capítulos.

### **Capítulo I: Nanopartículas poliméricas sensibles a la temperatura con núcleo magnético para la liberación controlada de fármacos.**

Se han sintetizado una serie de microgeles híbridos con núcleo magnético capaces de responder a la temperatura para el transporte y liberación de fármacos anticancerígenos de manera dirigida. Como resultado de este capítulo se resaltan las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mediante el método de coprecipitación, siguiendo tres enfoques diferentes, incluyendo el TMAOH (en metanol y agua) y el NaOH como bases alcalinas.
- Se ha modificado la superficie de las NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizando ácido but-3-enoico y ácido acrílico, de manera que se ha obtenido un doble enlace terminal en la superficie, fundamental para la polimerización de *p*NIPAM.
- Se han sintetizado microgeles de *p*NIPAM libres altamente monodispersos y estables, optimizando la concentración de monómero y el porcentaje de reticulación.
- Utilizando las NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como núcleo magnético y mediante polimerización de *p*NIPAM por radicales libres, se ha sintetizado un sistema híbrido núcleo@corteza, capaz de responder a la temperatura y el campo magnético.



- Se utilizaron diferentes concentraciones de monómero y de porcentaje de entrecruzante para optimizar el tamaño y la agregación de las MNPs tanto en el exterior como en el interior del microgel.
- Se han sintetizado NPs de *p*NIPAM copoliméricas con ácido but-3-enoico, ácido acrílico y alilamina. Mediante la incorporación de alilamina se ha realizado un marcaje fluorescente de las NPs con FITC.
- Se obtuvieron altas eficiencias de encapsulación para los fármacos 5FU y el OXA en todos los casos estudiados.
- La liberación de los fármacos se realizó contra PBS, obteniendo un mejor comportamiento de liberación de la droga por encima del LCST, ya que el *p*NIPAM está en estado de colapso.

Además, para la publicación del artículo científico con estos resultados, se estudió el comportamiento de los sistemas en ensayos *in vitro*. Es importante destacar que nuestras nuevas nanoformulaciones de *p*NIPAM con núcleo magnético mostraron una gran biocompatibilidad, una excelente capacidad para cargar fármacos específicos contra las células de cáncer de colon y una alta sensibilidad a la temperatura, lo que permite aumentar la liberación de fármacos y mejorar la terapia citotóxica en este tipo de tumor. Estos resultados sugieren la posible aplicación de una terapia combinada (5FU y OXA) utilizando una única nanoformulación que podría ser dirigida directamente al tumor a través de un campo magnético externo. Así pues, los sistemas híbridos presentados poseen aplicaciones potenciales en la administración localizada de fármacos, lo que los convierte en una herramienta muy prometedora para la terapia del cáncer de colon.

## Capítulo II: Nanopartículas de sulfuro de plata para bioimagen por fluorescencia.

Se ha conseguido optimizar las condiciones óptimas para la síntesis de NPs de sulfuro de plata capaces de emitir en la segunda ventana biológica (NIR-II). Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

- Se han sintetizado NPs de  $\text{Ag}_2\text{S}$  mediante el método de descomposición térmica por el precursor  $\text{Ag}(\text{DDTC})$ .
- Se ha evaluado el efecto de la proporción de disolventes de DDT y OLA en la síntesis de las NPs. En total, se probaron seis ratios de disolventes diferentes ( $\mathcal{X}_{\text{DDT}}$  de 0.00, 0.15, 0.30, 0.60, 0.90 y 1.00).
- Los análisis mediante TEM/STEM han determinado una clara disminución del tamaño de las NPs relacionado con el aumento de la proporción de DDT. Este efecto se ha correlacionado con una estabilización más pronunciada de las NPs más pequeñas por el disolvente DDT portador del grupo tiol.
- Mediante el mapeo EDS de las NPs generadas utilizando  $\mathcal{X}_{\text{DDT}}$  de 0.00, 0.60 y 1.00, se ha conseguido correlacionar claramente las propiedades fotoluminiscentes mejoradas con una relación más precisa de Ag y S en la matriz final de la NP.
- Se ha conseguido la modificación de la superficie de las NPs con MUA y la posterior transferencia a disolución acuosa, obteniendo una muestra estable y totalmente soluble en agua.
- Las NPs solubles en agua se han recubierto en la superficie con PEG para los posteriores ensayos *in vitro* e *in vivo*.



Los análisis realizados de las propiedades luminiscentes mostraron que las NPs sintetizadas con un  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.60 obtuvieron un máximo de duración de luminiscencia de 1200 ns en comparación con los tiempos de vida de 120 y 180 ns para las NPs sintetizadas con  $\mathcal{X}_{DTT}$  de 0.00 y 1.00, respectivamente. Además se determinó que tenían una eficiencia cuántica de 2.3 %; valor 10 veces superior a las NPs sintetizadas con los disolventes puros. Estos resultados concuerdan con la optimización conseguida en la síntesis para conseguir las propiedades deseadas mediante el control exhaustivo del proceso de síntesis de las NPs, mostrándose como potenciales agentes de imagen de contraste, gracias a las propiedades ópticas y la excelente biodistribución. Es decir, el punto clave para la síntesis de NPs con la composición química deseada es la capacidad de controlar la distribución de tamaños, forma, composición, estructura y propiedades de la superficie de las NPs resultantes.

Además, estudios posteriores demostraron el potencial para el desarrollo del diagnóstico *in vivo* dado que permitieron obtener imágenes de alto contraste en ratones, resultados publicados en un artículo científico junto a los aquí presentados.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# *Bibliografía*



1. Sahoo, S. K., Parveen, S. & Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 20–31 (2007).
2. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **116**, 2826–2885 (2016).
3. Chang, E. H. *et al.* Nanomedicine: Past, present and future – A global perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 511–517 (2015).
4. Soares, S., Sousa, J., Pais, A. & Vitorino, C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front. Chem.* **6**, 1–15 (2018).
5. Bor, G., Mat Azmi, I. D. & Yaghmur, A. Nanomedicines for cancer therapy: current status, challenges and future prospects. *Ther. Deliv.* **10**, 113–132 (2019).
6. Kamal, M. A. *et al.* Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 4391 (2012).
7. Wolfram, J. & Ferrari, M. Clinical cancer nanomedicine. *Nano Today* **25**, 85–98 (2019).
8. Martínez-Carmona, M., Colilla, M. & Vallet-Regí, M. Smart Mesoporous Nanomaterials for Antitumor Therapy. *Nanomaterials* **5**, 1906–1937 (2015).
9. Kang, H. *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale* **7**, 18848–18862 (2015).
10. Moehler, M., Teufel, A. & Galle, P. R. New Chemotherapeutic Strategies in Colorectal Cancer. *Rectal Cancer Treat.* **165**, 250–259 (2005).
11. Ghiringhelli, F. & Apetoh, L. Enhancing the anticancer effects of 5-

- fluorouracil: Current challenges and future perspectives. *Biomed. J.* **38**, 111–116 (2015).
12. Wang, J. *et al.* 5-Fluorouracil targets thymidylate synthase in the selective suppression of TH17 cell differentiation. *Oncotarget* **7**, 19312–19326 (2016).
  13. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
  14. Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J. & Chen, W.-S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* **13**, 1551–1569 (2008).
  15. Blanco, M. D. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of a folate-targeted copolymeric submicrohydrogel based on N-isopropylacrylamide as 5-fluorouracil delivery system. *Polymers*. **3**, 1107–1125 (2011).
  16. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37 (2017).
  17. Perego, P. & Robert, J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 5–18 (2016).
  18. Arango, D. *et al.* Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* **91**, 1931–1946 (2004).
  19. Griffith, K. A. *et al.* Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy and Identification of Unique Severity Groups in Colorectal Cancer. *J. Pain Symptom Manage.* **54**, 701-706.e1 (2017).
  20. Paraskar, A., Soni, S., Roy, B., Papa, A. L. & Sengupta, S. Rationally designed oxaliplatin-nanoparticle for enhanced antitumor efficacy.

*Nanotechnology* **23**, 075103 (2012).

21. Patil, A. S., Gadad, A. P., Hiremath, R. D. & Joshi, S. D. Biocompatible tumor micro-environment responsive CS-g-PNIPAAm co-polymeric nanoparticles for targeted Oxaliplatin delivery. *J. Polym. Res.* **25**, (2018).
22. Xiao, H. *et al.* Co-delivery of daunomycin and oxaliplatin by biodegradable polymers for safer and more efficacious combination therapy. *J. Control. Release* **163**, 304–314 (2012).
23. Abu Lila, A. S., Eldin, N. E., Ichihara, M., Ishida, T. & Kiwada, H. Multiple administration of PEG-coated liposomal oxaliplatin enhances its therapeutic efficacy: A possible mechanism and the potential for clinical application. *Int. J. Pharm.* **438**, 176–183 (2012).
24. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K. & Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **116**, 3436–3486 (2016).
25. Zhao, N. *et al.* Versatile Types of Organic/Inorganic Nanohybrids: From Strategic Design to Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **119**, 1666–1762 (2019).
26. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: Pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
27. Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
28. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and

- biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
29. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 397–415 (2008).
30. Li, K., Nejadnik, H. & Daldrup-Link, H. E. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. *Drug Discov. Today* **22**, 1421–1429 (2017).
31. Zhu, L., Zhou, Z., Mao, H. & Yang, L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine* **12**, 73–87 (2017).
32. Wu, K., Su, D., Liu, J., Saha, R. & Wang, J. P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. *Nanotechnology* **30**, (2019).
33. Weissleder, R. *et al.* Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* **175**, 489–493 (1990).
34. Jeon, M., Halbert, M. V., Stephen, Z. R. & Zhang, M. Iron Oxide Nanoparticles as T1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives. *Adv. Mater.* **1906539**, 1–18 (2020).
35. Dias, C. S. B. *et al.* Shape Tailored Magnetic Nanorings for Intracellular Hyperthermia Cancer Therapy. *Sci. Rep.* **7**, 14843 (2017).
36. Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O. & Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**, 8–23 (2011).



37. Ali, I. *et al.* Progress in Polymeric Nano-Medicines for Theranostic Cancer Treatment. *Polymers*. **12**, 598 (2020).
38. Sawai, T., Yamazaki, S., Ikariyama, Y. & Aizawa, M. pH-Responsive Swelling of the Ultrafine Microsphere. *Macromolecules* **24**, 2117–2118 (1991).
39. Schild, H. G. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* **17**, 163–249 (1992).
40. Rodkate, N. & Rutnakornpituk, M. Multi-responsive magnetic microsphere of poly(N-isopropylacrylamide)/carboxymethylchitosan hydrogel for drug controlled release. *Carbohydr. Polym.* **151**, 251–259 (2016).
41. Garcia-Pinel, B. *et al.* Magnetically active pNIPAM nanosystems as temperature-sensitive biocompatible structures for controlled drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **48**, 1022–1035 (2020).
42. Halperin, A., Kröger, M. & Winnik, F. M. Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 15342–15367 (2015).
43. Jain, K., Vedarajan, R., Watanabe, M., Ishikiriya, M. & Matsumi, N. Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polym. Chem.* **6**, 6819–6825 (2015).
44. Rejinold, N. S., Baby, T., Chennazhi, K. P. & Jayakumar, R. Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for breast cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **114**, 209–217 (2014).
45. Zhang, Y. & Cremer, P. S. Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes.

*Annu. Rev. Phys. Chem.* **61**, 63–83 (2010).

46. Su, W., Yang, M., Zhao, K. & Ngai, T. Influence of Charged Groups on the Structure of Microgel and Volume Phase Transition by Dielectric Analysis. *Macromolecules* **49**, 7997–8008 (2016).
47. Kyrey, T. *et al.* Mobility of bound water in PNIPAM microgels. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**, 14252–14259 (2021).
48. Thanh, N. T. K. & Green, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* **5**, 213–230 (2010).
49. Jafari, S., Derakhshankhah, H., Alaei, L. & Fattahi, A. Biomedicine & Pharmacotherapy Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic / diagnostic applications. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 1100–1111 (2019).
50. Uhl, B. *et al.* The Endothelial Glycocalyx Controls Interactions of Quantum Dots with the Endothelium and Their Translocation across the Blood-Tissue Border. *ACS Nano* **11**, 1498–1508 (2017).
51. Jing, L. *et al.* Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals. *Chem. Rev.* **116**, 10623–10730 (2016).
52. Smith, B. R. & Gambhir, S. S. Nanomaterials for In Vivo Imaging. *Chem. Rev.* **117**, 901–986 (2017).
53. Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G. & Kim, J. H. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 1603–1611 (2015).
54. Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R. & Pazos-Perez, N. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials* . **11**, 1154 (2018).



55. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 5577–5591 (2012).
56. Krasnici, S. *et al.* Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J. Cancer* **105**, 561–567 (2003).
57. Cheng, M. J., Kumar, R., Sridhar, S., Webster, T. J. & Ebong, E. E. Endothelial glycocalyx conditions influence nanoparticle uptake for passive targeting. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 3305–3315 (2016).
58. Bertoli, F., Garry, D., Monopoli, M. P., Salvati, A. & Dawson, K. A. The Intracellular Destiny of the Protein Corona: A Study on its Cellular Internalization and Evolution. *ACS Nano* **10**, 10471–10479 (2016).
59. Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **307**, 93–102 (2006).
60. Bohara, R. A., Thorat, N. D. & Pawar, S. H. Role of functionalization: Strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *RSC Adv.* **6**, 43989–44012 (2016).
61. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
62. Mishra, P., Nayak, B. & Dey, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian J. Pharm. Sci.* **11**, 337–348 (2016).
63. Friedman, A., Claypool, S. & Liu, R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6315–6329 (2013).
64. Tee, J. K. *et al.* Nanoparticles' interactions with vasculature in diseases.

*Chem. Soc. Rev.* **48**, 5381–5407 (2019).

65. Kumar, P. & Srivastava, R. *Nanomedicine for Cancer Therapy*. (Springer International Publishing, 2017).
66. Zhang, J. Y., Hwang, J., Isaac, B. J. & Stemmer, S. Variable-angle high-angle annular dark-field imaging: Application to three-dimensional dopant atom profiling. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
67. Laurenti, M. *et al.* Synthesis of thermosensitive microgels with a tunable magnetic core. *Langmuir* **27**, 10484–10491 (2011).
68. Contreras-Cáceres, R. *et al.* Multifunctional microgel magnetic/optical traps for SERS ultradetection. *Langmuir* **27**, 4520–4525 (2011).
69. Shao, X., Dai, B., Zhang, X. & Ma, Y. Synthesis and Microwave Absorption Properties of Magnetite Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **12**, 1122–1127 (2012).
70. Vikesland, P. J., Rebodos, R. L., Bottero, J. Y., Rose, J. & Masion, A. Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *Environ. Sci. Nano* **3**, 567–577 (2016).
71. Du, Y. *et al.* Near-Infrared Photoluminescent Ag<sub>2</sub>S Quantum Dots from a Single Source Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1470–1471 (2010).
72. Darge, H. F., Andrgie, A. T., Tsai, H. C. & Lai, J. Y. Polysaccharide and polypeptide based injectable thermo-sensitive hydrogels for local biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **133**, 545–563 (2019).
73. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).



74. Zare, E. N. *et al.* Metal-Based Nanostructures/PLGA Nanocomposites: Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Their Biomedical Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 3279–3300 (2020).
75. Hosseini, L., Mahboobnia, K. & Irani, M. Fabrication of PLA/MWCNT/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite nanofibers for leukemia cancer cells. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **65**, 176–182 (2016).
76. Pelton, R. H. & Chibante, P. Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces* **20**, 247–256 (1986).
77. Haq, M. A., Su, Y. & Wang, D. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 842–855 (2017).
78. Karimi, M. *et al.* Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21107–21133 (2016).
79. Wen, Y. *et al.* A responsive porous hydrogel particle-based delivery system for oncotherapy. *Nanoscale* **11**, 2687–2693 (2019).
80. Li, P., Hou, X., Qu, L., Dai, X. & Zhang, C. PNIPAM-MAPOSS Hybrid Hydrogels with Excellent Swelling Behavior and Enhanced Mechanical Performance: Preparation and Drug Release of 5-Fluorouracil. *Polymers*. **10**, 137 (2018).
81. Patil, A. S. & Gadad, A. P. Development and Evaluation of High Oxaliplatin Loaded CS-g-PNIPAAm Co-Polymeric Nanoparticles for Thermo and pH Responsive Delivery. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **52**, 62–70 (2018).
82. Peng, J. *et al.* Controlled release of cisplatin from pH-thermal dual

- responsive nanogels. *Biomaterials* **34**, 8726–8740 (2013).
83. Lee, J. S., Koehorst, R. B. M., Van Amerongen, H. & Feijen, J. Time-resolved fluorescence and fluorescence anisotropy of fluorescein-labeled poly(N-isopropylacrylamide) incorporated in polymersomes. *J. Phys. Chem. B* **115**, 13162–13167 (2011).
84. Quan, C. Y. *et al.* Dual targeting of a thermosensitive nanogel conjugated with transferrin and RGD-containing peptide for effective cell uptake and drug release. *Nanotechnology* **20**, (2009).
85. Xu, X. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive composite hydrogels for biomedical applications. *Polymers*. **12**, 1–22 (2020).
86. Sahoo, B. *et al.* Thermal and pH responsive polymer-tethered multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery of anticancer drug. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 3884–3893 (2013).
87. Campbell, S. B., Patenaude, M. & Hoare, T. Injectable superparamagnets: Highly elastic and degradable poly(N-isopropylacrylamide)-superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) composite hydrogels. *Biomacromolecules* **14**, 644–653 (2013).
88. Massoumi, B., Poorgholy, N. & Jaymand, M. Multistimuli responsive polymeric nanosystems for theranostic applications. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **66**, 38–47 (2017).
89. Shen, B., Ma, Y., Yu, S. & Ji, C. Smart Multifunctional Magnetic Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Cancer Thermo-Chemotherapy and Intracellular Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 24502–24508 (2016).



90. Kim, H. *et al.* Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid-conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
91. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
92. Contreras-Cáceres, R. *et al.* Growing Au/Ag nanoparticles within microgel colloids for improved surface-enhanced Raman scattering detection. *Chem. - A Eur. J.* **16**, 9462–9467 (2010).
93. Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. & Bao, G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* **11**, 673–692 (2016).
94. Bachman, H. *et al.* Ultrasoft, highly deformable microgels. *Soft Matter* **11**, 2018–2028 (2015).
95. Brugnoni, M. *et al.* Synthesis and structure of deuterated ultra-low cross-linked poly( N -isopropylacrylamide) microgels. *Polym. Chem.* **10**, 2397–2405 (2019).
96. Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. (Cornell University Press, 1953).
97. Chen, Z. Y. *et al.* Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
98. Chalfe, M. *et al.* Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Fed. Eur. Biochem. Lett.* **341**, 277–280 (1994).
99. Lustig, W. P. *et al.* Metal-organic frameworks: Functional luminescent and

photonic materials for sensing applications. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 3242–3285 (2017).

100. Hong, G., Antaris, A. L. & Dai, H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 10 (2017).
101. Del Rosal, B., Villa, I., Jaque, D. & Sanz-Rodríguez, F. In vivo autofluorescence in the biological windows: the role of pigmentation. *J. Biophotonics* **9**, 1059–1067 (2016).
102. Yang, F., Zhang, Q., Huang, S. & Ma, D. Recent advances of near infrared inorganic fluorescent probes for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **8**, 7856–7879 (2020).
103. Frangioni, J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 626–634 (2003).
104. Hong, G. *et al.* Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence. *Nat. Med.* **18**, 1841–1846 (2012).
105. Lee, D. E. *et al.* Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2656–2672 (2012).
106. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. & Alivisatos, A. P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*. **281**, 2013–2016 (1998).
107. Spanhel, L., Haase, M., Weller, H. & Henglein, A. Photochemistry of colloidal semiconductors. 20. Surface modification and stability of strong luminescing CdS particles. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5649–5655 (1987).
108. Hong, G. *et al.* Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. *Nat. Photonics* **8**, 723–730 (2014).



109. Li, D. *et al.* Excretable Lanthanide Nanoparticle for Biomedical Imaging and Surgical Navigation in the Second Near-Infrared Window. *Adv. Sci.* **6**, (2019).
110. Zhang, M. *et al.* Bright quantum dots emitting at  $\sim 1,600$  nm in the NIR-IIb window for deep tissue fluorescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 6590–6595 (2018).
111. Ovchinnikov, O. V. *et al.* Luminescence of colloidal Ag<sub>2</sub>S/ZnS core/shell quantum dots capped with thioglycolic acid. *J. Lumin.* **220**, 117008 (2020).
112. Zeng, Y. *et al.* Interfacial Synthesis of Ag<sub>2</sub>S/ZnS Core/Shell Quantum Dots in a Droplet Microreactor. *ChemistrySelect* **5**, 5889–5894 (2020).
113. Sadovnikov, S. I. & Popov, I. D. Optical Properties of Zinc Sulfide Nanopowders and ZnS/Ag<sub>2</sub>S Heteronanostructures. *Phys. Solid State* **62**, 2004–2011 (2020).
114. Santos, H. D. A. *et al.* Ultrafast photochemistry produces superbright short-wave infrared dots for low-dose in vivo imaging. *Nat. Commun.* 1–12 (2020).
115. Karimipour, M., Izadian, L. & Molaei, M. Reviving near infra-red emission of Ag<sub>2</sub>S nanoparticles using interfacial defects in the Ag<sub>2</sub>S@CdS core-shell structure. *Luminescence* **33**, 202–208 (2018).
116. Karimipour, M., Keshavarz, A. & Molaei, M. Stabilizing NIR emission of Ag<sub>2</sub>S quantum dots in water using SnS<sub>2</sub> Shell. *J. Lumin.* **195**, 339–343 (2018).
117. Tang, R. *et al.* Tunable ultras-small visible-to-extended near-infrared emitting silver sulfide quantum dots for integrin-targeted cancer imaging.

- ACS Nano 9, 220–230 (2015).
118. He, H. *et al.* Synthesis and characterization of robust Ag<sub>2</sub>S/Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> composite microrods with enhanced photocatalytic performance. *J. Mater. Res.* **31**, 2598–2607 (2016).
119. Karimipour, M., Moradi, N. & Molaei, M. Strong NIR luminescent Ag<sub>2</sub>S@ZnS core-shells synthesized by a novel one pot pulsed microwave irradiation. *J. Lumin.* **182**, 91–97 (2017).
120. Ortega-Rodríguez, A. *et al.* 10-Fold Quantum Yield Improvement of Ag<sub>2</sub>S Nanoparticles by Fine Compositional Tuning. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 12500–12509 (2020).
121. Carotenuto, G., Giannini, C., Siliqi, D. & Nicolais, L. Nanocomposites Based on Metal and Metal Sulfide Clusters Embedded in Polystyrene. *Polymers*. **3**, 1352–1362 (2011).
122. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103–1170 (2005).
123. Serrano-Montes, A. B. *et al.* A General Method for Solvent Exchange of Plasmonic Nanoparticles and Self-Assembly into SERS-Active Monolayers. *Langmuir* **31**, 9205–9213 (2015).
124. Mogensen, K. B. & Kneipp, K. Size-dependent shifts of plasmon resonance in silver nanoparticle films using controlled dissolution: Monitoring the onset of surface screening effects. *J. Phys. Chem. C* **118**, 28075–28083 (2014).
125. Loiseau, A. *et al.* Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in

- biosensing. *Biosensors* **9**, 1–40 (2019).
126. Liu, W. *et al.* Controlled formation of Ag<sub>2</sub>S/Ag Janus nanoparticles using alkylamine as reductant surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **544**, 111–117 (2018).
127. Tang, Q. *et al.* Selective degradation of chemical bonds: From single-source molecular precursors to metallic Ag and semiconducting Ag<sub>2</sub>S nanocrystals via instant thermal activation. *Langmuir* **22**, 2802–2805 (2006).
128. Du, Y. *et al.* Near-Infrared Photoluminescent Ag<sub>2</sub>S Quantum Dots from a Single Source Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1470–1471 (2010).
129. Lim, W. P., Zhang, Z., Low, H. Y. & Chin, W. S. Preparation of Ag<sub>2</sub>S nanocrystals of predictable shape and size. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 5685–5689 (2004).
130. Stampelcoskie, K. G., Scaiano, J. C., Tiwari, V. S. & Anis, H. Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **115**, 1403–1409 (2011).
131. Sadovnikov, S. I., Gusev, A. I. & Rempel, A. A. Artificial silver sulfide Ag<sub>2</sub>S: Crystal structure and particle size in deposited powders. *Superlattices Microstruct.* **83**, 35–47 (2015).
132. Wattendorf, U. & Merkle, H. P. PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles. *J. Pharm. Sci.* **97**, 4655–4669 (2008).
133. Yong, K. T. *et al.* Tumor targeting and imaging in live animals with functionalized semiconductor quantum rods. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 710–719 (2009).



134. Ding, S., Lu, L., Fan, Y. & Zhang, F. Recent progress in NIR-II emitting lanthanide-based nanoparticles and their biological applications. *J. Rare Earths* **38**, 451–463 (2020).
135. Lu, F. *et al.* Aqueous synthesis of PEGylated Ag<sub>2</sub>S quantum dots and their in vivo tumor targeting behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **529**, 930–935 (2020).
136. Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**, 991–1003 (2013).
137. Wang, Y. *et al.* Bioinspired extracellular vesicles embedded with black phosphorus for molecular recognition-guided biomineralization. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
138. Heo, D. N. *et al.* Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle-hydrogel complex. *J. Mater. Chem. B* **2**, 1584–1593 (2014).
139. Yanagi, T., Kajiya, H., Kawaguchi, M., Kido, H. & Fukushima, T. Photothermal stress triggered by near infrared-irradiated carbon nanotubes promotes bone deposition in rat calvarial defects. *J. Biomater. Appl.* **29**, 1109–1118 (2015).
140. Jiang, P., Wang, R. & Chen, Z. Thiol-based non-injection synthesis of near-infrared Ag<sub>2</sub>S/ZnS core/shell quantum dots. *RSC Adv.* **5**, 56789–56793 (2015).
141. Zhao, F. & Kim, J. Synthesis and spectral analysis of head-to-tail shaped Ag<sub>2</sub>S/ZnS near-infrared quantum dots with manganese dopant. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 5083–5086 (2015).
142. Yang, X. *et al.* Facile synthesis of luminescent AgInS<sub>2</sub>-ZnS solid solution

nanorods. *Small* **9**, 2689–2695 (2013).

143. Shen, S., Zhang, Y., Peng, L., Du, Y. & Wang, Q. Matchstick-Shaped Ag<sub>2</sub>S-ZnS Heteronanostructures Preserving both UV/Blue and Near-Infrared Photoluminescence. *Angew. Chemie* **123**, 7253–7256 (2011).





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

