



Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico

Laura Vivero Sanchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPEUTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO:
NANOCIENCIAS
BIENIO 2010-2011

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS Y ÁCIDO HIALURÓNICO**

**Memoria presentada por Laura Vivero Sanchez para optar al título de
doctor por la Universidad de Barcelona**

DIRECTORA: Dra. Judith Sendra Cuadal

DOCTORANDA: Laura Vivero Sanchez

TUTORA: Dra. M^a Lluïsa Perez Garcia

Laura Vivero Sanchez
Barcelona, 2014



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPEUTICA

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS Y ÁCIDO HIALURÓNICO**

Laura Vivero Sanchez
Barcelona, 2014

Al equipo Endor

A mis padres

A Marc

AGRADECIMIENTOS

Esta sección es la menos científica de todas y la más difícil de sintetizar, ya que en pocas palabras quiero dar las gracias a todos aquellos que me han apoyado, que están a mi lado y que me aguantan en los momentos difíciles. Estaría páginas enteras escribiendo a todos a los que he de agradecerles alguna cosa. Por adelantado, espero no olvidarme de nadie, y si lo hago, pido disculpas.

Quiero agradecer a las personas de Endor Nanotechnologies la oportunidad que me brindaron de incorporarme a su equipo, inicialmente en prácticas de master y a continuación con la realización de la presente tesis doctoral. Particularmente al CEO de la empresa Joaquin Querol y al que fue mi tutor durante los primeros años Dr. Marc Ramis. Muy especialmente a la directora de I+D en Endor, Dra. Judith Sendra, quien me ha guiado durante estos años en mi aprendizaje personal y profesional; además de corregir la presente tesis con la dificultad que conlleva mi mala expresión. También agradecer a los becarios que han pasado por Endor que con su trabajo han aportado su granito de arena a esta tesis. Finalmente al grupo de trabajo y amigos tan increíble que hemos formado con Luciano Sobrevalls y Rafa Miñana. Y muy muy especialmente a Hanna Parkkola, mi amiga y compañera de trabajo durante cinco años, gracias por aguantarme diariamente y por el apoyo recibido.

Durante este proceso he estado en un sitio privilegiado donde he podido aprender y crecer profesionalmente. El poder interactuar con profesionales de diferentes áreas me ha enriquecido y quiero agradecer a aquellos profesionales de los CCiTUB que me han enseñado su especialidad. Concretamente agradecer al equipo de ICP-MS, la Dra. Elionor Pelfort, Paco Menéndez y Susanna Mas, por darnos privilegios en el laboratorio y ser tan amables conmigo. No quiero dejar de agradecer también, la ayuda incondicional del Dr. Isidre Casals, responsable de técnicas separativas de los CCiTUB, que siempre me atiende y me soluciona mis dudas técnicas y a su colaboradora en AEO, Regina Roca, por su profesionalidad y amistad.

Para llegar hasta aquí ha habido un largo proceso previo de aprendizaje y desarrollo del cual han participado mi grupo de amigas de la universidad con quien pasé muchas tardes de estudios y risas. Ahora cada una tiene su trabajo pero las

AGRADECIMIENTOS

reuniones de cafés son imperdonables. Gracias a todas, Ana, Ester, Mari, Marta y Nathaly.

Desireé también tengo agradecimientos para ti, que nos conocemos desde los 11 años y siempre me recuerdas que ya decía que quería ser química. Pues gracias a ti también, por todo, por siempre estar ahí.

A mi familia quiero dar las gracias, a mi Abuela, Abuelo, Alfonso, Silvia, Vero, a mi Yaya del pueblo y a Jorge. A mi tita Antonia y Rafa, a Sonia y Dani piti, y a Montse, a todos ellos también, gracias.

Finalmente, quiero dar las gracias a los más importantes en mi vida, mi familia. Gracias a Ana y Jose por darme la vida, educarme y hacer de mi la persona que soy. A mi madre por ser una mujer valiente, estar siempre conmigo y dedicarse a mi por completo; y a mi padre por trabajar tanto por nosotras y ser un padrazo dando todo su amor; gracias por ser como sois y haberme hecho vivir tan feliz. Gracias a Marc, mi amor, compañero, y amigo; por aguantarme en los buenos y malos momentos, por comprenderme y quererme tal y como soy; por todo lo que hemos vivido y nos queda por vivir juntos. Tu también me haces ser la persona que soy y me haces muy feliz.

Gracias a todos.

El trabajo experimental recogido en esta memoria se ha realizado en el laboratorio de la empresa Endor Nanotechnologies, S.L situado en el Parc Científic de Barcelona con dirección C/ Baldiri Reixac, 15; 08028 Barcelona.

El contrato laboral ha sido cofinanciado por el programa Torres Quevedo (expediente PTQ-10-03489) del Ministerio de Economía y Competitividad (originalmente Ministerio de Ciencia e Innovación)".

DIFUSIÓN DE CONOCIMIENTO

El trabajo descrito en esta memoria ha dado lugar hasta el momento a diferentes publicaciones y patentes:

PUBLICACIONES:

- ***Nanomedicine The New Age of Therapeutics.***
Luciano Sobrevalls, Hanna Parkkola, Laura Vivero, Rafa Miñana and Judith Sendra.
Book: Nanotechnology: Recent Trends, Emerging Issues and Future Directions.
Editor: Nazrul Islam Editor.
Nova Science Publishers, Inc. (Apéndice 1)

- ***Gold Nanoparticle stability studies in physiological media Proceed with caution?:concept and application of the precautionary principle in nanobiotechnology.***
Laura Vivero; Hanna Parkkola, Judith Sendra, Joaquin Querol, Jesús Pablo G. Cambero, Marc Ramis.
Book: Proceed with caution?:concept and application of the precautionary principle in nanobiotechnology.
Editors: Johann S Ach; Beate Lüttenberg; Rainer Paslack; Klaus-Michael Weltring.
LIT Verlag; 2012 (Apéndice 2)

- ***Gold Nanoparticles and Cell Viability Evaluation.***
Hanna Parkkola, Laura Vivero, Judith Sendra, Joaquin Querol, Marc Ramis.
Book: Proceed with caution?:concept and application of the precautionary principle in nanobiotechnology.
Editors: Johann S Ach; Beate Lüttenberg; Rainer Paslack; Klaus-Michael Weltring.
LIT Verlag; 2012 (Apéndice 3)

POSTERS:

- ***Metallic Nanoparticles and Cytotoxicity Assessment***
Hanna Parkkola, Laura Vivero, Judith Sendra, Joaquin Querol, Marc Ramis, Mireia Vega.
2010. International Congress of Toxicology (Apéndice 4)

PATENTES

- ***System for the release of a therapeutic agent, pharmaceutical compositions containing it, the preparation and medical use thereof.***

International Publication Number: WO 2012/089768 A1

Applicant: Endor Nanotechnologies, S.L

Inventors/Applicants: Ramis Castelltort, Marc; Querol Sastre, Joaquin; Vivero Sanchez, Laura; Sendra Cuadal, Judith; Parkkola, Hanna. (Apéndice 5)

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	25
RESUMEN	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUCCIÓN	33
1.1. NANOTECNOLOGÍA	33
1.2. NANOMEDICINA	37
1.2.1. <i>Aplicaciones oncológicas</i>	40
1.2.1.1. Sistemas dirigidos de liberación de fármacos	41
1.2.1.1.1. Mecanismos de liberación dirigida	42
1.2.1.1.2. Influencia de la NP en la liberación dirigida	44
1.2.1.1.3. Transporte de fármacos.....	45
1.2.1.1.4. Tipos de NPs	46
1.3. NANOPARTÍCULAS DE ORO	53
1.3.1. <i>Síntesis de las AuNPs</i>	54
1.3.2. <i>Aplicaciones de las AuNPs como liberación de fármacos antitumorales</i>	58
1.3.3. <i>Toxicidad de AuNPs</i>	62
1.4. ÁCIDO HIALURÓNICO	67
1.4.1. <i>Síntesis biológica del HA</i>	68
1.4.2. <i>Propiedades del HA</i>	68
1.4.3. <i>Aplicaciones del HA</i>	70
1.4.3.1. Dermatología.....	70
1.4.3.2. Oftalmología	70
1.4.3.3. Ingeniería tisular	70
1.4.3.4. Osteoartritis.....	71
1.4.3.5. Oncología	71
1.5. FÁRMACO ANTITUMORAL	75
1.5.1. <i>Clasificación de los fármacos citotóxicos según mecanismo</i>	75
2. OBJETIVOS	81
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
3.1. MATERIALES	85
3.1.1. <i>Materiales para síntesis y caracterización de AuNPs</i>	85

3.1.2.	<i>Materiales para síntesis y caracterización del HASH</i>	85
3.1.3.	<i>Materiales para síntesis y caracterización de fármacos antitumorales</i>	85
3.1.4.	<i>Materiales para métodos in vitro</i>	86
3.2.	METODOLOGÍA.....	87
3.2.1.	<i>Procedimientos de síntesis de AuNPs</i>	87
3.2.1.1.	Síntesis de AuNPs 12 nm.....	87
3.2.1.2.	Síntesis de AuNPs 4 nm	89
3.2.2.	<i>Procedimientos de esterilización de AuNPs</i>	89
3.2.2.1.	Esterilización mediante filtración con filtros de PES 0,22 µm.....	89
3.2.2.2.	Esterilización mediante autoclavado.....	89
3.2.3.	<i>Procedimiento de síntesis del HASH</i>	90
3.2.3.1.	Síntesis de la tiolación del HA 30-50 kDa	90
3.2.3.2.	Derivatización HASH 30-50 kDa con la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico	91
3.2.3.3.	Síntesis de la tiolación del HA 8-15 kDa	91
3.2.3.4.	Derivatización HASH 8-15 kDa con la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico	92
3.2.4.	<i>Conjugación de nanopartículas de oro con ácido hialurónico</i>	92
3.2.4.1.	Conjugación del EDS1	92
3.2.4.2.	Conjugación del EDS2	93
3.2.4.3.	Conjugación del EDS3	93
3.2.5.	<i>Conjugación del sistema nanopartícula de oro con ácido hialurónico tiolado y fármaco antitumoral</i>	94
3.2.5.1.	Síntesis de EDS1 con cisplatino	95
3.2.5.1.1.	Vía A Cis	95
3.2.5.1.2.	Vía B Cis	96
3.2.5.1.3.	Vía C Cis.....	97
3.2.5.1.4.	Estabilidad en el tiempo	98
3.2.5.1.5.	Estabilidad según el pH.....	98
3.2.5.1.6.	Estabilidad enzimática	98
3.2.5.2.	Síntesis del EDS1 con oxaliplatino	98
3.2.5.2.1.	Vía A Oxa.....	98
3.2.5.2.2.	Vía B Oxa.....	99
3.2.5.3.	Síntesis del EDS1 con 5- fluorouracilo	100
3.2.5.3.1.	Vía A 5-Fu.....	100
3.2.5.3.2.	Vía B 5-Fu.....	100
3.2.5.3.3.	Vía C 5-Fu	102
3.2.6.	<i>Métodos in vitro</i>	102
3.2.6.1.	Cultivo celular.....	102

3.2.6.2.	Internalización.....	102
3.2.6.3.	Citotoxicidad.....	103
3.2.7.	<i>Técnicas de Caracterización</i>	104
3.2.7.1.	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).....	104
3.2.7.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	104
3.2.7.3.	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM).....	105
3.2.7.4.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	106
3.2.7.5.	Potencial Z (Pot-Z).....	107
3.2.7.6.	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	107
3.2.7.7.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	109
3.2.7.8.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	109
3.2.7.9.	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	110
3.2.7.10.	Nanosight (NTA).....	110
3.2.7.11.	Análisis elemental orgánico (AEO).....	111
3.2.7.12.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	112
3.2.7.13.	Espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA).....	113
3.2.7.14.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	113
3.2.7.15.	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS).....	114
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
4.1.	NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	119
4.1.1.	<i>Caracterización de nanopartículas de oro</i>	119
4.1.1.1.	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).....	119
4.1.1.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y HR-TEM.....	120
4.1.1.3.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	121
4.1.1.4.	Potencial Z (Pot-Z).....	122
4.1.1.5.	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	122
4.1.2.	<i>Escalabilidad de las síntesis de nanopartículas de oro</i>	123
4.1.2.1.	Escalabilidad de AuNPs 12 nm.....	123
4.1.2.2.	Escalabilidad de AuNPs 4 nm.....	124
4.1.3.	<i>Esterilización y estabilidad de las AuNPs</i>	125
4.1.3.1.	Esterilización mediante filtración con filtros de PES 0,22 µm.....	125
4.1.3.2.	Esterilización mediante autoclavado.....	125
4.1.4.	<i>Tabla resumen</i>	128
4.1.5.	<i>Discusión</i>	128
4.1.5.1.	Elección de las AuNPs.....	128
4.1.5.2.	Caracterización de las AuNPs.....	130
4.1.5.3.	Escalabilidad de las AuNPs.....	131
4.1.5.4.	Esterilización y estabilidad de las AuNPs.....	132
4.2.	ÁCIDO HIALURÓNICO.....	134

4.2.1.	<i>Caracterización de la tiolación de HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa..</i>	134
4.2.1.1.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	134
4.2.1.1.1.	RMN HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa.....	134
4.2.1.1.2.	RMN HASH 30-50 kDa y HASH 8-15 kDa	134
4.2.1.2.	Estudio del carácter anfipático del HASH 30-50 kDa	136
4.2.1.3.	Estudio de la tiolación mediante sal sódica del ácido 4- (hidroximercurico)benzoico	137
4.2.1.4.	Análisis elemental orgánico (AEO).....	138
4.2.1.5.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	138
4.2.1.6.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	139
4.2.1.7.	Potencial Z (Pot-Z).....	140
4.2.1.8.	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	141
4.2.2.	<i>Esterilidad</i>	142
4.2.3.	<i>Tabla resumen</i>	143
4.2.4.	<i>Discusión</i>	143
4.2.4.1.	Elección del HA.....	143
4.2.4.2.	Caracterización del HA.....	144
4.2.4.3.	Esterilidad y estabilidad.....	149
4.3.	CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO....	150
4.3.1.	<i>Caracterización de EDS1, EDS2 y EDS3</i>	150
4.3.1.1.	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).....	150
4.3.1.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	151
4.3.1.3.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	152
4.3.1.4.	Potencial Z (Pot-Z).....	152
4.3.1.5.	Nanosight (NTA).....	152
4.3.1.6.	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	153
4.3.1.7.	Análisis elemental orgánico (AEO).....	154
4.3.2.	<i>Reproducibilidad</i>	155
4.3.3.	<i>Esterilización y estabilidad de los EDS</i>	156
4.3.4.	<i>Tabla Resumen</i>	157
4.3.5.	<i>Eficacia in vitro para la selección del candidato EDS</i>	157
4.3.5.1.	Citotoxicidad.....	157
4.3.5.2.	Internalización.....	158
4.3.6.	<i>Caracterización del candidato EDS1</i>	158
4.3.6.1.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	158
4.3.6.2.	Análisis termogravimétrico (TGA)	159
4.3.6.3.	Espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA).....	159
4.3.6.4.	Microscopía electrónica de transmisión con técnica de tinción negativa (TEM)	160

4.3.6.5.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	162
4.3.6.6.	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	163
4.3.7.	<i>Discusión</i>	165
4.3.7.1.	Elección de la conjugación EDS	165
4.3.7.2.	Caracterización de los EDS.....	165
4.3.7.3.	Esterilización y estabilidad de los EDS	167
4.3.7.4.	Eficacia <i>in vitro</i> para la selección del candidato EDS	168
4.3.7.5.	Caracterización del candidato EDS1	169
4.4.	CARACTERIZACIÓN DE LA CONJUGACIÓN DE EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL	172
4.4.1.	<i>Síntesis y caracterización del EDS1 con cisplatino</i>	172
4.4.1.1.	Vía A Cis	172
4.4.1.1.1.	Caracterización de la síntesis del ligando L	172
4.4.1.1.2.	Caracterización de la conjugación vía A Cis	173
4.4.1.2.	Vía B Cis	174
4.4.1.3.	Vía C Cis	175
4.4.1.4.	Caracterización de C.1 Cis.....	176
4.4.1.5.	Estabilidad del producto C.1 Cis	177
4.4.1.6.	Eficacia <i>in vitro</i> del sistema C.1 Cis.....	178
4.4.2.	<i>Síntesis y caracterización de EDS1 con oxaliplatino</i>	178
4.4.2.1.	Vía A Oxa	178
4.4.2.2.	Vía B Oxa	179
4.4.2.3.	Eficacia <i>in vitro</i> de los sistemas EDS1-oxaliplatino	180
4.4.3.	<i>Síntesis y caracterización de EDS1 con 5-fluorouracilo</i>	181
4.4.3.1.	Vía A 5-Fu.....	181
4.4.3.2.	Vía B 5-Fu.....	181
4.4.3.3.	Vía C 5-Fu.....	183
4.4.4.	<i>Discusión</i>	183
4.4.4.1.	Elección de los fármacos	183
4.4.4.2.	Validación EDS1 con cisplatino	184
4.4.4.3.	Validación EDS1 con oxaliplatino.....	187
4.4.4.4.	Validación EDS1 con 5-fluorouracilo.....	188
5.	CONCLUSIONES	193
6.	BIBLOGRAFÍA	197
7.	ANEXO	223
7.1.	RMN HA 30-50 kDa Y HA 8-15 kDa	223
7.1.1.	RMN HA 30-50 kDa	223
7.1.2.	RMN HA 8-15 kDa.....	225

7.2.	RMN HASH 30-50 kDa y HASH 8-15 kDa.....	227
7.2.1.	RMN HASH 30-50 kDa.....	227
7.2.2.	RMN HASH 8-15 kDa.....	230
7.3.	FT-IR HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa.....	232
7.3.1.	FT-IR HA 30-50 kDa y HASH 30-50 kDa.....	232
7.3.2.	FT-IR HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa.....	233
7.4.	FT-IR EDS1.....	234
7.5.	TGA EDS1.....	235
7.6.	VÍA A CIS.....	235
7.6.1.	Ligando L.....	235
7.6.1.1.	Espectro ¹ H RMN de la carboxilación cistamnia.....	235
7.6.1.2.	Espectro ¹ H RMN del ligando L.....	236
7.7.	VÍA C.1 CIS.....	236
7.7.1.	TGA.....	236
7.7.2.	Espectro ¹ H RMN.....	237
7.8.	VÍA B 5-FU.....	237
7.8.1.	Derivado ácido del 5-Fu.....	237
7.8.1.1.	Espectro ¹ H RMN.....	237
7.8.1.2.	Espectro ¹⁹ F RMN.....	238
7.8.2.	Derivado tiolado del 5-Fu.....	238
7.8.2.1.	Espectro ¹ H RMN.....	238
7.8.2.2.	Espectro ¹⁹ F RMN.....	239
7.8.2.3.	Espectro HPLC-MS.....	239
7.8.3.	Espectro ¹⁹ F RMN de la vía B 5-Fu.....	240
7.9.	VÍA C 5-FU.....	240
7.9.1.	Espectro ¹⁹ F RMN.....	240
7.10.	5-FU COMERCIAL.....	241
7.10.1.	Espectro ¹⁹ F RMN.....	241
8.	APÉNDICE.....	245
8.1.	PUBLICACIONES.....	245
8.1.1.	Apéndice 1.....	245
8.1.2.	Apéndice 2.....	246
8.1.3.	Apéndice 3.....	247
8.2.	POSTERS.....	248
8.2.1.	Apéndice 4.....	248
8.3.	PATENTES.....	249

8.3.1. *Apéndice 5*..... 249

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5-Fu:	5-Fluorouracilo
AEO:	Análisis elemental orgánico
AFM:	Microscopía de fuerza atómica
AgNP:	Nanopartícula de plata
Au:	Oro
AuNP:	Nanopartícula de oro
Cis:	Cisplatino
COSY:	Espectroscopía RMN de correlación 2D
DLS:	Dispersión dinámica de luz
EDS:	en inglés, Endor delivery system
ESCA:	Espectroscopía electrónica para análisis químico
FT-IR:	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
HA:	Ácido hialurónico (combinando hialuronato sódico)
HASH:	Ácido hialurónico tiolado
HPLC-MS:	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas
HSQC:	en inglés, Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
ICP-MS:	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
L:	Ligando
NMWL:	en inglés, Nominal molecular weight limit
NP:	Nanopartícula
NTA:	en inglés, Nanoparticle tracking analysis
OXA:	Oxaliplatino
PBS:	Tampón fosfato salino
PES:	Polietersulfona
Pot-Z:	Potencial zeta
QD's:	Puntos cuánticos
RMN:	Resonancia magnética nuclear
SEM:	Microscopía electrónica de barrido
SPR:	Resonancia del plasmón de superficie

ABREVIATURAS

STEM-HAADF: en inglés, Scanning transmission electron microscopy-high angle annular dark field

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGA: Termogavimetría

UV-Vis: Espectroscopía ultravioleta-visible

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El EDS es un sistema liberador de fármacos antitumorales compuesto por una AuNP recubierta de ácido hialurónico tiolado (HASH). El HASH, además de proteger las nanopartículas metálicas, es reconocido por el receptor CD44, proteína sobreexpresada en células tumorales. Durante esta tesis se han estudiado diferentes candidatos, trabajando tanto la síntesis de diferentes tamaños de AuNPs, como la tiolación de HASH de diferentes pesos moleculares. Además, se han puesto a punto las técnicas necesarias para la correcta caracterización físico-química y biológica de los candidatos. Mediante experimentos *in vitro*, se concluyó que la internalización y la eficacia fue mayor con el sistema formado por AuNPs de 12 nm de diámetro y HASH con un tamaño de 30-50 kDa (EDS1).

Los fármacos escogidos para validar el sistema EDS1 fueron el cisplatino, el oxaliplatino y el 5-fluorouracilo. Se conjugaron al EDS1 mediante diferentes vías de síntesis. Se utilizaron ligandos específicos o incluso síntesis directas al ácido hialurónico, donde el enlace con el fármaco era sensible al cambio de pH. La caracterización físico-química y biológica confirmaron que el EDS1 conjugado a cisplatino y oxaliplatino mejoraba el IC50 de los fármacos en células tumorales de páncreas (Panc-1). Sin embargo, con el 5-fluorouracilo no se encontró un sistema para validar el EDS.

ABSTRACT

EDS is an antitumor drug delivery system consisting of an AuNP coated with thiolated hyaluronic acid (HASH). HASH protects the metal nanoparticles in physiological media but also it is recognized by CD44 receptor, which is a protein overexpressed in tumour cells. In this thesis different candidates, having different AuNPs particle size and different HASH molecular weight, were studied. It was also necessary to tune up proper physico-chemical and biological characterization techniques. In vitro experiments concluded that the internalization and efficacy were better in the system formed by 12 nm diameter of AuNPs and 30-50 kDa size of HASH (EDS1).

The drugs chosen to validate the EDS1 system were cisplatin, oxaliplatin and 5-fluorouracil. EDS1 was conjugated to drug via different synthesis routes. Specific ligands sensitive to pH change or even directly to hyaluronic acid were used to link the drug. The physicochemical and biological characterization confirmed that EDS1 conjugated with cisplatin and oxaliplatin improved the IC50 of the drug in pancreatic tumour cells (Panc-1). However, with 5-fluorouracil, the conjugation was not obtained.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología

A finales del año 1959, en la reunión anual de la *American Physical Society*, Richard Feynman pronunció un famoso discurso titulado “*There is plenty of room at the bottom*” (“Abajo hay espacio de sobra”) (Feynman et al., 1960). Fue en dicho discurso cuando introdujo por primera vez el concepto de la nanotecnología.

Un nanomaterial, tal como se definió en el año 2011 por la *European Commission Recommendation*, es un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas donde una o más dimensiones externas están en el intervalo de tamaño de 1 nm a 100 nm y con frecuencia tienen propiedades específicas debido al tamaño (propiedades que el material con tamaños superiores no posee).

Los avances en las técnicas de caracterización a escala nanométrica, como la microscopía, nos permiten conocer y manipular la materia a escalas tan pequeñas que hace unos años era inimaginable. Desde entonces, aunque todavía hay controversia sobre la correcta definición de los nanomateriales, se ha producido un crecimiento exponencial de los productos nanotecnológicos en el mercado, incluyendo diferentes áreas tales como revestimientos, electrónica, ropa, cosméticos, artículos deportivos y productos sanitarios (www.nanotechproject.org).

La OCDE (en inglés, Organisation for Economic Cooperation and Development) publicó en 2009 la tendencia al alza de las patentes basadas en productos nanotecnológicos (OCDE 2009, “*Nanotechnology patents*”, in *OCDE Science, Technology and Industry Scoreboard 2009*, n.d.) (Figura 1.1).

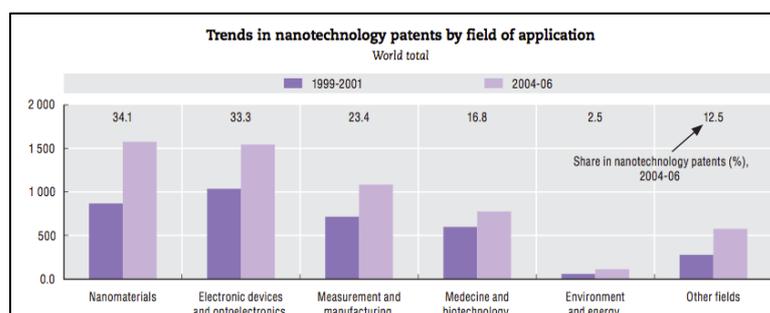


Figura 1.1. Gráfico representativo de las patentes con materiales o aplicaciones nanotecnológicas. (OCDE 2009).

1.1 NANOTECNOLOGÍA

El incremento de la investigación en el área de la nanotecnología y su posible comercialización queda reflejado en el número de patentes publicadas por la USPTO (Oficina de Patentes de Estados Unidos), la OEP (Oficina de Patentes Europea) y la JPO (Oficina de Patentes Japonesa) a lo largo de los años (Figura 1.2). La caída en el número de patentes publicadas por USPTO en 2005 se debe a que la USPTO reguló una definición más estricta de nanomaterial. El descenso en el número de patentes publicadas por la JPO para 2005 y 2006, se debe a la demora entre la publicación y la concesión de patentes que mantiene este organismo (Chen et al., 2008).

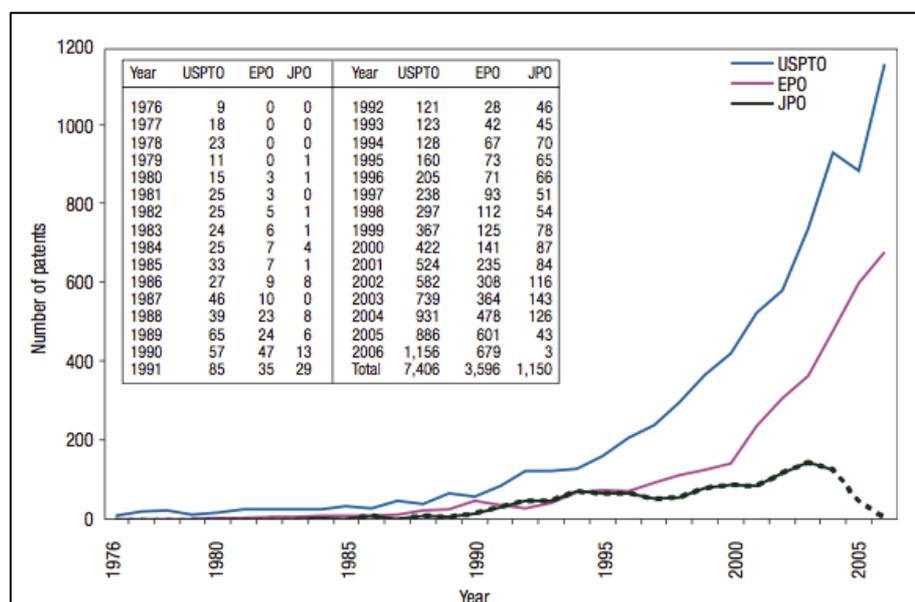


Figura 1.2. Gráfico representativo del número de patentes en el área de la nanotecnología publicadas por la USPTO, EPO y JPO, según fecha de publicación. (Chen et al., 2008).

El paso de estos productos (patentados o no) desde la fase de investigación y desarrollo hasta la producción y comercialización, produce que la economía se vea fuertemente afectada por los productos nanotecnológicos (www.epa.org, 2007). Los esfuerzos por comercializar productos basados en la nanotecnología son verdaderamente importantes (Figura 1.3). Miles de empresas a nivel mundial se dedican a este campo, y la mayoría de ellas son pequeñas y medianas empresas (PYME). La creciente comercialización de productos nanotecnológicos requiere un gran esfuerzo por parte de los organismos reguladores, que tienen que trabajar con rapidez para demostrar la seguridad de estos productos. Este esfuerzo queda latente viendo los numerosos estudios realizados por las agencias reguladoras y los comités científicos, cuyo objetivo es estandarizar las técnicas y ensayos con NPs (OCDE, ISO),

conocer los riesgos tanto para la salud humana (SCENHIR, EMEA, EFSA) como el medio ambiente (AEMA, CCRSM), y también para controlar la producción y caracterización (REACH).

La nanotecnología tiene el potencial de crear materiales y productos más avanzados. El mercado de los nanomateriales sigue estando dominado por aquellos materiales que han estado en uso durante décadas, como la sílice amorfa sintética utilizada en diversas áreas como la construcción, el textil, la cosmética y la industria farmacéutica, entre otras. Sin embargo, muchas otras aplicaciones con nuevos materiales están aumentando, especialmente en el mercado cosmético y médico.

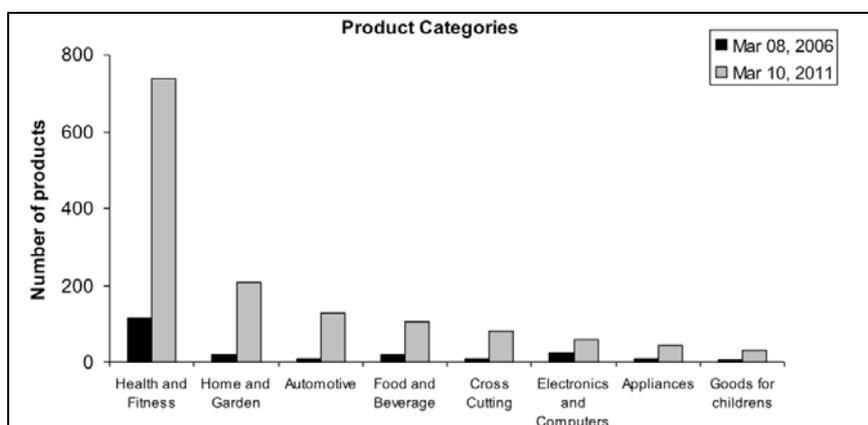


Figura 1.3. Clasificación de los productos registrados y lanzados al mercado hasta el 8 de marzo del 2006 y el 11 de marzo del 2011. (Woodrow Wilson International Center for Scholars Project on Emerging Nanotechnologies).

La FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) se encarga de la seguridad de los productos de consumo relacionados con la nutrición, la salud y el cuidado personal en USA. Por lo tanto, también es la responsable de valorar y regular los productos de esta clasificación que contienen nanomateriales. En la mayoría de productos regulados por la FDA, se requiere de los conocimientos de la industria para asegurar que el producto satisface las normas de seguridad, siendo la evidencia científica absolutamente necesaria para justificar su seguridad. El grupo de trabajo en nanotecnología de la FDA hizo recomendaciones para una adecuada gestión de riesgos y una adecuada actuación (FDA et al, 2007).

1.1 NANOTECNOLOGÍA

Estas recomendaciones se centran en conocer:

- Las vías de exposición, incluyendo la inhalación, absorción dérmica y la ingestión (por ejemplo, en relación con los cosméticos y alimentos), así como los medios expuestos (por ejemplo, aire, agua y alimentos).
- Las propiedades relacionadas con la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), debido a que las interacciones biológicas pueden estar influenciadas por los cambios de tamaño.
- El tamaño, la distribución del tamaño, la carga superficial, propiedades de la superficie, las interacciones entre partículas, comportamiento de las partículas, pureza, estabilidad y la variabilidad general de lote a lote (Hamburg et al, 2012).

La Tabla 1.1 muestra el grado de regulación por parte de la FDA relacionada con la seguridad, (previo a la comercialización y después de la comercialización) de nueve categorías de productos: ingredientes cosméticos, todo tipo de alimentos, suplementos dietéticos, aditivos alimentarios, envasado de alimentos, productos sanitarios, medicamentos sin prescripción médica y los nuevos fármacos (Taylor et al., 2006).

	Ingredientes cosméticos	Todo tipo de comida	Suplementos dietéticos	Aditivos alimentarios	Envasado de alimentos	Productos sanitarios	Medicamentos sin prescripción médica	Nuevos fármacos
Pre-comercialización								
Obtención de información del proyecto	No	No	No	Débil	Débil	Moderado	Débil	Moderado
Pruebas que confirmen la seguridad	Débil	No	Débil	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Obligación a probar la seguridad del <i>Sponsor</i>	Débil	No	Débil	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Revisión de la seguridad previo a la comercialización	No	No	Débil	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	Fuerte
Post-comercialización								
Requerimiento necesario de monitorizar y testar	Débil	No	No	Débil	No	Fuerte	Débil	Moderado
Informar sobre efectos adversos	No	No	No	Débil	No	Fuerte	No	Fuerte
Inspecciones de las instalaciones y de los registros de seguridad	Débil	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Excluir del mercado productos no seguros	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte

Tabla 1.1 Capacidades legales de la autoridad FDA sobre los productos nanotecnológicos. (Taylor et al., 2006).

1.2. Nanomedicina

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el sector de la salud. Según la definición de la Fundación Europea de la Ciencia (ESF, *European Science Foundation*), la nanomedicina utiliza las herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y obtener una mayor comprensión de la compleja fisiopatología subyacente de la enfermedad (ESF et al., 2005). La última década ha sido un período muy productivo en la generación de nuevos nanomateriales enfocados a la medicina.

La FDA publicó un estudio donde se representaban los productos de nanomedicina que habían sido aprobados (o simplemente presentados) a lo largo de los últimos años hasta mayo del 2011 (Figura 1.4). El análisis utiliza el año de aprobación por la FDA si el producto está aprobado en EE.UU o con año desconocido para los productos con aprobación extranjera. La mayoría de los productos aprobados antes del año 2000 eran aplicados en terapia y no en dispositivos. Sin embargo, en la última década, la aprobación para la terapia parece haber permanecido bastante estable, mientras que hay un aumento en el número de dispositivos médicos (Etheridge et al., 2013).

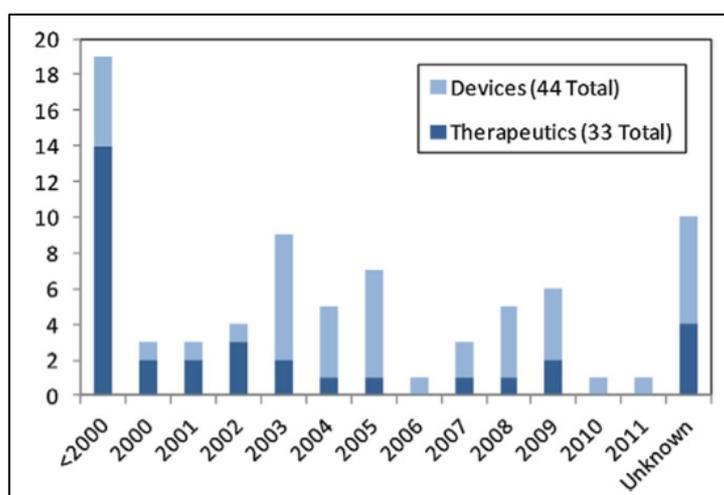


Figura 1.4. Gráfico representativo del número de productos aprobados y/o presentados a la FDA en nanomedicina. (Etheridge et al., 2013).

Entre los nanomateriales más utilizados en medicina se encuentran los liposomas, las NPs poliméricas, los dendrímeros, los puntos cuánticos (en inglés, QD's,

1.2 NANOMEDICINA

Quantum dots), los nanotubos de carbono, las NPs inorgánicas y las NPs de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONS). Las diferentes aplicaciones de los nanomateriales en medicina se clasifican en sistemas de liberación de fármacos, sistemas terapéuticos, agentes para la imagen, sistemas para diagnóstico y biomateriales e implantes activos (Wagner et al., 2006).

Los nanomateriales pueden ser dirigidos a una diana concreta en función de la enfermedad y ser detectados en el lugar necesario. Dependiendo del tamaño del nanomaterial (>10 nm), es difícil eliminarlos del organismo a través de los riñones; además, en función de su composición, tamaño y revestimiento, el tiempo de circulación en sangre puede aumentar. La alta relación área superficie-volumen que tienen los nanomateriales permite una gran capacidad de carga de ligandos tales como fármacos terapéuticos, agentes para la imagen o estabilizadores (Wang et al., 2012). Modificar el tamaño y la superficie de la NP puede mejorar su tiempo de circulación en sangre y ayudar a escapar del sistema retículoendotelial (Lee D.-E. et al., 2012).

Estos nanomateriales son utilizados en la teranóstica como sistemas de diagnóstico que a la vez tienen capacidad terapéutica. Muchos sistemas basados en la administración de fármacos, tales como vectores de oro o QDs, pueden ser fácilmente detectados ópticamente, obteniendo imágenes sin necesidad de modificaciones. Además, mediante el uso de ligandos fluorescentes, por ejemplo, se pueden funcionalizar las NPs y ampliar la gama de nanomateriales teranósticos (Figura 1.5) (Doane et al., 2012).

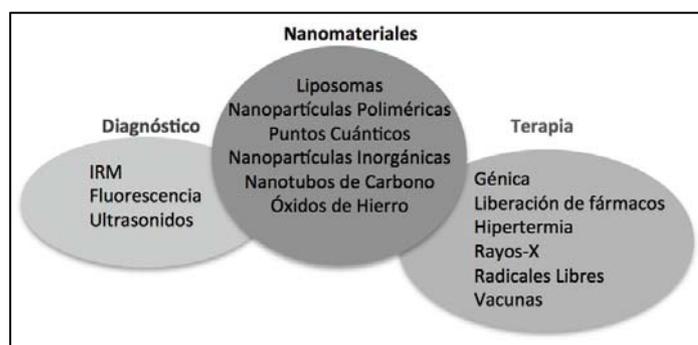


Figura 1.5. Esquema representativo de los teranósticos y materiales en la nanomedicina.

Las AuNPs son de gran interés en técnicas de imagen, administración de fármacos y teranósticos debido a su biocompatibilidad y a sus propiedades ópticas y fototérmicas. También ofrecen una plataforma versátil para la conjugación de muchos tipos de moléculas, debido a las posibles modificaciones en la superficie.

Las NPs magnéticas también suele mostrar una alta biocompatibilidad y sus propiedades se aplican a sondas de contraste para resonancia magnética. Las SPIONS son las mas utilizadas en este campo.

Las NPs poliméricas son una plataforma emergente especialmente para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Probablemente, uno de los polímeros más reconocidos de la nanotecnología es el PLGA (polilactida-poliglicólidos), por su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Danhier et al., 2012).

Recientemente ha habido una creciente atención en la investigación de nanomateriales híbridos que consisten en diferentes nanomateriales como plataformas prometedoras para diagnóstico, proyección de imagen y aplicaciones terapéuticas (Wang et al., 2012).

Las aplicaciones de las NPs son variadas, desde el diagnóstico *in vitro* hasta el transporte de fármacos o la terapia.

En el diagnóstico *in vitro* las herramientas se componen generalmente de dos componentes: bioreceptores y transductores. Diferentes nanomateriales poseen propiedades únicas eléctricas, magnéticas, luminiscentes y catalíticas, entre otras, que podrían ser explotados como transductores en dispositivos de diagnóstico. El uso de nanomateriales para el diagnóstico *in vitro* ha aportado una gran mejora en la detección de enfermedades infecciosas para identificar agentes patógenos, como los virus (por ejemplo, gripe, hepatitis y papiloma) y bacterias (por ejemplo, E. Coli, M. tuberculosis y S. Aureus). Se espera que tengan un gran impacto en el diagnóstico molecular, pero todavía hay varios factores que limitan su uso en este campo. Estos factores incluyen la unión inespecífica, la variabilidad del tamaño, la agregación y la falta de estabilidad (Kurkina et al, 2012; Minelli et al., 2010; Shinde et al., 2012).

También hay nanomateriales con efecto terapéutico, especialmente polímeros, que ya están comercializados o se encuentran en ensayos clínicos. Ejemplos de estos fármacos son Copaxone®, un polímero que se utiliza para tratar la esclerosis muscular; Renagel®, un polímero de unión a fosfato que se utiliza en enfermedad renal crónica y VivaGel®, un dendrímero de base de lisina que actúa como un viricida vaginal (Duncan et al., 2011).

El uso de nanomateriales en los implantes pasivos ayudan a aumentar su vida útil. Por ejemplo, las articulaciones artificiales actuales se desgastan y se aflojan después de unos 15 años y necesitan ser reemplazados. Se ha demostrado que capas delgadas de recubrimientos nanocristalinos pueden reducir estos problemas y además, mejorar la biocompatibilidad de los implantes (Amaral et al., 2008). También nanomateriales con efectos antisépticos podrían reducir las infecciones bacterianas que son una complicación común en los implantes. La nanotecnología también podría ser utilizada para crear implantes activos que actúen como fuentes de energía, tales como los microchips implantables que liberan sustancias activas (Arora et al., 2012).

La nanotecnología ofrece oportunidades para crear nuevos materiales "inteligentes" terapéuticos y crear nuevas herramientas de diagnóstico o mejorar los ya existentes.

1.2.1. Aplicaciones oncológicas

Entre las diferentes aplicaciones biomédicas, la aplicación de la nanotecnología en oncología ha llamado la atención de muchos investigadores durante los últimos 10 años. Del total de productos presentados o aprobados por la FDA (Figura 1.6), la mayoría de las aplicaciones se centran en tratamientos contra el cáncer (Etheridge et al., 2013). El rápido desarrollo de la nanoncología plantea nuevas posibilidades de diagnóstico y tratamiento del cáncer. También representa una gran promesa para la medicina personalizada. Uno de los retos más importantes de la nanomedicina, especialmente en el área de la oncología, es el diseño de nanosistemas que eficientemente llegan a la diana tumoral, limitando el efecto a la actividad antitumoral y evitando los efectos secundarios no deseados (Jain et al., 2010).

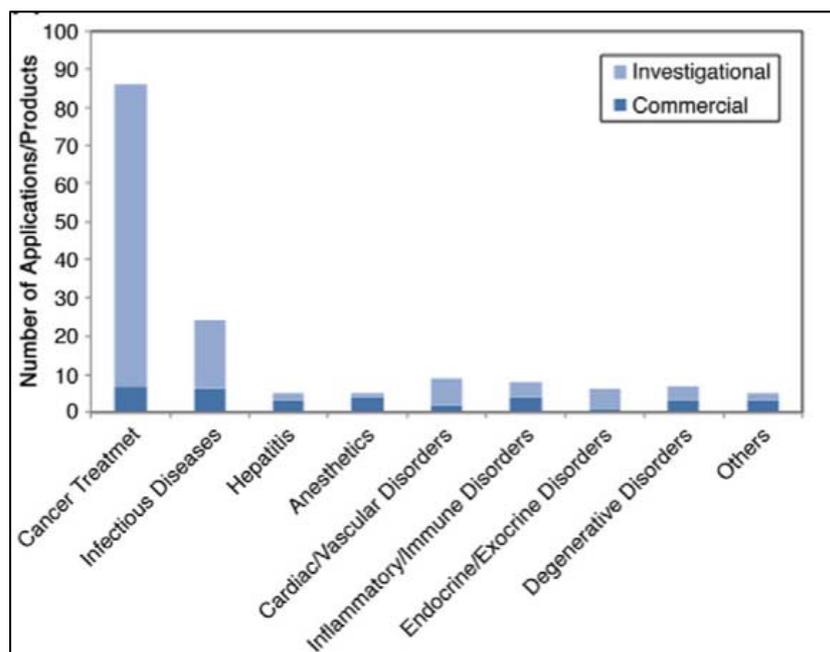


Figura 1.6. Gráfico del número de productos presentados a la FDA y/o aprobados, clasificado por terapias. (Etheridge et al., 2013).

1.2.1.1. Sistemas dirigidos de liberación de fármacos

La liberación de fármacos dirigidos a un tumor requiere en general, de varios factores indispensables para poder lograr niveles altos y sostenibles de estos nanosistemas en el torrente sanguíneo y así mejorar la acumulación de los nanomateriales en los tumores, lo que conlleva una mejor eficacia antitumoral. Sin embargo, obtener una vida más larga de los nanomateriales en sangre aumenta el riesgo de efectos secundarios o manifestaciones tóxicas en órganos importantes como el hígado o los riñones. Este equilibrio entre eficacia y toxicidad es uno de los retos más importantes de la nanomedicina.

Se han descrito varias estrategias para dirigir los nanosistemas a tumores sólidos. Esto implica la identificación de tejidos, células específicas y receptores diana relacionados con las condiciones clínicas específicas y la elección de los nanomateriales apropiados para lograr las respuestas necesarias y reducir al máximo los efectos secundarios (Bae et al., 2011; Morrow et al., 2007).

La siguiente tabla (Tabla 1.2) resume algunos de los nanosistemas más relevantes aceptados por la FDA para su aplicación clínica como sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de tumores sólidos.

1.2 NANOMEDICINA

Nombre genérico	Nombre comercial	Indicación	Resultados y beneficios
Liposoma pegilado con doxorubicina	Doxil® y Caelyx®	HIV-relacionado con sarcoma de Kaposi	Ningún cambio estadísticamente significativo en la supervivencia global (23 semanas) vs. tratamiento con doxorubicina, bleomicina o vincristina (22,3 semanas) para el sarcoma de Kaposi relacionado con el VIH (Northfelt et al., 1998).
		Cáncer de ovario metastásico	Una mejora en la supervivencia general estadísticamente significativa (108 semanas, p=0,008) frente al tratamiento con topotecan (71,1 semanas) para pacientes sensibles al platino (Gordon et al., 2001).
		Cáncer de mama metastásico	Ningún cambio estadísticamente significativo en la supervivencia global (84 semanas) vs doxorubicina (88 semanas) para los pacientes con cáncer de mama que reciben terapia de primera línea (O'Brien et al., 2004).
Liposoma daunorubicina	DaunoXome®	HIV-relacionado con sarcoma de Kaposi	Ningún cambio estadísticamente significativo en la supervivencia global (52,7 semanas) vs tratamiento con doxorubicina, bleomicina o vincristina (48,9 semanas) (Gill et al., 1996).
Albumina-enlazada a paclitaxel	Abraxane®	Cáncer de mama metastásico	Cambio estadísticamente significativo en la supervivencia global (56,4 semanas, p=0,024) vs tratamiento polietilados a base de aceite de ricino con paclitaxel (46,7 semanas), en pacientes que reciben tratamiento de segunda línea (Gradishar et al., 2005).

Tabla 1.2 Nanosistemas aceptados por la FDA.

1.2.1.1.1. Mecanismos de liberación dirigida

La llegada de agentes de diagnóstico y terapéuticos difiere drásticamente entre el tejido sano y el tumoral debido a las diferencias que existen en las estructuras de ambos tejidos. Una característica común de los tumores sólidos es que presentan alteradas la barrera vascular y la intersticial, facilitando la entrada de los fármacos en el interior del tumor. Este cambio favorece la acumulación pasiva de moléculas, liposomas o NPs, en los tejidos tumorales. Este fenómeno es conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (efecto "EPR", del inglés Enhanced Permeability and Retention effect), permitiendo la penetración pasiva del fármaco (farmacoterapia pasiva). El efecto EPR supone una ventaja en la utilización de NPs en el tratamiento de tumores sólidos, ya que permite la entrada de estas partículas en el interior del tumor. Sin embargo, se ha de mejorar la distribución homogénea de las NPs en todas las regiones del tumor en cantidades suficientes.

Para una eficacia óptima, un agente terapéutico debe llegar a los tumores en cantidades lo suficientemente grandes como para matar las células cancerosas, pero al mismo tiempo no debe tener efectos adversos en los tejidos sanos. Una de las mayores ventajas de los nanomateriales es el pequeño tamaño de las partículas, que facilita el transporte hasta las células tumorales de manera más eficiente que el transporte de

moléculas grandes. Sin embargo, las moléculas pequeñas tales como agentes quimioterapéuticos, generalmente suelen causar efectos adversos en la mayoría de los tejidos sanos (Bae et al., 2011; Li, Wang et al., 2012).

Para combatir estos efectos secundarios no deseados, uno de los campos más explorados en la nanomedicina son NPs con ligandos direccionantes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o receptores específicos del tumor) en su superficie, que reconocen y se unen específicamente a la vascularización del tumor o a las células cancerosas (Azzopardi et al., 2013).

La Figura 1.7 muestra la representación esquemática de los diferentes mecanismos de liberación de fármacos en los tumores. Los nanomateriales representados con esferas muestran la liberación pasiva que se consigue por la permeabilidad de la vasculatura del tumor y el drenaje linfático (efecto EPR). La liberación celular activa (inserción) se logra mediante la funcionalización de la superficie de las NPs con ligandos que promueven el reconocimiento específico de las células diana. La liberación del contenido puede llevarse a cabo por la estrecha proximidad a las células diana, por la unión a la membrana de la célula y actuar como un depósito de fármaco de liberación sostenida extracelular o por la internalización dentro de la célula (Peer et al., 2007).

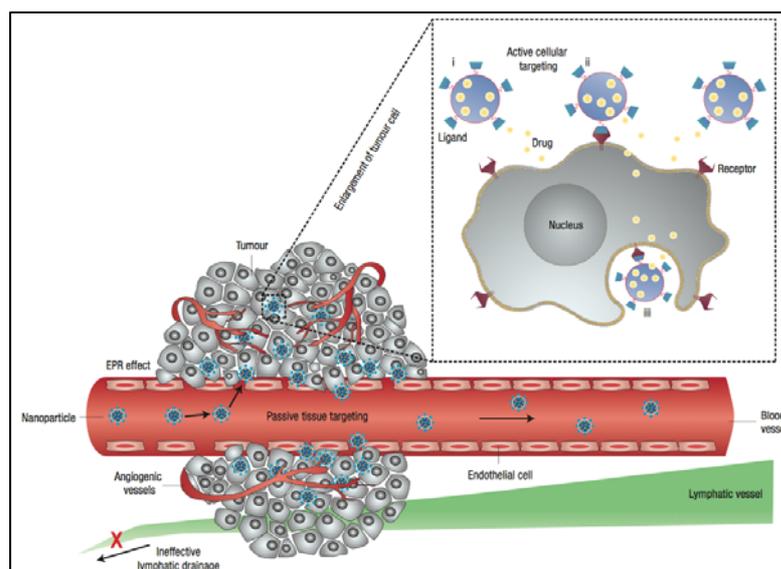


Figura 1.7. Representación esquemática de los mecanismos de liberación de fármacos dirigidos al tumor. (Peer et al., 2007).

1.2.1.1.2. Influencia de la NP en la liberación dirigida

El tamaño de las partículas terapéuticas afecta directamente a su tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Siempre y cuando el agente terapéutico no sea tóxico para los tejidos sanos, es una ventaja prolongar su vida media en sangre. Un aspecto interesante a considerar es que el diámetro hidrodinámico está inversamente relacionado con la depuración renal. Las partículas con un diámetro hidrodinámico menor de 10 nm se eliminan rápidamente por los riñones (vida media en sangre < 600 min), mientras que el aumento en el diámetro de partícula puede aumentar significativamente la vida media de estos agentes en el torrente sanguíneo y en el cuerpo (Li et al., 2012; Morigi et al., 2012).

No sólo el tamaño, también la carga de la superficie y la forma de la NP juega un papel crucial en la extravasación y el transporte intersticial.

Se ha demostrado que la carga superficial catiónica de las NPs las dirige preferentemente a las células endoteliales tumorales además de presentar una permeabilidad vascular mayor en comparación con sus homólogos aniónicos. Sin embargo, las NPs neutras difunden más rápido y se distribuyen más homogéneamente en el interior del espacio del tumor intersticial que las partículas catiónicas y aniónicas (Li et al., 2012).

La forma de la NP influye mucho en la farmacocinética y biodistribución. Por ejemplo, las micelas filamentosas tienen tiempos de circulación en sangre alrededor de 10 veces superior que sus homólogas esféricas (Geng et al., 2007), mientras que los nanotubos filamentosos con diámetros muy pequeños (< 2 nm) tienen una depuración renal rápida y los tiempos de circulación son inferiores a 3h (Singh et al., 2006). Para partículas esféricas, la internalización es más rápida si las partículas son más pequeñas y podrían seguir un mecanismo diferente que para las partículas más grandes. Por ejemplo, las AuNPs y AgNPs de tamaños de 40-50 nm son capaces de unirse más eficazmente e inducir procesos de endocitosis mediada por receptor en comparación con el resto de tamaños estudiados de 2 a 100 nm (Jiang et al., 2008). Para partículas no esféricas, se ha demostrado que la geometría local de la partícula en el punto de contacto con la célula determina si va a ser internalizado o no (Champion et al., 2006).

Además de los riñones, la interacción entre las NPs y el sistema reticuloendotelial (SRE) en el hígado y en el bazo tiene un papel importante en la eliminación de las NPs. La eliminación desde el SRE depende no sólo del tamaño de las partículas sino también de la modificación de la superficie y puede variar significativamente entre los diferentes tipos de NPs.

Teniendo en cuenta el SER, para lograr tiempos de circulación en sangre más elevados la forma más común es modificar la NP con polietilenglicol (PEG). Las NPs están estéricamente estabilizadas por la fijación de PEG a la superficie (pegilación); esta estabilización estérica impide la opsonización por proteínas del suero y la fagocitosis por macrófagos (Morigi et al., 2012).

En resumen, el reto es liberar la NP de forma uniforme en el tumor y sus metástasis. Dada la naturaleza altamente heterogénea y en constante evolución del microambiente del tumor, el diseño óptimo del nanosistema es probable que sea específico para cada enfermedad. Ésta es una ardua tarea, especialmente teniendo en cuenta la diferencia de un tumor a otro y de un único tumor primario a su metástasis.

1.2.1.1.3. Transporte de fármacos

El transportador del fármaco debe focalizarse en la célula tumoral y proteger el sistema para liberar de forma controlada el fármaco en la célula diana. El transportador puede llevar el fármaco con un enlace covalente o no covalente (Doane et al., 2012).

En la Tabla 1.3 se describen los diferentes mecanismos de liberación del fármaco del sistema.

MECANISMOS DE LIBERACIÓN DEL FÁRMACO	
<u>Enlace covalente y no covalente</u>	
pH :	
- Protonación del fármaco	
Térmico:	
- Rotura de enlace directo	
Biomoléculas:	
- Interacción del ligando	
- Liberación enzimática	
- Modulación Redox	
<u>Enlace covalente</u>	<u>Enlace no covalente</u>
Luz:	Hidrofobicidad:
- Ligando fotosensible	- Fuerzas hidrófobas/hidrófilas

Tabla 1.3 Mecanismos de liberación del fármaco diferenciados en enlace covalente o no covalentes entre el fármaco y el portador.

Uno de estos mecanismos de liberación de fármacos es producido por el cambio de pH que existe entre el fluido extracelular (pH 7,4) y el pH de los endosomas ($\approx 5,5 - 6,5$) y lisosomas ($\approx 3,0 - 5,5$) (Hoffman et al., 2002); además se conoce que el pH en el tejido tumoral es menor que en los tejidos sanos.

Los cambios térmicos pueden provocar la difusión del fármaco o la rotura de la cápsula que contiene el fármaco. Además, las NPs metálicas y magnéticas aportan otras ventajas en los sistemas de liberación ya que cambian sus propiedades físico-químicas al absorber calor.

Las propiedades ópticas de algunos nanomateriales como por ejemplo los QDs o las AuNPs modifican el enlace entre el fármaco y el transportador.

Finalmente, el uso de fuerzas hidrófobas e hidrófilas se aplican en enlaces no covalentes. Los liposomas son un ejemplo en el que se utiliza este mecanismo y también, en NPs donde hay una cobertura de moléculas en la superficie creando una cobertura hidrófila o hidrófoba.

1.2.1.1.4. Tipos de NPs

A continuación se describen los diferentes nanomateriales con características de portador de fármacos:

Liposomas

Los liposomas son nanovesículas con forma esférica, compuestas de una bicapa lipídica, normalmente fosfolípidos. La cavidad interna es adecuada para el transporte de pequeñas moléculas, convirtiéndolos en candidatos prometedores como sistemas de administración de fármacos.

La tecnología de los liposomas fue descubierta hace cuatro décadas y ya se pueden encontrar diversos productos en el mercado. Además, hay varios estudios preclínicos y clínicos con liposomas en proceso y muchos productos liposomales que se espera que lleguen al mercado en los próximos años. Algunos de los productos que han sido comercializados con éxito son:

- Abelcet® (anfotericina B complejo lipídico) para las infecciones por hongos.
- DepoDur® (liposomas de sulfato de morfina) como analgésico.
- Definity® (microesferas de perflutreno) como agente de contraste de ultrasonido.

Concretamente en el campo de la oncología los liposomas aprobados son:

- Doxil® (doxorrubicina HCl liposomas) para el cáncer de ovario y el mieloma múltiple.
- DepoCyt® (citarabina liposomal) para el cáncer de mama.
- Daunoxome® (liposomas citrato daunorubicina) para Sarcoma de Kaposi avanzado producido por la infección de VIH.

Los liposomas se han aplicado en muchos campos de la medicina y una de sus ventajas es su biodegradabilidad. Sin embargo, existen algunos problemas que limitan la producción y el desarrollo de los liposomas, como son la estabilidad, la baja reproducibilidad entre lotes, las dificultades para la esterilización y los bajos niveles de carga de fármaco. Además, su tamaño es relativamente grande ya que generalmente son mayores de 100 nm de diámetro.

NPs poliméricas

Diferentes polímeros biodegradables tales como polilactidas (PLA), poliglicólidos (PGA) y polilactida-poliglicólidos (PLGA) se han utilizado ampliamente para sintetizar NPs poliméricas. El polímero debe ser químicamente inerte, no tóxico y libre de impurezas lixiviables con el fin de ser utilizados en aplicaciones médicas. Los

1.2 NANOMEDICINA

polímeros han sido diseñados estratégicamente para aplicaciones médicas y han logrado la liberación controlada de fármacos y la degradación del polímero en el cuerpo después de la entrega. Las estructuras más comunes para este tipo de sistemas son nanocápsulas, nanoesferas y dendrímeros.

Las NPs poliméricas se han utilizado mayoritariamente como sistemas de administración debido a su capacidad de mantener la estabilidad de los fármacos y también por la posibilidad de llegar directamente a la célula diana. Por lo general, el fármaco se disuelve quedando atrapado, encapsulado o unido a la NP, dependiendo del método de preparación. Las nanocápsulas son vehículos diseñados para tener el fármaco en la cavidad interior y el polímero rodeando al fármaco. Por el contrario, en las nanoesferas el fármaco está dispuesto entre las moléculas poliméricas a lo largo de la partícula.

Ejemplos aprobados de NPs poliméricas son :

- Neulasta® (PEG-G-CSF) fue aprobado para la neutropenia asociada a la terapia contra el cáncer.
- Pegintron® y Pegasys® (peginterferón alfa-2b y 2a) se han aprobado para la hepatitis.
- Welchol® (clorhidrato de colesvelam) es un hipolipemiante y agente reductor de la glucosa, aprobado para reducir el colesterol y la diabetes tipo 2.

Las NPs poliméricas aprobadas concretamente para el tratamiento del cáncer son:

- Abraxane® (partículas de paclitaxel ligadas a la proteína albúmina), la primera NP polimérica aprobada (2005). Este producto está indicado para muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama ([www.nanopharmaceuticals.org / Polymeric_nanoparticles.html](http://www.nanopharmaceuticals.org/Polymeric_nanoparticles.html))
- Oncaspar® (PEG-L-asparaginasa), como tratamiento para la leucemia linfocítica aguda.

Los dendrímeros se utilizan principalmente para la administración de fármacos y para el diagnóstico por imagen. La superficie de los dendrímeros es susceptible de modificaciones y puede ser adaptada en función de la aplicación

específica. Sin embargo, bajo algunas condiciones fisicoquímicas los dendrímeros pueden causar toxicidad debido a su capacidad para romper las membranas celulares con su superficie cargada positivamente (Moghimi et al., 2005). Actualmente existe un medicamento basado en dendrímeros en fase 3 de ensayo clínico: VivaGel® que actúa como un microbicida vaginal diseñado para prevenir la transmisión de infecciones de transmisión sexual, incluido el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el herpes genital (Starpharma, Mel-Bourne, Australia) (Bawarski., 2008).

Puntos cuánticos

Los puntos cuánticos (QDs) son estructuras semiconductoras con propiedades ópticas y electrónicas únicas relacionadas con el tamaño y la forma del cristal individual. La síntesis de QDs puede llevarse a cabo a través de la síntesis coloidal o electroquímica. Los QDs más comunes son seleniuro de cadmio (CdSe), telururo de cadmio (CdTe), fosfuro de indio (InP) y arseniuro de indio (InAs). El tamaño de los cristales y sus propiedades conductoras se pueden controlar durante la síntesis.

La principal aplicación de los QDs es la bioimagen. Estas partículas actúan como agentes de contraste y de esta manera pueden mostrar una mayor resolución que los marcadores fluorescentes utilizados en la actualidad para el diagnóstico. Las partículas pueden absorber la luz blanca y volver a emitirla en nanosegundos. La energía emitida (longitud de onda entre 400 y 1350 nm) depende del tamaño de partícula. Los QDs se pueden modificar a través de la conjugación de las diversas moléculas y podrían aplicarse también como sistemas de liberación de fármacos, aunque algunos de ellos pueden tener efectos citotóxicos. Es conocido que el CdSe libera iones de cadmio después de la exposición a largo plazo a la luz ultravioleta, y las partículas de CdTe producen especies reactivas de oxígeno cuando pierden su capa protectora después de un tiempo de circulación prolongado. La investigación con QDs se centra principalmente en la creación de recubrimientos biocompatibles y estables (Bawarski et al., 2008).

NPs inorgánicas

Las NPs inorgánicas tienen un enorme potencial debido a sus especiales propiedades físicas y ópticas convirtiéndolas en objeto de estudio en diversas investigaciones para nuevas aplicaciones médicas. Las NPs inorgánicas son sintetizadas principalmente a base de metal. Estos materiales se estudiaron

1.2 NANOMEDICINA

inicialmente para la formación de imágenes por resonancia magnética y de alta resolución de superconductores de interferencia cuántica, pero las partículas inorgánicas además mostraron una gran utilidad en diagnóstico y terapia. En el diagnóstico, se han conseguido una nueva generación de biosensores (Minelli et al., 2010) y un aumento en la sensibilidad de las imágenes de contraste (Peer et al., 2007). NPs tales como los óxidos de hierro, oro y plata son las más utilizadas. En terapia, las NPs metálicas están siendo probadas como vehículos de fármacos en varias patologías. En particular, la modificación superficial de materiales metálicos con polímeros biocompatibles y moléculas naturales ofrece sistemas multifuncionales. Sin embargo, por el momento, sólo unos pocos han llegado a ensayos clínicos en humanos.

Los nanoshells son nanoesferas con un núcleo dieléctrico (generalmente de sílice), cubierto con una carcasa metálica ultra fina. Expresan características de resonancia óptica que se pueden ajustar para absorber en cualquier parte del espectro electromagnético. Estas propiedades ópticas y la superficie modificable las hace buenas candidatas para diversas aplicaciones biomédicas, tales como la administración de fármacos, la terapia del cáncer por ablación fototérmica y el diagnóstico por imagen.

Las AgNPs se han utilizado durante mucho tiempo en aplicaciones tales como la catálisis y la electrónica. Sin embargo, en los últimos años, los diferentes mercados han aprovechado los efectos bactericidas de este material. Esta propiedad ha sido utilizada con éxito por la industria textil, para el tratamiento de aguas o para contenedores de alimentos. Sin embargo, este tipo de NPs muestran toxicidad en determinadas concentraciones debido a la liberación de iones de plata de las partículas; lo que ha provocado que los organismos reguladores incrementen la vigilancia en el uso de este nanomaterial. Es por eso que se están realizando un gran número de estudios con el fin de garantizar la seguridad de estos sistemas en sus futuras aplicaciones médicas (Duncan et al., 2011).

Las AuNPs se están estudiando ampliamente en el campo de la medicina debido a su biocompatibilidad, a su química de recubrimiento versátil y también a sus propiedades ópticas. Dado que la gama de AuNPs y sus aplicaciones continúa aumentando, existe una preocupación creciente acerca de la seguridad humana, lo que hace que sea necesario comprender mejor los posibles riesgos de toxicidad de estas

NPs. Sin embargo, en la actualidad, uno de los principales problemas es la discrepancia con las condiciones experimentales en las que se evalúan los efectos de toxicidad y biodistribución (Khlebtsov et al., 2011). Por esta razón, los organismos reguladores están trabajando duro con el fin de armonizar los protocolos para estudiar esta clase de NP. Partículas de oro pegiladas covalentemente y unidas a rhTNF α (CYT-6091) se encuentran en ensayos clínicos como un agente contra el cáncer (Paciotti et al., 2004).

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono se componen de láminas de grafito enrolladas. Dependiendo del grado de enrollamiento y la forma de la lámina original, el resultado puede ser nanotubos de diferentes diámetros y geometrías internas, produciendo diferentes propiedades electroquímicas, térmicas y espectroscópicas. Por este motivo, los nanotubos de carbono suponen una amplia plataforma para aplicaciones biológicas, tales como vehículos de fármacos y agentes de imagen.

Para aplicaciones biológicas, la superficie de los nanotubos de carbono a menudo se modifica por adsorción no covalente (PEG-lípidos) o por funcionalización covalente (carboxilación) para permitir la entrega intracelular de los fármacos. Aunque, hay muchos estudios relacionados con los nanotubos (Shi et al., 2007) la toxicidad es todavía un tema de controversia, en parte debido a la forma física de los nanotubos, similares a las fibras de amianto carcinógenas. Algunos estudios sugieren que los nanotubos pueden cruzar barreras de membrana e inducir efectos perjudiciales tales como reacciones inflamatorias y fibróticas (Porter et al., 2007). Aunque los nanotubos tienen un gran potencial, hay pocos productos en el mercado. Nanomix® (Emeryville CA, EE.UU.) desarrolla sensores basados en nanotubos de carbono para el seguimiento de las funciones respiratorias y ya ha iniciado los ensayos clínicos.

Óxidos de hierro

Las dos formas principales de cristales de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs) son magnetita (Fe $_3$ O $_4$) y su forma oxidada magemita (γ - Fe $_2$ O $_3$). Sus propiedades superparamagnéticas se aplican en sensores e imágenes por resonancia magnética (IRM) para el diagnóstico y la terapia médica. Mientras el cobalto (Co) y el níquel (Ni) son también materiales altamente magnéticos, pueden ser tóxicos y fácilmente oxidados. Algunas aplicaciones de SPIONs necesitan

1.2 NANOMEDICINA

recubrimiento con ácidos grasos de cadena larga, alquil-aminas sustituidas y dioles para superar la toxicidad. Se necesitan recubrimientos optimizados para cada aplicación específica.

Algunos SPIONs que se encuentran actualmente en el mercado son Feridex® (Bayer HealthCare Pharmaceuticals) con recubrimiento de dextrano para obtener imágenes del hígado y Gastromark® (AMAG farmacéuticos) con recubrimiento de silicona utilizado para imágenes gastrointestinales.

Aunque los SPIONs se utilizan de forma segura para la formación de imágenes clínicas IRM, es importante considerar cuidadosamente la dosis y la toxicidad potencial en cada aplicación clínica. Se ha documentado que el hierro induce la formación de radicales libres, pero la toxicidad depende más a menudo del revestimiento de los SPIONs .

La nanotecnología ofrece una amplia plataforma de diferentes materiales para el diseño de partículas de última generación para diversas aplicaciones. Sólo el futuro dirá si todos los posibles tipos de NPs serán realmente útiles mejorando los productos actuales. Los avances en la tecnología permiten a los investigadores seguir mejorando en este campo mostrando datos prometedores.

1.3. Nanopartículas de oro

El oro como material fue descubierto en Bulgaria hace cinco mil años. Sin embargo, el oro coloidal se cree que apareció por primera vez en la antigüedad, en China y Egipto, con fines terapéuticos y decorativos. Un ejemplo famoso es la copa de Licurgo, del siglo IV, visible en el Museo Británico de Londres (Figura 1.8).



Figura 1.8. Imagen de la Copa de Licurgo. Museo Británico de Londres.

El oro no es un elemento esencial para ningún ser vivo, sin embargo, en la antigüedad se creía que comer los alimentos en platos de oro podría retardar el envejecimiento y prolongar el tiempo de vida de las personas. También durante la gran peste negra en Europa existía la creencia de que ingerir oro en forma de polvo fino podría curar a los enfermos.

El oro se ha utilizado mayoritariamente en la joyería y electrónica. Es un metal de transición, brillante y su color en estado sólido masivo es el amarillo; sin embargo, cuando está en dimensiones nano, su color cambia a un morado oscuro como resultado de la interacción de los electrones de la banda de conducción con el campo eléctrico de la luz incidente. Es característica su ductilidad y maleabilidad, es un material blando y por eso se endurece al alearlo con otros metales. Tiene una alta resistencia a la alteración química por parte del calor, la humedad y la mayoría de los agentes corrosivos.

En 1857, Faraday reportó el primer artículo científico sobre las AuNPs, atribuyendo el color rojo a la naturaleza coloidal de las AuNPs sintetizadas con cloruro de oro y citrato de sodio (Faraday et al., 1857). En 1908 Mie desarrolló una teoría para

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

estudiar la absorción visible de las AuNPs esféricas y homogéneas, utilizando las ecuaciones de Maxwell (Mie et al., 1908). El interés por las AuNPs se encuentra en las nuevas propiedades físico-químicas encontradas en el oro debido a su cambio de tamaño, cambios en los niveles electrónicos y el incremento de los átomos de superficie respecto a su volumen. Desde los primeros estudios, se ha avanzado mucho en óptica, catálisis, ciencia de materiales, biología y medicina. Esto ha permitido que se desarrollaran técnicas y productos como los biosensores (Minelli et al., 2010), herramientas para el diagnóstico de enfermedades (Alivisatos et al., 1996), herramientas para el diagnóstico por imagen (Minelli et al., 2010) y mejoras en los procesos de catálisis (Haruta et al., 1987).

1.3.1. Síntesis de las AuNPs

El factor clave en la síntesis de AuNPs es conseguir un tamaño controlado y monodisperso. En los últimos 40 años se ha trabajado mucho en esta síntesis para obtener diferentes tamaños a partir de la reducción del oro en presencia de un agente estabilizante que impida la aglomeración de las partículas.

Los métodos básicos para la preparación de AuNPs implican métodos físicos, químicos y biológicos.

Los métodos físicos son:

Irradiación por microondas

Una aplicación es la utilización de los campos eléctricos de alta frecuencia para calentar cualquier recubrimiento de cuerpos cerámicos con NPs metálicas (Tuval et al., 2007).

Método sonoquímico

Se emplea la radiación ultrasónica. La sal de oro reacciona con agentes de protección terminal, tales como tioles, citratos, alcohol polivinílico (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP) y reductores como el citrato de sodio, ácido ascórbico y perborato de sodio. Se ha utilizado el método sonoquímico para preparar AuNPs recubiertas con un tiol funcionalizado en líquido iónico (TFIL, *Thiol-functionalized ionic*

liquid) usando peróxido de hidrógeno como catalizador radicalario en la reacción de reducción (Jin et al., 2007).

Ablación por láser

Es un proceso de eliminación de material de una superficie sólida (ocasionalmente puede ser líquida), mediante la irradiación de un rayo láser. La ablación con láser en forma líquida es una técnica simple que utiliza láser de alta potencia y láser de alta frecuencia de repetición en picosegundo o femtosegundo (fs). La energía térmica se degenera en el líquido y hace romper el material. La técnica produce NPs con superficie cargadas de una capa de moléculas dipolares (por ejemplo, agua) formadas alrededor, evitando la aglomeración. Kabashin (Kabashin et al., 2003) ha utilizado la técnica de láser de fs para la ablación de oro en agua y soluciones acuosas de R-ciclodextrin para producir AuNPs coloidales sin impurezas químicas.

Irradiación ultravioleta

Abyaneh y su equipo prepararon compuestos de oro-polimetilmetacrilato (PMMA) mediante el método de fotorreducción utilizando irradiación UV. Se formaron AuNPs triangulares en el medio polimérico a una concentración específica de la sal y a exposición al UV de oro (Abyaneh et al., 2007).

Método termolítico

Método basado en la descomposición térmica de precursores de determinados metales disueltos en un medio polimérico específico y a una temperatura determinada. El método implica la mezcla de un polímero con un precursor termolítico para facilitar una dispersión homogénea por calentamiento proporcionando un polímero fundido y una fisión termolítica del precursor, generando las partículas en el polímero fundido (Nakamoto et al., 2002).

Métodos fotoquímicos

Implican el uso de la luz ambiente para descomponer varios compuestos que producen tioles y al producirse las NPs metálicas ya quedan conjugadas. Este enfoque permite la síntesis de una sola fase de NPs metálicas uniformes. También reduce el coste, ya que minimiza el uso de productos químicos y disolventes (Warren et al., 2007).

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Los métodos químicos son:

Método clásico Turkevich-Frens

El método clásico de síntesis de AuNPs por reducción de oro (III) con citrato de sodio en agua fue introducido en 1951 por Turkevich (Turkevich et al., 1951), que se ha considerado durante mucho tiempo un ejemplo del clásico proceso de nucleación de Lamer (LaMer et al., 1950), basado en la combinación de una nucleación repentina, de un crecimiento lento de partículas primarias que maduran para formar partículas monodispersas. En 1973, Frens publicó cómo obtener AuNPs de tamaño controlado entre 16 y 147 nm de diámetro a través de una síntesis controlada por la relación entre los agentes reductores y estabilizantes (citrato trisódico) y la sal de oro(III) (Frens et al., 1973). La estrategia de síntesis consiste en la inyección rápida de reactivos en un disolvente caliente en presencia de moléculas reductoras. Se produce rápidamente una descomposición y una nucleación homogénea sobre la inyección. El tiempo de vida de cada uno de los átomos o de las especies intermedias en la solución es corto y muchos grupos pequeños de metal (núcleos) se forman simultáneamente. Sin embargo trabajos como el de Chow ha mostrado que este período inicial de nucleación no produce partículas "semilla" si no que da lugar a la formación de agregados grandes que posteriormente se convierten en partículas monodispersas mucho más pequeñas (Chow et al., 1994). Actualmente, se está avanzando mucho en la modificación de la superficie de estas moléculas, substituyendo el citrato por otros ligandos, y así aumentar las posibles aplicaciones de éstas (por ejemplo, ADN tiolado) (Daniel et al., 2004; Katz et al., 2004).

Método Brust-Schiffrin

El método de Brust-Schiffrin (Brust et al., 1994) fue desarrollado a principios de los 90 y se caracteriza por sintetizar AuNPs en líquidos orgánicos (como el tolueno). El ácido cloroáurico (Au^{+3}) se transfiere a la fase tolueno a partir de una fase acuosa usando un catalizador de transferencia de fase, como el bromuro de tetraoctilamonio (TOAB). A continuación se separan las dos fases y la adición de una cantidad deseada de dodecanotiol a la fase orgánica separada reduce el Au^{+3} a Au^{+1} . Otra solución acuosa que contiene borohidruro de sodio, principal agente reductor, se pone en contacto con la fase orgánica. La formación de partículas se observa por el cambio de color de la fase orgánica. Para evitar la agregación se puede añadir un agente de unión fuerte, como un tiol (en particular, alcanotioles) (Rama et al., 2013).

Otros

Otros métodos químicos de síntesis de NPs esféricas utilizan los métodos básicos; siempre consta de una sal de oro, un agente reductor y un estabilizante que puede ser diferente del reductor. Los ligandos estabilizantes y funcionales son ligandos que contienen aminas, tioles para repulsiones estéricas y sales para la estabilidad por repulsión electroestática.

Los métodos biológicos son:

Uso de microorganismos (hongos, bacterias)

La biotransformación de oro incluye la reducción de Au^{+3} a Au^0 (oro metálico). Se considera que los microorganismos juegan un papel importante en los procesos que conducen a la formación de minerales de oro y AuNPs en la naturaleza (Hough et al., 2011). La formación de AuNPs se ha sintetizado en una variedad de microorganismos que incluyen bacterias y hongos (Deplanche et al., 2012; Philip et al., 2009). El trabajo de Philip consiste en la utilización de un extracto de *Volvariella volvacea*, un hongo comestible de origen natural, como reductor y protector a la vez.

Uso de extracto de plantas o enzimas

La biosíntesis con extractos de plantas como el extracto de *Zingiber officinale* actúa como un agente reductor y estabilizador de la sal de oro para la síntesis de AuNPs (Kumar et al., 2011).

Uso de DNA, virus y diatomeas

Un ejemplo de síntesis de AuNPs utilizando virus es el descrito por Slocik que utiliza la química de superficie única y topológica de la cápside con el precursor metálico. La síntesis se llevó a cabo mediante dos vías; una de las vías tuvo lugar por la reducción del AuCl_4^- mediante residuos de tirosina que se encuentran en la superficie de la cápside viral; y la segunda vía fue por la reducción del virus cargado con Au^{+1} y borohidruro (Slocik et al., 2005).

1.3.2. Aplicaciones de las AuNPs como liberación de fármacos antitumorales

La principal característica de un sistema de liberación de fármacos es dirigir y concentrar el fármaco en el tejido de interés y minimizar la concentración en el resto. La consecuencia es la localización de los fármacos en el tumor disminuyendo los efectos secundarios. Además, se consigue reducir la dosis de fármaco, ya que se puede modular la farmacocinética y la biodistribución, mejorando en definitiva el índice terapéutico en el paciente (Allen et al., 2004; Farokhzad et al., 2009).

Las AuNPs son uno de los nanomateriales más eficaces en las terapias basadas en liberación de fármacos antitumorales (Cobley et al., 2011). La liberación puede darse por diferentes estímulos como cambios en las concentraciones iónicas, que dan respuestas inmediatas a la liberación de la carga del nanosistema en las células o tejido diana (Dreaden, Alkilany et al., 2012; Dreaden et al., 2011).

La unión de los agentes estabilizadores o principios activos se realiza en la superficie de las AuNPs, que tienen la capacidad de participar en enlaces covalentes y no covalentes en la unión. Estos agentes incluyen una gran variedad de biomoléculas como ADN, anticuerpos, péptidos, polímeros que son liberados en el tumor (Figura 1.9) (Ghosh et al., 2008) mediante los mecanismos descritos en la Tabla 1.3.

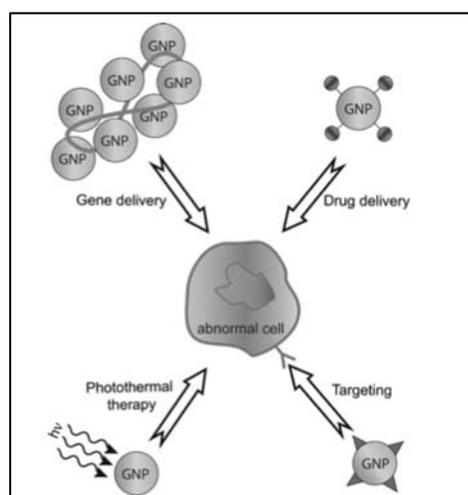


Figura 1.9. Representación esquemática de las AuNPs en la liberación de fármacos. (Ghosh et al., 2008).

La unión no covalente ofrece un modo relativamente fácil de conjugar, pero el acoplamiento de ligandos a la superficie de las AuNPs a través de un enlace covalente o dativo aumenta la estabilidad del conjugado, necesaria cuando las partículas se introducen en entornos con alta fuerza iónica, como el torrente sanguíneo, ya que podrían causar efectos adversos, como la agregación e insolubilidad. Tradicionalmente, la unión covalente se consigue a través de un tiol libre, una amina o un carboxilato, que permite la fácil conjugación a una variedad de biomoléculas y biopolímeros. Los enlaces de Au-S son bastante robustos ($\sim 40 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Ulman et al., 1996)), aproximadamente la mitad de la fuerza de un enlace típico C-C o C-H; sin embargo, los enlaces Au-N ($\sim 8 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tarazona-Vasquez et al., 2004)) y Au-COO ($\sim 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tarazona-Vasquez et al., 2004)) tienen energías de disociación mucho más débiles y se desplazan más fácilmente.

Algunos ejemplos de enlaces no covalentes estables han sido el de McIntosh (McIntosh et al., 2001), que estabilizó las AuNPs con una monocapa de un agente catiónico (*11-trimethylammoniumundecanethiol*), y adjuntó no covalentemente el esqueleto de fosfato cargado negativamente del ADN a la superficie de la NP (Figura 1.10). Otro estudio también demostró que sistemas aniónicos, como son las AuNPs estabilizadas con citrato, podían acoplarse al anticuerpo del antígeno específico de próstata (*PSA, Prostate Specific Antigen*) a través de interacciones electrostáticas (Liu et al., 2008).

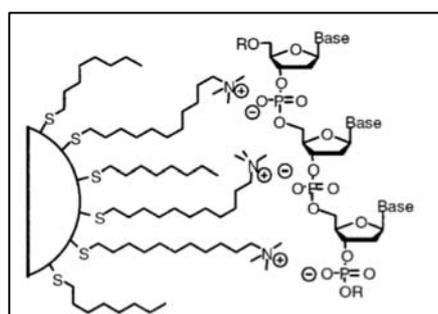


Figura 1.10. Representación esquemática de la síntesis del sistema descrito por McIntosh et al. para enlace no covalente con ADN. (McIntosh et al., 2001).

Sin embargo, y como anteriormente hemos mencionado, los enlaces covalentes estabilizan mejor el nanosistema. Existen varios ejemplos en los que un complejo platinado (platino (IV)) unido a NP enlazados covalentemente se han utilizado como vehículo de administración para la liberación intracelular de iones de platino (II). Un

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

ejemplo, son las AuNPs funcionalizadas con oligonucleótidos que terminalmente tienen una amina y donde el carboxilo del compuesto platinado se sintetiza mediante una síntesis química estándar de carbodiimida con EDC y NHS para finalmente conjugarlo a la amina que recubre la AuNP. Se diseñó para una posterior pérdida de los ligandos axiales al cambio de pH intracelular y obtener el cisplatino libre (Figura 1.11). La citotoxicidad aumentó en varias líneas celulares superando al del cisplatino libre (Dhar et al., 2009).

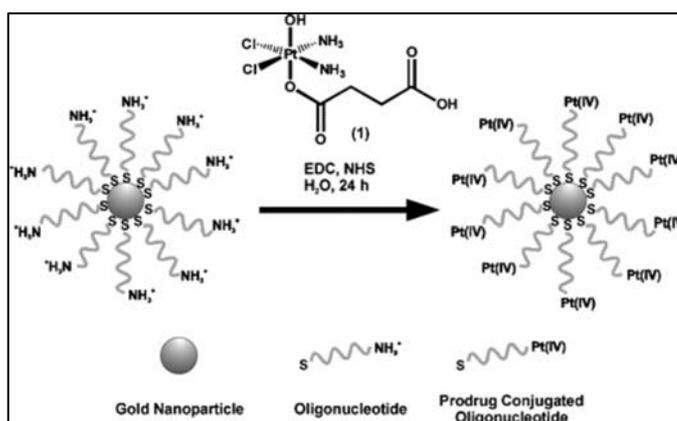


Figura 1.11. Representación esquemática de la síntesis del sistema descrito por Dhar et al. con el cisplatino. (Dhar et al., 2009).

Otro sistema que utiliza el Pt como base de su fármaco es el descrito por Brown. En este estudio se conjugó el oxaliplatino a una AuNP. La AuNP se funcionalizó primero con un polietilenglicol tiolado (PEG) dejando el grupo carboxilato terminal libre para conjugar el oxaliplatino (Figura 1.12). El sistema fue analizado en diversas líneas celulares tumorales y se observó una significativa mejora en la citotoxicidad del nanosistema comparándolo con el oxaliplatino solo, además de una capacidad inusual para penetrar en el núcleo de las células de cáncer de pulmón (Brown et al., 2010).

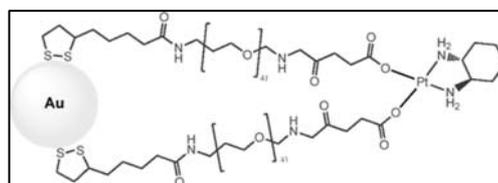


Figura 1.12. Representación esquemática del nanosistema descrito por Brown et al. con oxaliplatino. (Brown et al., 2010).

Se han utilizado otro tipo de moléculas para la conjugación con AuNPs y formar un sistema de liberación. El paclitaxel, por ejemplo, fue conjugado a las AuNPs mediante una modificación de la molécula. Un enlazador con función terminal de carboxilo libre (hexaetilenglicol) se conjuga mediante la esterificación basada en carbodiimida a la posición C-7 del paclitaxel que a su vez se conjugó directamente a 4-mercaptofenol unido a las AuNPs (Figura 1.13) (Gibson et al., 2007).

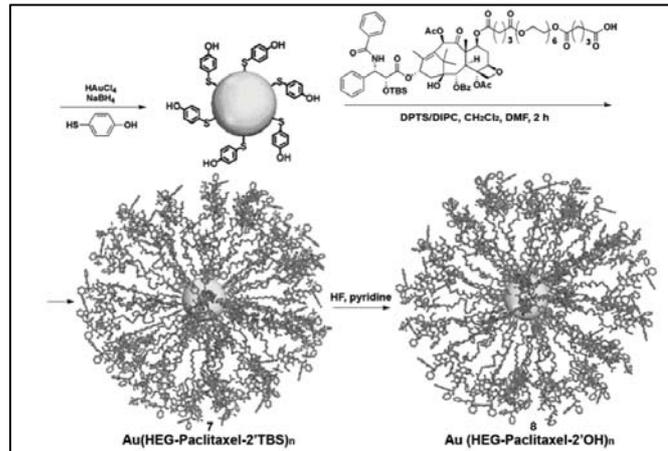


Figura 1.13. Representación esquemática de la síntesis del sistema descrito por Gibson et al. con paclitaxel. (Gibson et al., 2007).

Otro ejemplo interesante de fármaco antitumoral es el descrito por Agasti, utilizando 5-fluorouracilo conjugado a las AuNPs a través de un enlace fotosensible de o-nitrobencilo. Estas partículas fueron sintetizadas con un pentanotiol que contiene 5-fluorouracilo y un ión zwitterión para aumentar la solubilidad (Figura 1.14). La irradiación con luz UV a 365 nm resultó idónea para la liberación controlable del fármaco, que ejerce su efecto citotóxico sólo cuando se libera de la superficie de la partícula. La falta de toxicidad de los conjugados antes del lanzamiento fotoinducido del ligando podría ser muy beneficioso para el tratamiento específico del cáncer *in vivo*, en cooperación con el efecto EPR (Agasti et al., 2009).

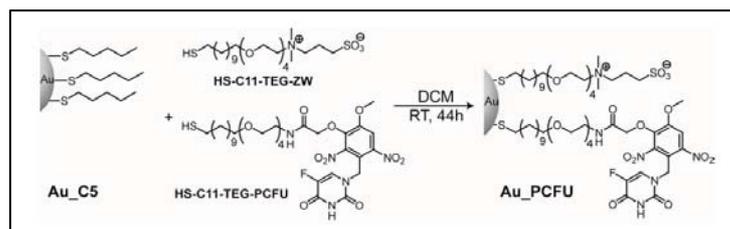


Figura 1.14. Representación esquemática de la síntesis del sistema descrito por Agasti et al. con 5-fluorouracilo. (Agasti et al., 2009).

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

La doxorubicina también es un fármaco utilizado con AuNPs. El nanosistema descrito por Prabaharan, es un sistema Au-P(LA-DOX)-b-PEG-OH/FA que consta de un núcleo de AuNP, una capa hidrofóbica (L-aspartato-doxorrubicina, P(LA-DOX)), y una capa hidrofílica (PEG-OH/FA). El conjugado DOX fue liberado más rápidamente a pH 5,3 y 6,6 que a pH 7,4, lo que supone una buena característica para la administración de fármacos en el tumor diana (Prabaharan et al., 2009).

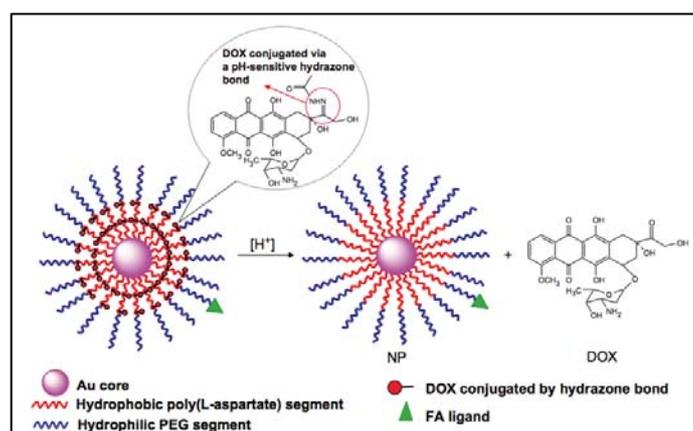


Figura 1.15. Representación esquemática del sistema descrito por Prabaharan et al. con doxorubicina. (Prabaharan et al., 2009).

1.3.3. Toxicidad de AuNPs

Los compuestos basados en oro se han utilizado en clínica como agentes anti-inflamatorios para tratar la artritis reumatoide (Auranofin® y Tauredon®) (Finkelstein et al., 1976). Además, micropartículas de oro radiactivas se han utilizado en el tratamiento local del cáncer (Metz et al., 1982). El inconveniente con las NPs es que su gran relación superficie/volumen y la gran variedad de modificaciones que se pueden realizar en ella, pueden afectar a la reactividad química de la NP y esto a su vez generar mayores efectos toxicológicos que el material sin estar en tamaño nano.

Numerosos estudios de toxicidad han sido publicados, pero varían en gran medida en el diseño del experimental y la metodología (Lewinski et al., 2008). *The ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening working group* estableció a partir del 2005 que la detección de toxicidad en NPs debe consistir en tres estrategias: 1) caracterización de los nanomateriales, 2) estudios *in vitro* y 3) estudios *in vivo* (Oberdörster et al., 2005). Para desarrollar las estrategias de estudio,

se debe tener presente la amplia gama de tamaños y propiedades físico-químicas que pueden afectar a la fiabilidad de los diferentes ensayos.

Los expertos recomiendan analizar cada nanosistema independientemente. Las características específicas, conocidas a través de una exhaustiva caracterización del nanomaterial, afectan al perfil toxicológico, por ejemplo, las AuNPs con un diámetro de partícula menor de 2 nm poseen un grado inesperado de toxicidad superior a tamaños mayores (Schmid et al., 2008); también, dependiendo de la química de superficie, el nanosistema puede ser capturado por el sistema fagocítico mononuclear (SFM); la forma de la partícula puede dictar el inicio de la fagocitosis y afectar a las tasas de internalización celular (Fadeel et al., 2010). Además, los factores externos pueden modificar el perfil toxicológico de las AuNPs. Los medios de crecimiento celular (para estudios *in vitro*) contienen proteínas de suero, aminoácidos esenciales, vitaminas, electrolitos y otros productos químicos que podrían interactuar con las AuNPs y cambiar sus propiedades físico-químicas (tamaño, estado de agregación, carga superficial y química de superficie) (Alkilany et al., 2010). Las AuNPs en solución acuosa tienen una carga superficial que estabiliza el sistema frente a la agregación a través de las repulsiones electrostáticas, pero la presencia de electrolitos y la alta fuerza iónica de los medios biológicos pueden provocar la agregación de las AuNPs a través de la interacción electrostática (Vesaratchanon et al., 2007). Cedervall demostró que muchas proteínas plasmáticas son adsorbidas en NPs de forma espontánea adoptando las propiedades fisicoquímicas de la cubierta de las proteínas adsorbidas (Cedervall et al., 2007 ; Lynch et al., 2007 ; Lundquist et al., 2008).

Los estudios de cultivos celulares *in vitro* son el método más utilizado para la evaluación de la nanotoxicidad. Sin embargo, siempre deben ir acompañados de estudios *in vivo*, ya que los datos obtenidos de los estudios *in vitro* pueden ser engañosos. Muchos de los ensayos *in vitro* dependen de la medición de cambios colorimétricos o de fluorescencia. Las AuNPs absorben luz en la región visible y debe considerarse la interferencia con estos ensayos. Además, como se ha señalado en el apartado anterior, las AuNPs pueden adsorber moléculas (tales como colorantes indicadores) de los medios o absorber la fluorescencia (Alkilany et al., 2010).

Por otro lado, los estudios nanotoxicogenómicos pueden proporcionar información útil sobre los perfiles de expresión génica global en las células que han

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

sido expuestas a las AuNPs y ayudar a comprender las respuestas biológicas provocadas por los nanomateriales. La proteómica también ha demostrado ser una herramienta útil para el estudio de las interacciones de las AuNPs con biomoléculas cuando éstas entran en un entorno biológico.

En las estrategias *in vitro* también han de incluirse los estudios de internalización celular ya que se ha demostrado una correlación con la toxicidad. Del mismo modo, el grado en que los macrófagos internalizan las AuNPs dan información de la biodistribución (Fadeel et al., 2010).

En la Tabla 1.4 se resumen algunos resultados de toxicidad *in vitro* de las AuNPs en algunas líneas celulares.

Línea celular	Tamaño (nm)	Superficie	Dosis	Tiempo de incubación	Conclusiones	Referencia
COS-1 Células de mamíferos, células rojas de la sangre	2	Amonio cuaternario, ácido carboxílico	0,38-3 μ M	1-24 h	AuNPs catiónicas dieron más toxicidad que las aniónicas.	1
RAW 264.7 Macrófago de ratón	3,5 \pm 0,7	Lisina, Polilisina	10-100 μ M	24-72 h	Las AuNPs no fueron tóxicas ni inmunogénicas.	2
K562 Leucemia humana	4; 12; 18	CTAB, citrato, cisteína, glucosa, biotín	0,001-0,25 μ M	72 h	Ninguna AuNP fue tóxica.	3
Fibroblastos dermales humanos	13,1	Citrato	0-4 mM	24-144 h	AuNPs decrecieron el ratio de proliferación celular, adhesión y movilidad.	4
BHK21 Riñón de hámster, Hep2G Carcinoma de hígado humano, A549 Carcinoma de pulmón humano	33	CTAB y citrato	0-120 nM	72 h (Hep2G y BHK21) 36 h (A549)	AuNPs no tóxicas para Hep2G y BHK21 pero si tóxicas para A549.	5
HeLa	18	Citrato	0,2-2 nM	3-6 h	AuNPs no tóxicas y no vaciaron los patrones de expresión génica.	6
HeLa: Epiteliales SK-MEL-28: Endoteliales L929: Fibroblastos j774A1: Fagocitos	0,8; 1,2; 1,4; 1,8;15	Mono trifenilfosfina y trisulfonato	Por encima de 5,6 μ M	72 h	·1,4 nm las más tóxicas. ·0,8; 1,2; 1,8 : 4-6 veces menos tóxicas que 1,4 nm. ·15 nm no tóxicas. ·La toxicidad no fue dependiente de la línea celular.	7
C57BL/6 dendríticas de ratón	10	Citrato	0,5 mM	4-48 h	AuNPs no tóxicas y no indujeron la activación de células dendríticas.	8
HeLa	1,4 y 15	Mono fosfato de trimetilfosfina GSH	5,6 mM	48 h	1,4 nm indujeron necrosis por estrés oxidativo y las de 15 nm no fueron tóxicas.	9
HeLa	3,7	PEG	0,08-100 μ M	6-72 h	AuNPs no tóxicas.	10

Tabla 1.4 Resumen de los resultados de toxicidad *in vitro* de las AuNPs (Alkilany et al., 2010). Referencias: (1) (Goodman et al., 2004); (2) (Shukla et al., 2005); (3) (Connor et al., 2005); (4) (Pernodet et al., 2006); (5) (Patra et al., 2007); (6) (Khan et al., 2007); (7) (Pan et al., 2007); (8) (Villiers et al., 2010); (9) (Pan et al., 2009); (10) (Gu et al., 2009).

Los estudios *in vivo* se ven limitados por factores éticos, económicos y prácticos. Los nanomateriales para uso clínico deben pasar por estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) para conocer cuál es el comportamiento del material a nivel de biodistribución y farmacocinética. Además, los

nanomateriales, a diferencia de muchos fármacos de moléculas pequeñas, pueden ser transportados a través del sistema linfático, lo que obviamente tiene implicaciones inmunológicas. Sin embargo, los nanomateriales pueden ser muy diferentes en tamaño y características físico-químicas, lo que hace difícil universalizar los estudios de ADME y las propiedades toxicológicas para reflejar las características de una clase de nanomateriales (Nyström et al., 2012).

The ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening working group propone en la evaluación de la toxicidad *in vivo* incluir las exposiciones por vía oral, tópica y parenteral. Además, estos estudios deberían incluir la evaluación de los marcadores de la inflamación, el estrés oxidativo y la proliferación celular en órganos y tejidos seleccionados (Oberdörster et al., 2005).

En el cuerpo humano las NPs interactúan con proteínas de la sangre y esta unión define la captación de las NPs por diferentes células del sistema inmune. Sin embargo, diversos estudios de seguridad que se han realizado sugieren que las NPs no son sustancialmente más inmunotóxicas que los medicamentos convencionales (Dobrovolskaia et al., 2007).

Experimentalmente, la posible citotoxicidad de las AuNPs es bastante contradictoria, concluyendo que si el límite de concentración de partículas no es superior a las 10^{12} partículas/ml, las AuNPs con diámetros entre 3 y 5 nm no son citotóxicas. La toxicidad con niveles inferiores a este número se asocia con diámetros de AuNPs de 1 a 2 nm y se justifica por la capacidad de las AuNPs de este tamaño para unirse a las biomoléculas como ADN, cambiando el funcionamiento de los procesos moleculares celulares (Khlebtsov et al., 2011).

En la Tabla 1.5 se resumen algunos experimentos *in vivo*, analizando la toxicidad de las AuNPs.

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Animal	Tamaño (nm)	Superficie	Dosis	Tiempo de incubación	Nº de animales	Conclusiones	Referencia
Cerdo	15-20	Goma Arábica	Intravenoso : 0,8- 1,88 mg Au/kg	0,5-24 h	3	AuNPs se acumulan en pulmón e hígado. No se observaron efectos secundarios renales ni hematológicos.	1
Ratón (ddy)	15; 20; 100; 200	Citrato	Intravenoso: 1000 mg Au/kg	24 h	3	Todos los tamaños se encontraron en hígado y bazo. 15 y 20 nm además se encontraron en corazón, estomago, riñón y cerebro.	2
Ratón (BALB/c)	4; 10; 28; 58	Citrato	Oral: mezclado con agua 200 mg Au/kg agua	168 h	no informado	Absorción gastrointestinal fue más fácil para AuNPs más pequeñas.	3
Ratón (BALB/c)	3; 5; 8;12; 17; 37; 50; 100	Citrato	Intraperitoneal: 8 mg Au/kg	> 1200 h	6	AuNPs de 3; 5; 50 y 100 nm no indujeron letalidad, pero sí las de 8 a 37 nm.	4
Ratón (BALB/c)	13	PEG	Intravenoso: Más de 4,26 mg Au/kg	> 168 h	9	AuNPs indujeron inflamación y apoptosis en el hígado.	5
Pez Cebra	3; 10; 50; 100	Citrato	Exposición al contenido en agua: 250; 25; 2,5 ; 0,25 µM	120 h	12	AuNPs no indujeron toxicidad.	6
Ratón (BALB/c)	20; 40; 80	PEG	34-2210 mg Au/kg	48 h	8	La acumulación y la biodistribución de las AuNPs depende del tamaño; los tamaños pequeños se mantienen más en circulación sanguínea y se acumulan más en tumor.	7

Tabla 1.5 Resumen de los resultados de toxicidad in vivo de las AuNPs (Alkilany et al., 2010). Referencias: (1) (Kattumuri et al., 2007); (2) (Sonavane et al., 2008); (3) (Hillyer et al., 2001); (4) (Chen et al., 2009); (5) (Cho E. C. et al., 2009; Cho W.-S. et al., 2009); (6) (Bar-Ilan et al., 2009); (7) (Zhang et al., 2009).

1.4. Ácido hialurónico

En 1934 Karl Meyer y John Palmer fueron los primeros investigadores que descubrieron y aislaron el ácido hialurónico (HA) del vítreo de los ojos de las vacas (Meyer & Palmer et al., 1934). En la década de los 50, estos investigadores resolvieron la estructura química del HA. Encontraron que el HA es un polisacárido no sulfatado lineal, no ramificado y cargado negativamente que se compone de la repetición de unidades de disacárido de ácido D-glucurónico enlazado por un enlace β 1-2 glicosídico con la D-N-acetilglucosamina. El enlace entre los disacáridos para formar la cadena de HA es un enlace β 1-3 (Figura 1.16). Biológicamente, se encuentra tanto en la matriz extracelular como en el líquido sinovial de las articulaciones.

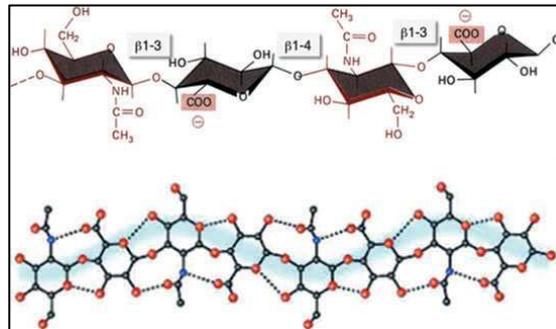


Figura 1.16. Estructura del HA, representando los disacáridos y sus enlaces.

En 1942 Balazs patentó la primera aplicación del HA como un sustituto de la clara de huevo en productos de panadería (Balazs et al., 1979). Pero fue a finales de 1950 cuando se realizó la primera aplicación biomédica de HA. Concretamente se utilizó HA para una sustitución del vítreo durante una cirugía ocular. Inicialmente, para aplicaciones médicas, el HA fue aislado a partir de cordón umbilical, y poco después a partir de crestas de gallo. Más tarde, fue aislado a partir de otras fuentes no animales como por ejemplo de bacterias *Streptococcus equi* (Mashimoto et al., 1988), lo que permitió producir el HA en cantidades más grandes. En la actualidad, el HA procede de diversas fuentes y existe con diferentes grados de pureza y de pesos moleculares. Las principales impurezas, dependiendo de la técnica de síntesis y purificación, son las endotoxinas bacterianas, sulfatos de condroitina, proteínas, ácidos nucleicos, cloruro de sodio y metales pesados.

1.4 ÁCIDO HIALURÓNICO

1.4.1. Síntesis biológica del HA

El HA se sintetiza en el cuerpo humano mediante un proceso enzimático con HA sintasas (HAS1, HAS2 y HAS3), una clase de proteínas integrales de membrana. La síntesis se inicia en la cara interna de la membrana plasmática y a medida que se sintetiza, la molécula va saliendo al exterior de la célula, sin asociarse con ninguna proteína del núcleo (Weigel et al., 1997).

El mecanismo de síntesis del HA implica la extensión de cadena por la adición alternada de ácido glucurónico y de N-acetil glucosamina. El HAS3 tiene más actividad catalítica que HAS2 y que HAS1. HAS3 polimeriza cadenas de longitudes en un rango menor de 2×10^5 Da a 3×10^5 Da mientras HAS1 y HAS2 polimerizan cadenas de HA de longitud superior, de hasta 2×10^6 Da (Figura 1.17).

Las cadenas cortas no solo dependen del tipo de enzima sintasa sino que puede ser resultado de la degradación extracelular, a través de la acción de las hialuronidasas u oxidantes (Itano et al., 1999).

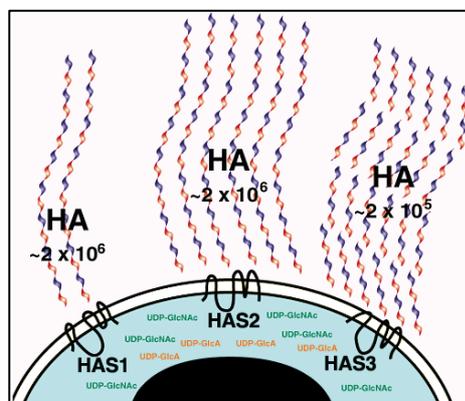


Figura 1.17. Representación de la regulación de la síntesis de HA según enzima sintasa implicada. HAS1 sintetiza pequeñas cantidades de alto peso molecular. HAS2 sintetiza mayor cantidad de alto peso molecular. HAS3, la más activa, sintetiza HA de bajo peso molecular. (Itano et al., 1999).

1.4.2. Propiedades del HA

La molécula de HA en solución fisiológica tiene una estructura rígida debido a la interacción y combinación de la estructura química de los disacáridos, los enlaces de hidrógeno internos y las interacciones con el disolvente. Los átomos de hidrógeno axiales forman una parte no polar, relativamente hidrófoba, mientras que las cadenas

laterales forman una parte hidrófila más polar, creando una estructura de cinta con torsión. Las propiedades del HA cambian en función de la concentración en la que se encuentra. A concentraciones muy bajas, las cadenas se enredan menos entre sí, dando lugar a una viscosidad leve (dependiente del peso molecular), pero a concentraciones más altas tienen una viscosidad mayor debido al mayor enredo de la cadena. Las propiedades reológicas hacen al HA ideal como lubricante y es utilizado en diversas aplicaciones biomédicas (Cowman et al., 2005).

El HA es parte constituyente de la matriz extracelular y además en ciertos órganos su papel es clave, como por ejemplo en el vítreo del ojo humano, en el líquido articular sinovial, en la matriz producida por las células del cumulus del ovocito antes de la ovulación y en cartílagos hialinos. La mayor cantidad de HA reside en el tejido de la piel, donde está presente tanto en la dermis como en la epidermis (Laurent et al., 1996).

El HA tiene una función estructural en la matriz extracelular. Existen moléculas específicas y receptores que interactúan con el HA, generando una respuesta en las células; moléculas tales como agrecano o versicano, y receptores como el CD44, RHAMM o LYVE-1 son ejemplos de componentes de las células que se unen al HA (Noble et al., 2002; Toole et al., 2002). Se considera que el CD44 es el principal receptor de HA en la mayoría de tipos celulares (Toole et al., 1997).

El HA a nivel fisiológico existe con diferentes pesos moleculares y la función es diferente según el tamaño, por ejemplo, el HA de alto peso molecular no parece estar implicado en la expresión génica y el HA de peso molecular bajo es conocido por promover la expresión de genes (McKee et al., 1996; Oertli et al., 1998). Otro ejemplo son los resultados que sugieren que el alto peso molecular del HA favorece la integridad del tejido en cicatrizaciones mientras que la producción de fragmentos de HA inicia una respuesta inflamatoria (Chen W. Y. J. et al., 1999).

1.4.3. Aplicaciones del HA

Las propiedades únicas que tiene el HA lo convierten en un material que puede ser aplicado en diferentes campos de la biomedicina como la dermatología, la oftalmología, la ingeniería tisular, la osteoartritis y la oncología.

1.4.3.1. Dermatología

El HA se ha posicionado como uno de los mejores productos cosméticos por su capacidad hidratante y regeneradora. Es un ingrediente muy utilizado en los productos tópicos ya que aumenta la humedad sobre la piel y en algunos casos incluso se ha demostrado que puede inducir diferentes vías implicadas en la síntesis de HA y colágeno, aumentando la firmeza y elasticidad de la piel. También es muy utilizado como relleno dérmico, donde se inyecta de manera intradérmica en las zonas de la piel que presentan arrugas profundas y gracias a su viscosidad y su capacidad de absorción de agua, consigue eliminar temporalmente estas arrugas (Tezel et al., 2008).

1.4.3.2. Oftalmología

La catarata ocular es una enfermedad progresiva que conlleva una pérdida de transparencia del cristalino del ojo y que afecta a un gran porcentaje de la población con edad avanzada. El único tratamiento que se ha llevado a cabo con éxito es la cirugía, sin embargo, el peligro que existe de producir una lesión en los tejidos intraoculares frágiles es un inconveniente a tener en cuenta.

Balazs propuso utilizar materiales viscoelásticos para resolver este problema, no sólo durante la cirugía de cataratas sino también en otras operaciones quirúrgicas. En el caso de la cirugía de cataratas, los materiales viscoelásticos como el HA se utilizan para proteger la capa endotelial de la córnea o de otros tejidos con daños físicos (Balazs et al., 1983).

1.4.3.3. Ingeniería tisular

El HA tiene la capacidad de combinar las propiedades biológicas y mecánicas necesarias para la ingeniería de regeneración de hueso y cartílago (Allison et al., 2006).

Existen diversos estudios donde se ha observado un buen crecimiento de los condrocitos en matrices de HA, generando incluso cartílago dentro de la red porosa que forma el hidrogel (Burdick et al., 2004). Además, la implantación quirúrgica es un punto limitador para la mayoría de las matrices utilizadas en ingeniería de tejidos, pero el HA es un buen candidato principalmente por tres razones: en primer lugar, el inyectable de HA puede estar en cualquier forma estructural; en segundo lugar, la matriz de HA puede adherirse al tejido nativo; y en tercer lugar, los métodos de inyección y de laparoscopia reducen la invasividad del procedimiento quirúrgico (Yeo et al., 2006).

1.4.3.4. Osteoartritis

La osteoartritis se caracteriza por la lenta degradación del cartílago, generando dolor y un aumento de la discapacidad. Las terapias farmacológicas actuales solo alivian el dolor con analgésicos, terapias intraarticulares (glucocorticoides y ácido hialurónico) o tratamientos tópicos. Cuando estos tratamientos ya no funcionan se requiere de cirugía, reemplazando la articulación.

La función mecánica del fluido sinovial que se encuentra en las articulaciones se atribuye a sus propiedades reológicas, más específicamente sus propiedades viscoelásticas. La pérdida de estas propiedades se asocian a la reducción de peso molecular del HA y a la disminución de la concentración. Algunos productos tales como Hyalgan® o Orthovisc® son productos basados en HA aprobados por la FDA y la EMA (en inglés, European Medicines Agency) para el tratamiento de la osteoartritis (Altman et al., 1998; Moreland et al., 2003; Wen et al., 2000).

1.4.3.5. Oncología

Existen diversos estudios en oncología que se centran en el HA como vehículo de administración de fármacos por ser biocompatible y biodegradable. Además, proporciona protección a la molécula transportada, mejorando también la solubilidad de fármacos hidrófobos. Finalmente, el HA es un buen candidato para transportador de fármacos antitumorales ya que su principal receptor es el CD44, que se sobreexpresa en la mayoría de tumores sólidos (Peach et al., 1993; Toole et al., 2004).

1.4 ÁCIDO HIALURÓNICO

Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta el HA es que es eliminado rápidamente de la sangre por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y también por la degradación que producen las enzimas hialuronidasas. Las modificaciones químicas del HA permiten reducir esta degradación y prolonga la circulación en sangre (Choi et al., 2009) dando paso a la creación de nuevos nanosistemas de liberación controlada de fármacos antitumorales basados en HA. Los nanosistemas que se han creado son plataformas donde el HA tiene un papel de portador y/o de transportador al tejido diana y donde el fármaco está físicamente asociado o covalentemente ligado al HA (Figura 1.18) (Ossipov et al., 2010).

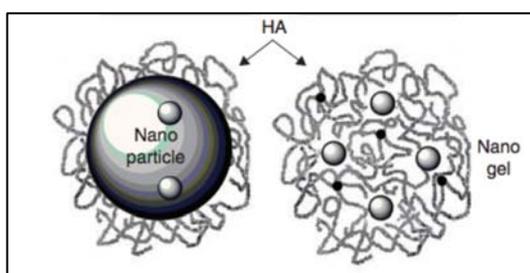


Figura 1.18. Representación de los nanosistemas creados con HA. (Ossipov et al., 2010).

Las uniones covalentes del fármaco al HA han de ser estables extracelularmente para aumentar *in vivo* la vida media del profármaco en sangre pero también deben descomponerse rápidamente al entrar en la célula sin que se modifique el fármaco en la liberación.

Un ejemplo de enlace covalente entre el fármaco y un polímero es la conjugación del polímero 2-(hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) con el fármaco doxorubicina (Dox) y el HA (HPMA-HA-Dox) (Figura 1.19). EL HPMA realiza el papel de portador y el HA dirige el sistema a las células diana (que sobreexpresan CD44). Se realizaron experimentos *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer de mama humano (HBL-100), de ovario humano (SK-OV-3) y de colon humano (HCT-116). Se obtuvo una reducción de la toxicidad del conjugado en relación al fármaco libre y fue más potente que el control HPMA-Dox. Se demostró que el papel del enlazador HPMA era importante y que el enlace hidracida del control HA-Dox no fue el correcto. Fue relevante el demostrar que tanto HPMA-HA-Dox como HA-Dox tuvieron toxicidad selectiva contra las células cancerosas que sobreexpresan receptores de HA, mientras que la doxorubicina libre, así como HPMA-Dox conjugado, fueron tóxicos tanto para

las células cancerosas como para la línea celular no cancerígena 3T3 de fibroblastos de ratón (Luo et al., 2002).

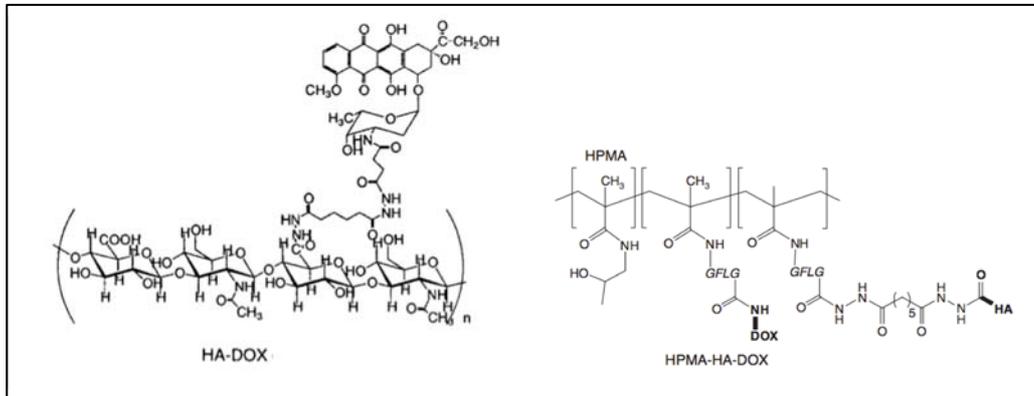


Figura 1.19. Representación del nanosistema HA-DOX y HPMA-HA-DOX. (Luo et al., 2002).

Otro fármaco covalentemente enlazado al HA pero con un ligando entre ellos es el propuesto por Prestwich. En este nanosistema el HA hace de portador y dirige el sistema a las células que sobreexpresan CD44 para liberar el fármaco antitumoral paclitaxel (Taxol) (Figura 1.20). La ventaja de este tipo de enlace es que da solubilidad en medios acuosos al paclitaxel. Se realizaron estudios *in vitro* en líneas tumorales humanas (HBL-100, SK-OV-3 y HCT-116). Sólo las células que sobreexpresan CD44 internalizaron el conjugado de HA-Taxol después de 20 min de incubación, mientras que las células 3T3 fibroblastos de ratón no cancerosas, no mostraron ni unión a la membrana ni una rápida absorción. La liberación rápida del paclitaxel fue por la enzima esterasa. El conjugado HA-paclitaxel fue internalizado por endocitosis mediado por el receptor seguido de la liberación del fármaco mediante la degradación del enlace éster entre el HA y el paclitaxel (Luo et al., 1999).

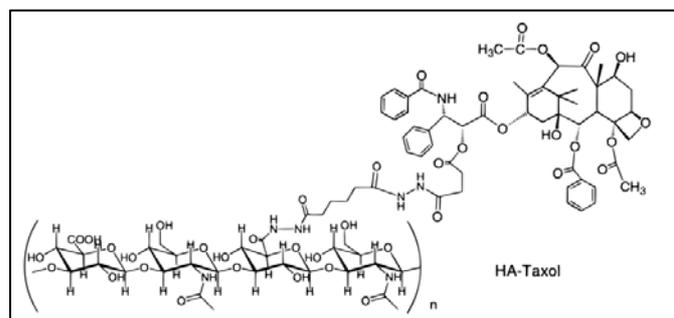


Figura 1.20. Representación del nanosistema HA-paclitaxel. (Luo et al., 1999).

1.4 ÁCIDO HIALURÓNICO

El trabajo de Pitarresi consistió en crear un nanogel hecho por amidación entre carboxilatos de HA y covalentemente grupos acil-hidrazina de la poliaspartilhidracida (PAHy) (Figura 1.21). Las partículas del nanogel obtenidas fueron de diámetros que iban de 200 a 300 nm, resistentes a la degradación incluso a pH 1 y en presencia de la enzima hialuronidasa se degradaron parcialmente. Los ensayos *in vitro* en células de leucemia mielógena crónica humana (K-562) dieron no toxicidad para el nanogel pero cuando se encapsuló 5-fluorouracilo en el nanogel presentó una elevada toxicidad. La liberación total del 5-fluorouracilo fue en 1 h (Pitarresi et al., 2007).

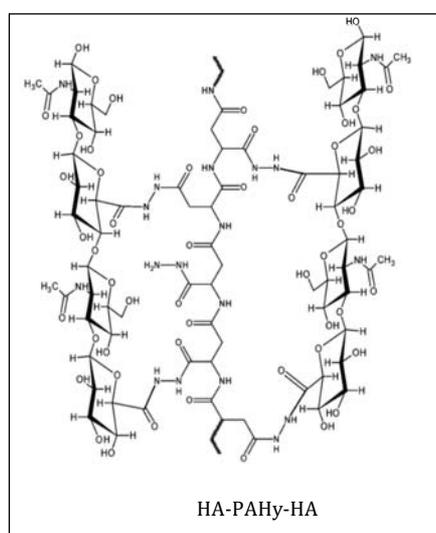


Figura 1.21. Representación del nanogel HA-PAHy-HA. (Pitarresi et al., 2007).

1.5. Fármaco antitumoral

Los fármacos empleados hasta el momento se clasifican en citotóxicos, fármacos dirigidos como inhibidores o anticuerpos, y fármacos hormonales. Los fármacos pueden ser dirigidos a las células tumorales o a otros elementos carcinogénicos como al endotelio, matriz extracelular o sistema inmunológico. Los fármacos que actúan sobre el ciclo celular pueden localizar su acción en el ADN, ARN o a nivel de proteínas. Los quimioterápicos suelen actuar a nivel del ADN en las células tumorales, mientras que los anticuerpos monoclonales interactúan con las proteínas.

1.5.1. Clasificación de los fármacos citotóxicos según mecanismo

La Tabla 1.6 muestra la clasificación química de los fármacos citotóxicos según el mecanismo de acción.

Fármacos citotóxicos	
Agentes alquilantes	
Triacenos	Dacarbacina, Tremozolamida
Antibióticos	Bleomicina, Mitomicina C
Agentes platinados	Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino
Antimetabolitos	Metrotrexato, 5-Fluorouracilo, Gemcitabina, Permetrexed
Antibióticos	Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina
Inhibidores del huso mitótico	Paclitaxel, Docetaxel, Vincristina, Vinblastina
Inhibidores de la topoisomerasa	Irinotecán, Topotecán, Etopósido

Tabla 1.6 Clasificación de algunos fármacos antitumorales según el mecanismo de acción.

Los agentes alquilantes son compuestos que se unen covalentemente a ácidos nucleicos o proteínas. La mayoría de los agentes alquilantes son bipolares, es decir, contienen dos grupos capaces de reaccionar con el ADN y pueden formar puentes entre una sola hebra o las dos. La interacción impide la acción de las enzimas implicadas en la replicación del ADN impidiendo que la célula pueda dividirse e incluso provocando la muerte celular. Entre los agentes alquilantes se encuentran los fármacos platinados (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino). Los átomos de cloro en el cisplatino se intercambian con las moléculas de agua para formar un complejo diacuoplatino y luego intercambian las aguas por la N-7 del nitrógeno de las guaninas provocando la inhibición de la replicación del ADN y la síntesis de ARN y proteínas. El

1.5 FÁRMACO ANTITUMORAL

carboplatino tiene un grupo carboxilato y tiene mayor solubilidad en agua, una hidrólisis más lenta, es menos nefrotóxico y neurotóxico que el cisplatino pero causa más mielosupresión (disminución de la actividad de la médula ósea). El oxaliplatino pertenece a una nueva clase de agentes platinados. Contiene un átomo de platino en complejo con oxalato y un grupo voluminoso diaminociclohexano. Igual que sus análogos inhiben la síntesis de ADN mediante la conjugación en las hebras (Hurley et al., 2002).

Los antimetabolitos son compuestos estructuralmente similares a sustancias de origen natural, como las vitaminas, los nucleósidos o aminoácidos. Compiten con el sustrato natural por el sitio activo de una enzima esencial o de un receptor. Algunos se incorporan directamente en el ADN o ARN. Su eficacia suele ser mayor en un período de tiempo prolongado, por lo que generalmente se dan como tratamiento a largo plazo. El metotrexato, por ejemplo, es un antagonista del ácido fólico, elemento esencial para la generación de una variedad de coenzimas que están involucradas en la síntesis de purinas. El 5-fluorouracilo y la gemcitabina son fármacos que se asemejan a la pirimidina y que también inhiben la síntesis de ácidos nucleicos provocando la muerte celular (Kaye et al., 1998).

Los antibióticos citotóxicos actúan sobre la función y la síntesis de ácidos nucleicos. Las antraciclinas (por ejemplo doxorrubicina o epirrubicina) se intercalan en el ADN y afecta a la enzima topoisomerasa II, interfiriendo en la replicación celular (Gewirtz et al., 1999; Plosker et al., 1993). Otros antibióticos son agentes alquilantes, como la bleomicina, que se compone de una mezcla de glicopéptidos que causan la fragmentación del ADN o la mitomicina C que inhibe la síntesis de ADN por conjugarse a la hélice (Galm et al., 2005).

Los fármacos que inhiben el huso mitótico son alcaloides como la vincristina y la vinblastina, que se extraen de la planta vinca y actúan mediante la unión a la tubulina, inhibiendo el montaje del huso y por tanto la mitosis (Jordan et al., 1991). Los taxoides como el paclitaxel (taxol) o docetaxel (taxotere, derivado semisintético) son fármacos derivados de la corteza del *Taxus brevifol* que promueven el ensamblaje de los microtúbulos e inhibe su división (Stierle et al., 1993).

Las topoisomerasas son enzimas involucradas en la replicación del ADN, la segregación de las cromátidas y la transcripción. Los inhibidores de la topoisomerasa I como el irinotecán y topotecán, se unen al complejo enzima-ADN fijándolo y evitando la replicación del ADN (Koster et al., 2007). También los inhibidores de la topoisomerasa II como el etopósido, fijan el complejo enzima-ADN, causando roturas en la cadena e inhibiendo la replicación del ADN (Baldwin et al., 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados. Existen diversas terapias antitumorales para los diferentes tipos de cáncer. El principal problema de estas terapias son los severos efectos secundarios que producen, llegando a ocasionar en algunos casos problemas graves que obligan a abandonar los tratamientos. Es por este motivo que actualmente se están buscando activamente nuevos fármacos que mejoren significativamente el tratamiento de los actuales, pero a la vez, que reduzcan o desaparezcan estos efectos secundarios. Una de las estrategias más trabajadas a nivel mundial es el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de agentes antitumorales, controlados y selectivos, que dirijan la cantidad deseada de fármaco directamente al tumor. De esta manera se minimiza al máximo posible la exposición del fármaco en los tejidos sanos y por lo tanto, se reducen los efectos secundarios.

Después de evaluar las diferentes estrategias llevadas a cabo para mejorar las propiedades de los fármacos antitumorales y aplicando las ventajas que aporta la nanotecnología, se decidió desarrollar el EDS (Endor Delivery System), un sistema de liberación de fármacos antitumorales basado en AuNPs, cuya biocompatibilidad y propiedades físicas y ópticas son de gran interés para la oncología. Las AuNPs serán doblemente conjugadas. Primero a oligosacáridos de HA, molécula reconocida por las células tumorales que sobreexpresan su principal receptor el CD44. El HA realiza las funciones de vector hacia la célula diana, pero además protege a las NPs de su agregación o eliminación de la sangre. La segunda molécula conjugada es el propio fármaco seleccionado, modificado con un ligando que facilita que el principio activo se libere una vez ha llegado a su diana terapéutica.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Sintetizar AuNPs de diversos tamaños de diámetro y determinar las técnicas a utilizar para su óptima caracterización.

OBJETIVOS

- Sintetizar y analizar el HA modificado con una tiolación terminal en la molécula. En este punto también se estudiarán diferentes tamaños de HA.
- Estudiar las estrategias de conjugación de las AuNPs con los HA modificados y realizar una completa caracterización para obtener el sistema más efectivo. Se realizarán experimentos de caracterización tanto físico-químicos como biológicos (*in vitro*) para finalmente escoger el mejor candidato.
- Una vez elegido el mejor candidato del sistema EDS, se estudiarán las conjugaciones de diferentes fármacos y las modificaciones necesarias para su unión al sistema. Tras la síntesis de los candidatos, se realizará una completa caracterización.
- Los nanosistemas (EDS) conjugados a los fármacos y correctamente caracterizados, serán validados según su eficacia mediante experimentos *in vitro*.
- Concluir la tesis validando una plataforma basada en un sistema de liberación de diferentes fármacos antitumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales para síntesis y caracterización de AuNPs

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
Citrato trisódico dihidratado	Sigma	$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Cloruro de oro (III) trihidratado	Aldrich	HAuCl_4
Borohidruro de sodio	Aldrich	NaBH_4

3.1.2. Materiales para síntesis y caracterización del HASH

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
Hialuronato sódico	Contipro	$(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NaNO}_{11})_n$
Diclorhidrato de cistamina	Sigma	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$
Ácido bórico	Sigma	H_3BO_3
Cianoborohidruro de sodio	Fluka	NaBH_3CN
D-L-ditiotreitól	Sigma	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$
Ácido 4-(hidroximercurico)benzoico	Sigma	$\text{C}_7\text{H}_5\text{HgNaO}_3$

3.1.3. Materiales para síntesis y caracterización de fármacos antitumorales

Cisplatino

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
Cisplatino	Aldrich	$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$
11-Mercaptoundecanoico	Aldrich	$\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$
Hialuronidasa de testículo bovino	Sigma	
Diclorhidrato de cistamina	Sigma	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$
Trietilamina	Sigma	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$
Bromoacetato de etilo	Aldrich	$\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$
Ioduro de potasio	Sigma	KI

3.1 MATERIALES

Oxaliplatino

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
Oxaliplatino	Sigma	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ Pt

5-Fluorouracilo

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
5-Fluorouracilo	Sigma	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂
Ácido cloroacético	Sigma	ClCH ₂ CO ₂ H
Dimetilformamida	Sigma	HCON(CH ₃) ₂
Diclorometano	Panreac	CH ₂ Cl ₂
1-Hidroxibenzotriazole hidratado	Fluka	C ₆ H ₅ N ₃ O · xH ₂ O
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida	Sigma	CH ₃ CH ₂ NCNCH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
Trietilamina	Sigma	(C ₂ H ₅) ₃ N
Diclorhidrato de cistamina	Sigma	NH ₂ CH ₂ CH ₂ SSCH ₂ CH ₂ NH ₂ · 2HCl
N-hidroxisuccinimida	Aldrich	C ₄ H ₅ NO ₃

3.1.4. Materiales para métodos *in vitro*

Cultivo Celular

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
DMEM	Lonza	
Serum bovino fetal	Lonza	
Penicilina	Lonza	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
Estreptomicina	Lonza	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂
Glutamina	Lonza	H ₂ NCOCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H

Internalización

Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
Tween	Sigma	

Citotoxicidad

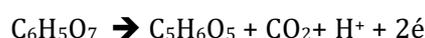
Nombre	Proveedor	Fórmula lineal
4-Nitrofenil N-acetil-beta-D-Glucosaminida	Sigma	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₈
Triton-X100	Sigma	<i>t</i> -Oct-C ₆ H ₄ -(OCH ₂ CH ₂) _x OH, x= 9-10
Glicina	Sigma	NH ₂ CH ₂ COOH
Ácido ethylenediaminotetraacetico	Aldrich	(HO ₂ CCH ₂) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ H) ₂

3.2. Metodología

3.2.1. Procedimientos de síntesis de AuNPs

La obtención de AuNPs se ha realizado siguiendo el método de Turkevich (Turkevich et al., 1951), donde la generación de átomos de oro metálicos en solución es el resultado de la transferencia de electrones desde el agente reductor a los iones Au^{+3} , produciendo átomos Au^0 .

La etapa inicial de este proceso es la oxidación del citrato, produciendo dicarboxi acetona:



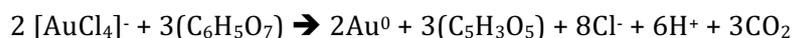
Simultáneamente, la sal de oro se reduce:



El siguiente paso es la formación de átomos de oro metálicos:



Y finalmente, la estequiometría de la reacción es:



Se han utilizado dos agentes reductores, uno de naturaleza orgánica como el citrato trisódico (Na_3Ct) y otro de naturaleza inorgánica como el borohidruro de sodio (NaBH_4). El citrato trisódico tiene la propiedad de reductor y también de quelante en la unión del metal; sin embargo, el borohidruro de sodio carece de la propiedad quelante.

3.2.1.1. Síntesis de AuNPs 12 nm

Para la síntesis de las AuNPs con diámetro de 12 nm, el agente reductor utilizado fue el citrato trisódico. En un balón con un refrigerante de serpentín se añadió 150 ml de agua con agitación intensa y $2,58 \times 10^{-3}$ M de citrato trisódico dihidratado. Esta solución se llevó a ebullición y se inyectó rápidamente 1 ml de HAuCl_4 25 mM. Pasados 3 minutos se paró la reacción. El color de la solución pasó de transparente a rojo vino y se obtuvo una solución de NPs con 33 ppm de oro (síntesis 1x).

3.2 METODOLOGÍA

Una vez puesta a punto la reacción anterior, fue optimizada para conseguir concentraciones de AuNPs más elevadas. Se consiguió una solución de AuNPs con 100 ppm de Au (síntesis 3x), manteniendo las mismas condiciones anteriores pero ajustando proporcionalmente la concentración de citrato trisódico dihidratado y la concentración de sal de oro.



Figura 3.1 Imagen donde se observa la evolución del color de la solución durante la síntesis de AuNPs a una concentración final de 100 ppm.

A continuación se llevó a cabo el escalado de la síntesis para obtener volúmenes de hasta 10 L. Este proceso requirió del diseño de un reactor que cumpliera todos los requisitos necesarios para la correcta fabricación de las NPs: reactor encamisado, calentador para llevar a ebullición el agua, agitador intenso para mantener la homogeneidad de la solución, refrigerante de serpentín y finalmente un sistema de entradas y salidas de la solución (Figura 3.2). Todo el material se seleccionó para asegurar la estabilidad de las AuNPs, ya que existen ciertos materiales como por ejemplo el polietileno (PE) que producen una agregación inmediata o simplemente no permiten la correcta síntesis de las AuNPs.



Figura 3.2 Fotografía del reactor de 10 L.

3.2.1.2. Síntesis de AuNPs 4 nm

Durante la optimización de la síntesis de reacción de las NPs de 4 nm, se seleccionó como agente reductor el borohidruro de sodio. Se preparó una solución acuosa de 20 ml que contenía $2,5 \times 10^{-4}$ M de HAuCl_4 y $2,5 \times 10^{-4}$ M de citrato trisódico dihidratado. A continuación 0,6 ml de NaBH_4 0,1 M muy frío se añadió a la solución agitada. Instantáneamente se produjo el cambio de color de amarillo a rojo (Figura 3.3). Tras poner a punto esta técnica con volúmenes pequeños (20 ml), se llevó a cabo el escalado gradual hasta los 5 L, aumentando proporcionalmente los reactivos.

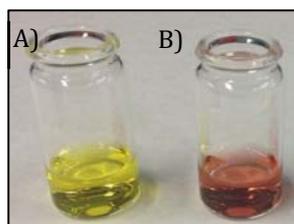


Figura 3.3. Fotografía de la evolución de color durante la síntesis de AuNPs 4 nm. A) HAuCl_4 25 mM. B) AuNPs 4 nm 18,56 nM.

3.2.2. Procedimientos de esterilización de AuNPs

3.2.2.1. Esterilización mediante filtración con filtros de PES 0,22 μm

El filtrado es un método de esterilización comúnmente utilizado para pequeños volúmenes de soluciones. La solución de AuNPs 12 nm, AuNPs 4 nm y las AuNPs agregadas con diclorhidrato de cistamina, se pasaron a través de unos filtros de PES 0,2 μm (Millipore).

3.2.2.2. Esterilización mediante autoclavado

Un método de esterilización ampliamente utilizado para grandes volúmenes de soluciones es el autoclavado. Las soluciones de AuNPs se autoclavaron mediante un autoclave *P-Selecta (Presoclave II 75)*. Este equipo permite la esterilización de soluciones con capacidad de hasta 75 litros, puede trabajar en un rango de temperatura comprendido entre 115 y 134 $^{\circ}\text{C}$ y en un rango de presión de entre 0,62 y 2 bar.

3.2.3. Procedimiento de síntesis del HASH

Con el objetivo de unir fuertemente los oligosacáridos de HA a las AuNPs, se realizó una modificación a la sal sódica que consistió en añadir un grupo tiol terminal. La síntesis de la tiolación se siguió por el método descrito en la bibliografía y se representa en la Figura 3.4.

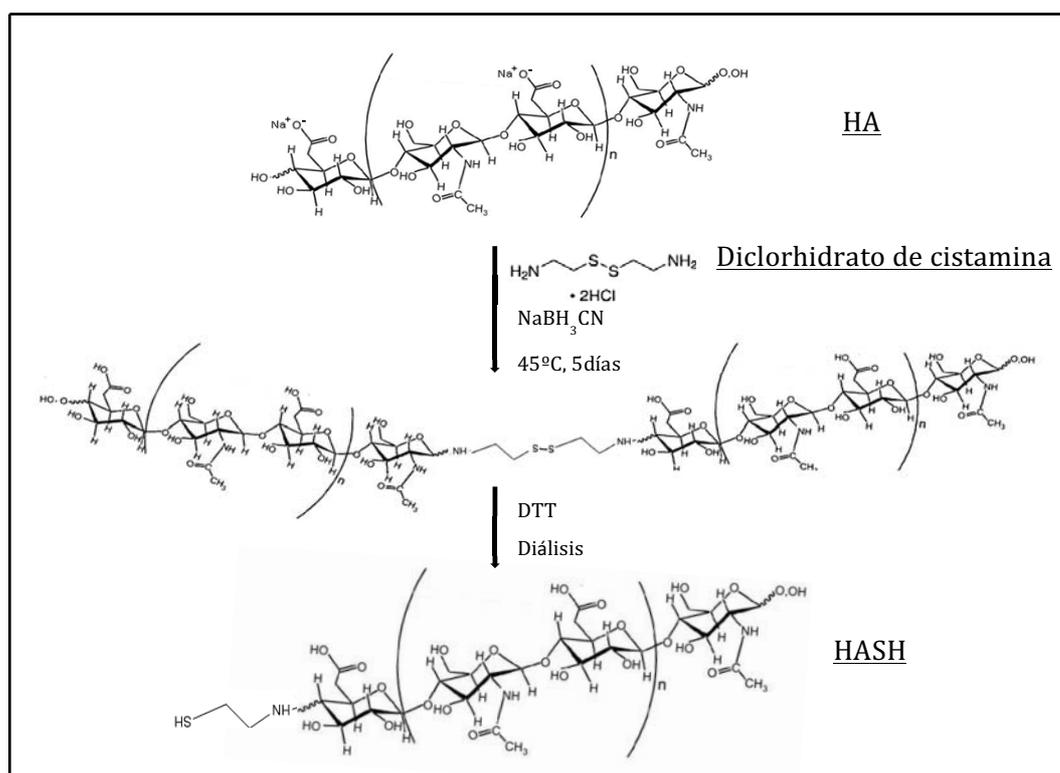


Figura 3.4 Representación de la tiolación del HA.

El diclorhidrato de cistamina se enlazó covalentemente en la posición terminal del polisacárido. El cianoborohidruro de sodio se utilizó para activar el carbono anomérico del polisacárido y facilitar la sustitución nucleófila de cistamina. El DTT se añadió para romper los enlaces disulfuros de la cistamina.

3.2.3.1. Síntesis de la tiolación del HA 30-50 kDa

Siguiendo el apartado 3.2.3, la tiolación del HA 30-50 kDa se realizó mediante una disolución a 0,35 mM de hialuronato sódico y 10,12 mM de diclorhidrato de cistamina en un tampón compuesto por 0,1 M H_3BO_3 y 0,4 M HCl (pH 8). El balón de reacción se calentó a 45°C con agitación. A continuación se añadieron 0,2 M de cianoborohidruro de sodio y se dejó la reacción durante 5 días bajo atmósfera de

argón. Se añadieron 0,13 M de D-L-ditiotreitól durante una hora. Finalmente se dializó la solución en membranas con un punto de corte de 3,5 kDa, en una solución de 0,3 mM de HCl y 10,26 mM de NaCl. Se cambió tres veces al día y durante el segundo y tercer día, se realizaron tres cambios diarios con una solución de HCl a 0,3 mM. El producto final se liofilizó.

3.2.3.2. Derivatización HASH 30-50 kDa con la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico

El objetivo de esta derivatización era conseguir cuantificar la tiolación mediante un método indirecto. Se conjugó el HASH con ácido 4-(hidroximercurico)benzoico, una molécula aromática que se une a los grupos tioles mediante el Hg (Figura 3.5).

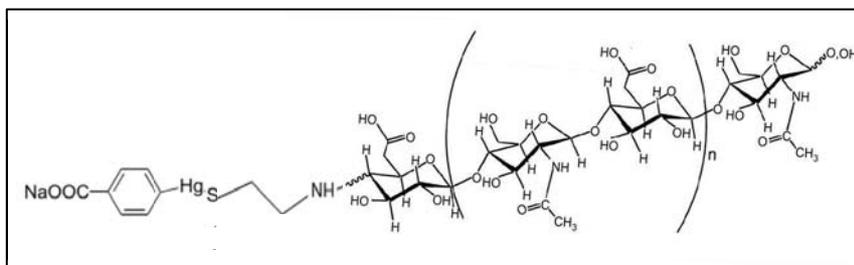


Figura 3.5 Representación de la derivatización del HASH con la sal sódica del 4-(hidroximercurico)benzoico.

Se siguieron las indicaciones de la bibliografía (Serban et al., 2008), con alguna modificación. 50 mg de HASH 30-50 kDa se disolvieron en H₂O al 1% w/v. Se añadió 2,5x10⁻⁶ M de sal sódica del 4-(hidroximercurico)benzoico. La reacción se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El precipitado blanco que se formó (perteneciente a la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico no reaccionado) se filtró. Finalmente, la solución recogida se liofilizó para su posterior análisis mediante RMN.

3.2.3.3. Síntesis de la tiolación del HA 8-15 kDa

La tiolación del HA 8-15 kDa se realizó disolviendo 0,35 mM de hialuronato sódico y 35,6 mM de diclorhidrato de cistamina en un tampón compuesto por 0,1 M H₃BO₃ y 0,4 M HCl (pH 8). El balón de reacción se calentó a 45 °C con agitación. A continuación 0,2 M de cianoborohidruro de sodio se añadió y se dejó reaccionar

3.2 METODOLOGÍA

durante 5 días bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se añadió 0,13 M de D-L-ditiotreitol durante una hora. Finalmente se dializó la solución en membranas con un punto de corte de 3,5 kDa, en una solución de 0,3 mM de HCl y 10,26 mM de NaCl. Se cambió tres veces al día y durante el segundo y tercer día, se realizaron tres cambios diarios con HCl a 0,3 mM. El producto final se liofilizó.

3.2.3.4. Derivatización HASH 8-15 kDa con la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico

Análogamente al 30-50 kDa (Apartado 3.2.3.2) se derivatizó el HA 8-15 kDa. 50 mg de HASH 8-15 kDa se disolvieron en H₂O al 1% w/v. Se añadió $8,7 \times 10^{-4}$ M de sal sódica de 4-(hidroximercurico)benzoico. La reacción se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El precipitado blanco que se formó (perteneciente a la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico no reaccionado) fue filtrado. Finalmente, la solución recogida fue liofilizada para su posterior análisis por RMN.

3.2.4. Conjugación de nanopartículas de oro con ácido hialurónico

En los dos apartados anteriores (Apartados 3.2.1 y 3.2.3) se han descrito el portador (AuNP) y la molécula dirigidora (HASH) del sistema de liberación. En este apartado se describe la conjugación óptima de estos dos elementos del sistema, la unión de las AuNPs con el HASH (EDS) (Figura 3.6).

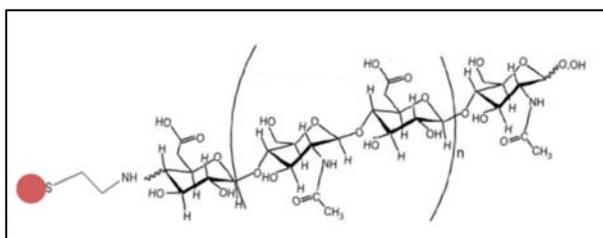


Figura 3.6 Representación de la conjugación del EDS.

3.2.4.1. Conjugación del EDS1

Se mantuvo en agitación 37,5 μ M de HASH 30-50 kDa en una solución de AuNPs 12 nm (a una concentración de Au de 100 ppm) durante 30 minutos. A continuación se filtró la solución mediante un filtro de PES de 0,2 μ m. Para llevar a cabo la limpieza del exceso de HASH no conjugado y para concentrar el producto, se utilizó el *Labscale* TFF system con membranas *Biomax* de Millipore de 100 NMWL.

Para la purificación se añadió H₂O (10 veces el volumen inicial) y se concentró hasta 1000 ppm de Au.

3.2.4.2. Conjugación del EDS2

Se conjugó en agitación 0,130 mM de HASH 8-15 kDa en una solución de AuNPs 12 nm (a una concentración de Au de 100 ppm). Pasados 30 minutos, se filtró la solución mediante un filtro de PES de 0,2 µm. Para llevar a cabo la limpieza del exceso de HASH no conjugado y para concentrar el producto, se utilizó el *Labscale* TFF system con membranas *Biomax* de Millipore de 100 NMWL. Para la purificación se añadió H₂O (10 veces el volumen inicial) y se concentró hasta 1000 ppm de Au.

3.2.4.3. Conjugación del EDS3

Se agitó 65,22 µM de HASH 8-15 kDa en una solución de AuNPs 4 nm (a una concentración de Au de 47 ppm). Pasados 30 minutos, se filtró la solución mediante un filtro de PES de 0,2 µm. Para llevar a cabo la limpieza del exceso de HASH no conjugado y para concentrar el producto, se utilizó el *Labscale* TFF system con membranas *Biomax* de Millipore de 100 NMWL. Para la purificación se añadió H₂O (10 veces el volumen inicial) y finalmente se concentró hasta 1000 ppm de Au.

A la hora de escalar los conjugados, se trabajó en la técnica utilizada en la purificación y concentración de los conjugados. En la Figura 3.7 se observa el paso de un *stirreccell* de 200 ml (para trabajar con volúmenes pequeños) a un *labscale pellicon* de 500 ml (para trabajar con volúmenes grandes).

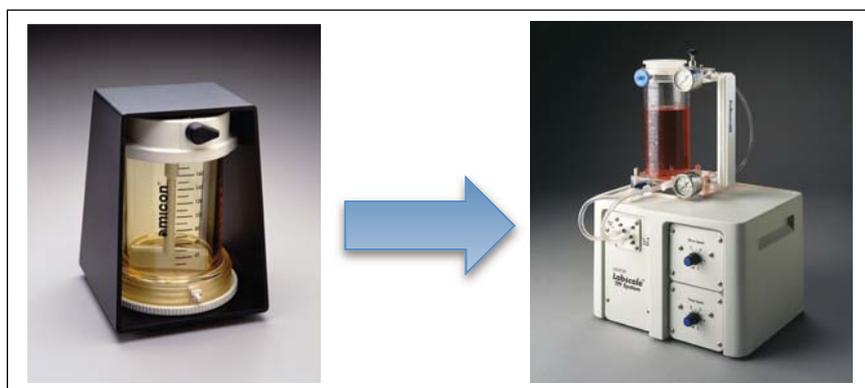


Figura 3.7 Imágenes de la escalabilidad en la producción de los sistemas EDS. *Stirreccell* (izquierda) de 200 ml y *labscale pellicon* (derecha) de 500 ml de capacidad.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.5. Conjugación del sistema nanopartícula de oro con ácido hialurónico tiolado y fármaco antitumoral

Se conjugaron al sistema EDS1 diferentes fármacos antitumorales para validar el sistema de liberación (Figura 3.8).

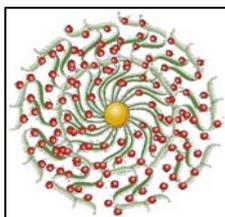


Figura 3.8 Representación de la conjugación EDS1 con un fármaco.

Los fármacos antitumorales utilizados para validar el EDS1 son (Figura 3.9):

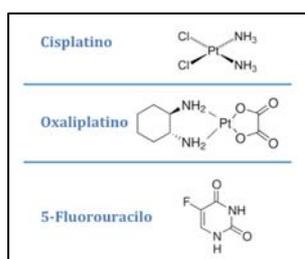


Figura 3.9 Representación molecular de los fármacos antitumorales. Cisplatino, Oxaliplatino y 5-Fluorouracilo.

Las diferentes drogas se conjugaron al sistema EDS1 mediante diferentes estrategias, dependiendo de las características físico-químicas de cada molécula (Tabla 3.1).

Fármaco	Ligando	Vía	
Cisplatino	Ligando L	A.1 A.2	
	Ligando L2	B.1 B.2	
	HASH	C.1	
		C.2	
		C.3	
	Oxaliplatino	Ligando L	A.1 A.2
HASH		B.1 B.2	

Fármaco	Ligando	Vía
5-Fluorouracilo	Ligando L	A.1 A.2
	Cistamina	B
	HASH	C

Tabla 3.1 Resumen de los productos EDS1-fármaco. Cada una de las vías se diferencia por las concentraciones de los compuestos del sistema de liberación.

3.2.5.1. Síntesis de EDS1 con cisplatino

Se diseñaron diferentes vías (A, B y C) para la conjugación del Cis con EDS1.

3.2.5.1.1. Vía A Cis

En la estrategia seguida en la vía A Cis, el fármaco se unió directamente a la AuNP del EDS1 mediante el ligando L. El ligando L se sintetizó para obtener un tiol terminal (unión con la AuNP) y un grupo funcional, en este caso una amida, para enlazarse al fármaco. Siguiendo la estrategia de la vía A Cis, se conjugaron dos concentraciones diferentes de fármaco: 825 μM para A.1 y 9,95 μM para A.2.

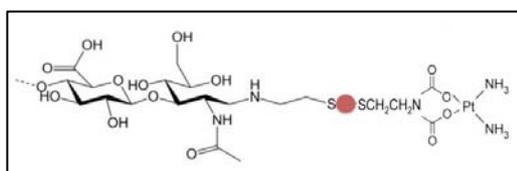


Figura 3.10 Representación de la conjugación del EDS1 con el Cis por la vía A Cis

Síntesis del ligando L

La síntesis del ligando L constó de tres pasos como se indica en el esquema de la Figura 3.11.

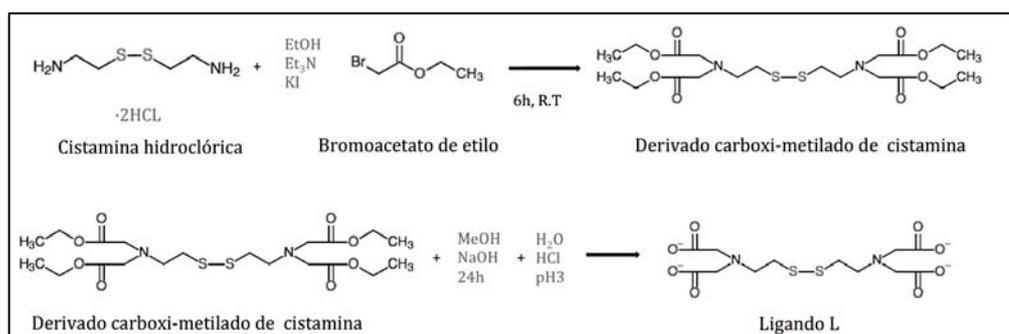


Figura 3.11 Esquema de la síntesis del Ligando L.

La síntesis se obtuvo mediante la reacción de una solución de 49,95 mM de diclorhidrato de cistamina disuelta en etanol y 0,72 M de trietilamina, donde se añadió bromoacetato de etilo a 0,30 M y 31,32 μM de yoduro de potasio. Después de 6 h en agitación a temperatura ambiente, el sólido insoluble se filtró. El líquido filtrado se rotavaporó y se realizó una cromatografía *flash* (1:1 CH_2Cl_2 :EtOAc).

3.2 METODOLOGÍA

La desprotección del grupo carboxílico se obtuvo disolviendo el producto en MeOH:NaOH (2:1), con agitación durante toda la noche. Se disolvió en H₂O milliQ y se llevó a pH 3 con HCl 1 M. El precipitado (ligando L) apareció a baja temperatura. Se filtró y se limpió el sólido con EtOH/H₂O. La síntesis es una modificación de la reacción descrita en la bibliografía (Xu et al., 2009).

Conjugación:

La conjugación del ligando L al Cis y este al EDS1 se realizó con una solución de AuNPs 12 nm a una concentración de 322 ppm de Au añadiendo 0,4 mM de L en MeOH, manteniendo la solución durante 4 h en agitación. La solución se llevó a pH 10 con NaOH 1 M. Se añadió 825 µM de Cis (vía A.1) y 12,5 µM de HASH 30-50 kDa, se volvió a pasar por el *stirrer cell* de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore).

Para la vía A.2 se procedió de la misma manera que para la vía A.1 modificando la concentración de L a 4,9 µM y la del Cis a 9,95 µM.

3.2.5.1.2. Vía B Cis

La estrategia en la vía B Cis es la unión del fármaco a la AuNP del EDS1 mediante el ligando 11-mercaptoundecanoico (MUA) (L2), el cual se unió a Cis a través del grupo carboxílico y mediante el tiol a la AuNP del EDS1. Siguiendo la estrategia de la vía B Cis, se conjugaron dos concentraciones diferentes de fármaco: 825 µM para B.1 y 9,95 µM para B.2.

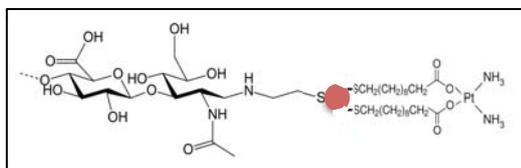


Figura 3.12 Representación de la conjugación del EDS1 con el Cis por la vía B Cis.

La conjugación del Cis con el ligando MUA (Figura 3.12) se sintetizó en una solución de AuNPs 12 nm a una concentración de 322 ppm de Au, donde se conjugó añadiendo 1,65 mM del ligando L2 (MUA) manteniendo la solución durante 4 h en agitación. La solución se llevó a pH 10 con NaOH 1 M. Se añadió 825 µM de Cis para la

3.2 METODOLOGÍA

3.2.5.1.4. Estabilidad en el tiempo

El producto C.1 Cis se almacenó a 4 °C y se recogió muestra para el análisis de estabilidad pasados un mes y tres meses. La muestra extraída se ultrafiltró en el *stirrer cell* de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore) y se analizaron mediante ICP-MS las dos partes de la ultrafiltración.

3.2.5.1.5. Estabilidad según el pH

La solución acuosa del candidato C.1 Cis fue cambiada a PBS mediante el *stirrer cell* de 200 ml (Millipore) utilizando una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore). A continuación se ajustaron los pH (7,5 y 3 pH) mediante NaOH 1 M y HCl 1 M. 1,3 ml de cada solución se centrifugó a 3600 rpm durante 2+2+1 minutos utilizando las unidades de centrifugación *Amicon-15 centrifugal filter units* (Millipore). La solución resultante de la filtración se analizó mediante ICP-MS.

3.2.5.1.6. Estabilidad enzimática

La muestra C.1 Cis se incubó con 250 u/mg de hialuronidasa y fue filtrada a diferentes tiempos (1, 4, 6, 12, 24 y 48 h) mediante el *stirrer cell* de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore). Las dos partes de la filtración fueron analizadas mediante ICP-MS.

3.2.5.2. Síntesis del EDS1 con oxaliplatino

Se diseñaron protocolos específicos para la conjugación doble del EDS1 con el Oxa.

3.2.5.2.1. Vía A Oxa

En la vía A Oxa el fármaco se enlazó a la AuNP mediante el ligando L (sintetizado en el apartado 3.2.5.1.1) que contiene un tiol. Mediante la amida del ligando L, este se une al Oxa. Se conjugaron dos concentraciones diferentes de fármaco: 825 µM para A.1 y 20 µM para A.2.

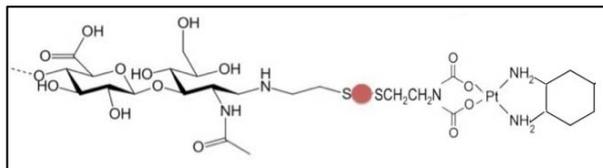


Figura 3.14 Representación de la conjugación del EDS1 con el Oxa por la vía A Oxa.

Una solución de AuNPs 12 nm a una concentración de 322 ppm de Au se conjugó añadiendo 0,4 mM de ligando L (sintetizado en el apartado 3.2.5.1.1) en MeOH manteniendo la solución durante 4 h en agitación. La solución se llevó a pH 10 con NaOH 1 M. Se añadió 825 μM de Oxa y 12,5 μM de HASH 30-50 kDa para la vía A.1. Finalmente, se volvió a pasar por el *stirrer*cell de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore).

Para la vía A.2 se procedió de la misma manera que para la vía A.1 modificando la concentración de L a 0,05 mM y la del Oxa a 20 μM .

3.2.5.2.2. Vía B Oxa

El Oxa se conjugó directamente al HASH del sistema EDS1 en la vía B Oxa.

Se añadieron tres concentraciones de Oxa al conjugado: 20000 μM para B.1; 1500 μM para B.2 y 500 μM para B.3.

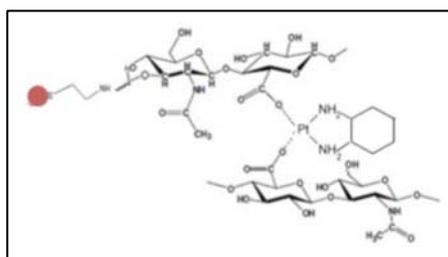


Figura 3.15 Representación de la conjugación del EDS1 con el Oxa por la vía B Oxa.

Para obtener el sistema EDS1-Oxa que se representa en la Figura 3.15 se utilizó una solución de AuNPs 12 nm a una concentración de 100 ppm de Au y se conjugó añadiendo 0,038 mM de HASH 30-50 kDa y dejando 30 min en agitación. A continuación se limpió y concentró pasando por el *stirrer*cell de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa

3.2 METODOLOGÍA

(Millipore) hasta obtener una concentración de AuNPs de 1000 ppm. A continuación se añadió el Oxa a una concentración de 20000 μM (vía B.1), 1500 μM (vía B.2) y 500 μM (vía B.3). Finalmente, se volvió a pasar por el *stirrer* cell de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore) para eliminar el exceso de droga que no se había conjugado al sistema.

3.2.5.3. Síntesis del EDS1 con 5- fluorouracilo

Se diseñaron diferentes vías (vía A, B y C) para la conjugación del 5-Fu con el EDS1.

3.2.5.3.1. Vía A 5-Fu

La vía A 5-Fu consistió en unir el fármaco a la AuNP del EDS1 mediante el ligando L (sintetizado en el apartado 3.2.5.1.1) (Figura 3.16).

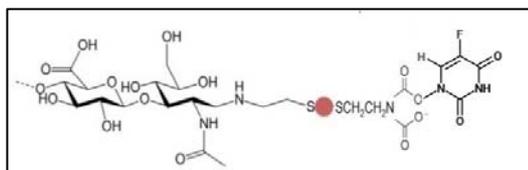


Figura 3.16 Representación de la conjugación del EDS1 con el 5-Fu por la vía A 5-Fu.

La síntesis de la vía A 5-Fu se realizó con dos concentraciones diferentes del fármaco (A.1 y A.2 5-Fu).

La reacción de la vía A.1 5-Fu se realizó mediante la adición de 1,25 μM de HASH 30-50 kDa y 16,08 μM de ligando L en una solución de AuNPs 12 nm a 33 ppm. Posteriormente se añadieron 35,11 μM 5-Fu disuelto en MeOH.

La conjugación de la vía A.2 5-Fu fue mediante la adición de 0,75 μM de HASH 30-50 kDa y 21,78 μM de ligando L en una solución de AuNPs 12 nm a 33 ppm. A continuación, 35,11 μM 5-Fu disuelto en MeOH se añadió a la solución.

3.2.5.3.2. Vía B 5-Fu

La vía B 5-FU unió el fármaco a la AuNP del EDS1 mediante la modificación del propio fármaco con cistamina (Figura 3.17).

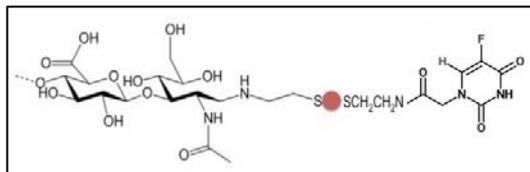


Figura 3.17 Representación de la conjugación del EDS1 con el 5-Fu por la vía B 5-Fu.

La vía B 5-Fu requirió de un cambio en la molécula del 5-Fu. La modificación se hizo con el objetivo de tener un tiol terminal en el fármaco (Figura 3.18) y conjugarlo directamente a la AuNP del sistema EDS1 (Figura 3.17).

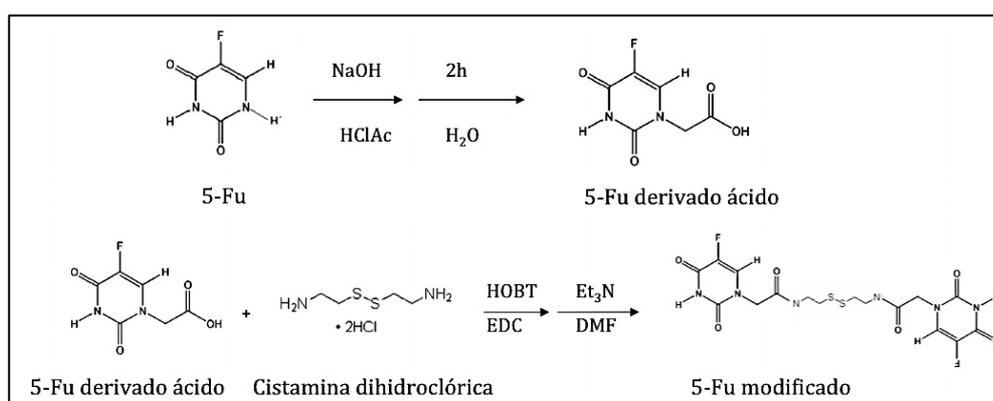


Figura 3.18 Representación de la reacción de síntesis del 5-Fu modificado.

La reacción para obtener el 5-Fu derivado ácido se realizó adicionando en H_2O , 1,33 mM de 5-Fu, junto con 2,66 M de NaOH. Seguidamente se añadieron 8 ml de 2,41 M de ácido cloroacético. La solución se llevó a pH 10 y se dejó la reacción en reflujo durante 2 h tras las cuales se acidificó la solución hasta pH 2 y se mantuvo en hielo. El precipitado obtenido se filtró y se limpió con H_2O fría.

El producto final requiere de la adición de 0,20 M del derivado ácido anteriormente sintetizado y 0,23 M de HOBT (N-hidroxibenzotriazole) en DMF (dimetilformamida). A continuación se añadió 98,84 mM de diclorhidrato de cistamina y 1,7 ml de 8,95 M EDC (N-(3 dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) en trietilamina. Se dejó la reacción durante 10 h. Se filtró para extraer el disolvente y el producto obtenido se lavó con diclorometano y con una solución de bicarbonato al 5%.

3.2 METODOLOGÍA

Se hicieron reaccionar en una solución de AuNPs a 33 ppm de Au, 31,02 μM del 5-Fu modificado disuelto en DMSO y 12,5 μM de HASH 30-50 kDa. Se purificó mediante el *stirrer*cell de 200 ml (Millipore) con una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada 100 kDa (Millipore).

3.2.5.3.3. Vía C 5-Fu

En la vía C 5-Fu, el 5-Fu se unió al EDS1 mediante la conjugación directa al HASH (Figura 3.19).

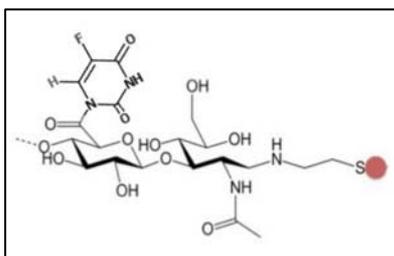


Figura 3.19 Representación de la conjugación del EDS1 con el 5-Fu por la vía C 5-Fu.

Se hizo reaccionar en solución acuosa 50 μM de HASH 30-50 kDa, 5,22 mM de n-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida(EDC), 5,22 mM de (N-hidroxisuccinimida) NHS y 4,61 mM de 5-Fu. Ésta solución se mantuvo en agitación 24 h. Se dializó con una membrana de diálisis de corte de 500-1000 Da.

3.2.6. Métodos *in vitro*

3.2.6.1. Cultivo celular

Las células se cultivaron de forma rutinaria en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de FBS (Serum bovino fetal), 100 unidades de penicilina/ml, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y 2 mM de glutamina. Las líneas celulares se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C, 5% de CO_2 y se pasan cada 3-4 días.

3.2.6.2. Internalización

Panc-1 (línea de páncreas humano con niveles altos de expresión de CD44) fueron sembradas en placas de 6 pocillos, 300000 células/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas, el ciclo celular fue detenido O/N por la privación

de suero (medio de crecimiento que contiene 0,2% de FBS) y posteriormente las células se trataron con EDS durante 30 minutos. Las células fueron lavadas cuatro veces con 0,01% de Tween-PBS con el fin de eliminar las NPs unidas en la superficie celular. Se recogieron a continuación mediante un cuidadoso raspado y se sedimentaron por centrifugación. Los sedimentos se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por ICP-MS.

3.2.6.3. Citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad empleado para determinar la IC₅₀ de los nanosistemas utilizó 4-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosaminida, sustrato para la hexosaminidasa intracelular (sustrato HEX). La hexosaminidasa es una enzima que cataliza la escisión de 4-nitrofenol del sustrato, el cual puede ser medido por el espectrofotómetro.

El sustrato HEX se preparó con 7,5 mM de la molécula, 0,1 M de citrato de sodio y Triton-X al 0,25%, ajustando la solución a pH 5. Se agitó y filtro (0,2 µm filtro Pes). Se guardó a -20 °C.

La solución de revelado HEX se preparó disolviendo 50 mM de glicina con 5 mM de EDTA y llevando la solución a pH 10,4. Se guardó a -20 °C.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, 8x10³ células/pocillo. Se dejaron crecer durante un mínimo de 24 horas para llegar a la fase logarítmica de crecimiento celular y a continuación se añadieron a cada pocillo los tratamientos. Se utilizó una serie de dilución de 1/4, a partir de 1000 ppm de Au. Después de 72 horas de incubación, se visualizaron mediante microscopio de luz. Las células se lavaron con PBS tres veces. El sustrato HEX se añadió en los pocillos de 15 minutos a 2 horas, hasta que el color comenzó a girar a un amarillo muy claro. A continuación, se añadió la solución de revelado HEX y se midió la absorbancia a 410 nm por el espectrofotómetro *Biotek PowerWave XS*.

Se utilizó medio completo de cultivo celular como control negativo, al que se compararon todas las diluciones del producto que se realizaron en el mismo medio. Los experimentos de citotoxicidad se realizaron con 6 repeticiones paralelas y un

mínimo de tres veces. Los valores de IC50 se calcularon utilizando las curvas de viabilidad generadas por los resultados en el software *GraphPad Prism*.

3.2.7. Técnicas de Caracterización

3.2.7.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

El valor característico de la resonancia de los plasmones de superficie (SPR, siglas en inglés) permitió determinar la estabilidad, concentración y cambios en la superficie de las AuNPs.

SPR es la propiedad óptica más destacable de las NPs metálicas. Consiste en una oscilación colectiva de los electrones del material cuando son excitados con luz. La absorción depende del tamaño, índice de refracción del medio y de las moléculas que recubren las NPs (Doyen et al., 2013; Haiss et al., 2007; Klar et al., 1998).

La caracterización de las NPs se realizó mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-2501 PC, *UV-Vis recording Spectrophotometer Shimadzu*), permitiendo identificar la posición de la banda SPR. Las cubetas desechables utilizadas requieren un mínimo de volumen de 0,8 ml.

Las medidas también se obtuvieron mediante un espectrofotómetro de placas *Power Wave XS* con el software *Gen 5* (BioTek). Al utilizar placas de 96 pocillos se reduce la cantidad de muestra a analizar, la cantidad mínima por análisis es de 0,15 ml.

3.2.7.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, siglas en inglés) permite la observación directa de la muestra ultrafina obteniendo una imagen de los electrones que atraviesan la muestra. Un filamento de tungsteno genera un haz de electrones que son acelerados y dirigidos hacia la muestra mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío. Después de pasar a través de la muestra, los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetivo. La imagen es ampliada por las lentes proyectoras hacia la pantalla fluorescente, donde se define la imagen final.

Algunos materiales que contienen suficiente densidad electrónica como las AuNPs, pueden ser detectados directamente por TEM. Sin embargo, otras moléculas orgánicas no tienen suficiente densidad electrónica y necesitan un procesamiento previo para ser observadas.

Para los estudios de esta tesis, se utilizó un Microscopio Electrónico *Jeol 1010* (Japón) y se trabajó a 80 kV con una cámara *CCD Megaview III* y un software de adquisición de imágenes *AnalySIS*. 10 µl de la muestra se depositaron sobre la rejilla (*formvar coated 200-mesh copper grid, Ted Pella, inc.*) y se dejó secar al aire. El tratamiento de imagen se realizó mediante el software *Image J* y el programa estadístico *Statgraphics*. De cada muestra se midieron 200 partículas para obtener una media de distribución de tamaño y su desviación típica.

Técnica de tinción negativa

La tinción negativa es una técnica utilizada en microscopía para crear contraste y visualizar moléculas con baja densidad electrónica que no pueden ser detectadas directamente. Se utiliza un contraste opaco a los electrones del haz; son sustancias de alto número atómico como el acetato de uranilo y el fosfotungstato de sodio.

La tinción de acetato de uranilo se realizó al 2% a pH 4. La rejilla de TEM se puso sobre una gota de la muestra a analizar durante un minuto. Se extrajo y se dejó durante un minuto sobre la gota del acetato de uranilo tiñendo la muestra. Finalmente la rejilla se posó sobre una gota de agua para extraer el exceso de material. La rejilla se observó por el TEM.

La tinción con fosfotungstato de sodio a pH 7,5 se realizó de la misma manera que la descrita anteriormente para el acetato de uranilo.

3.2.7.3. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Se utilizó un microscopio electrónico TEM 200 kV con cañón de emisión de campo *JEOL JEM 2010F*. El software de adquisición de imágenes fue el *AnalySIS*. 10 µl de la muestra se depositaron sobre la rejilla (*formvar coated 200-mesh copper grid, Ted*

3.2 METODOLOGÍA

Pella,inc) y se dejó secar al aire. El tratamiento de imagen se realizó mediante el software *Image J* y el programa estadístico *Statgraphics*.

3.2.7.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS, siglas en inglés), es una técnica no invasiva que permite medir el tamaño de las NPs en dispersión. La técnica mide las fluctuaciones dependientes del tiempo mediante la intensidad de luz dispersada en la suspensión de partículas, es decir, el movimiento browniano aleatorio. El análisis de las fluctuaciones de intensidad permiten determinar los coeficientes de difusión, lo que a su vez se transforma en el tamaño hidrodinámico de partícula a través de la ecuación de Stokes-Einstein (Pecora et al., 2006).

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$$

Figura 3.20 Ecuación Stokes-Einstein. Ecuación utilizada para el cálculo del tamaño hidrodinámico de la partícula a partir del análisis del movimiento browniano.

La caracterización de las NPs mediante DLS aporta información sobre la homogeneidad, el diámetro e incluso los agregados de la muestra. Aunque el TEM es una buena técnica para visualizar las NPs, desde un punto de vista estadístico sólo se obtiene el tamaño de unas decenas o cientos de NPs. Sin embargo, utilizando el DLS, estadísticamente se obtiene una visión más amplia de los valores caracterizados. Con el DLS se obtienen valores de tamaño de partícula basado en número, en volumen y en intensidad.

Los análisis DLS se llevaron a cabo en un Zetasizer de la serie *nano ZS* de la casa Malvern (*Malvern Instrument, UK*) a una longitud de onda de 532 nm y un ángulo fijo de dispersión de 173°. La muestra líquida se midió con una cubeta de camino óptico de 1 cm. Se midieron 4 lotes para obtener una media de distribución de tamaño y su desviación típica.

3.2.7.5. Potencial Z (Pot-Z)

El potencial Z (Pot-Z) se utiliza para evaluar la estabilidad de carga de un sistema disperso. La carga superficial de las NPs adquirida en una solución se debe a la ionización en la superficie o a la adsorción de especies cargadas.

Cuando el potencial zeta es bajo, el diferencial entre la carga de las capas de solvatación y la carga dispersa en el medio es bajo en valor absoluto, es posible la formación de agregados. En este caso la carga superficial de la partícula atrae otras partículas envueltas con cargas de signo contrario. Pero cuando el potencial zeta es, en valor absoluto, superior a 30 mV, entonces predominan las fuerzas de repulsión electrostática entre las cargas de iones envolventes y las agregaciones ya no son posibles (*Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis* – www.malvern.com).

El Pot-Z se mide mediante la aplicación de un campo eléctrico a la solución de NPs, por lo que éstas migrarán hacia el electrodo de carga opuesta con una velocidad proporcional a la magnitud del Pot-Z. Esta velocidad se mide utilizando la técnica de anemometría de láser *Doppler*. El desplazamiento de frecuencia o de fase de un haz de láser incidente causado por estas partículas en movimiento, se mide como la movilidad de las partículas y esta movilidad se convierte en el Pot-Z mediante la introducción de la viscosidad dispersante y la aplicación de las teorías de Smoluchowski o Huckel (www.malvern.com).

El Pot-Z fue analizado en el *Zetasizer* de la serie *nanos ZS* con una cubeta que consta de un capilar en forma de U que utiliza dos electrodos de placas paralelas planas (*Disposable capillary cell, Malvern Instrument,UK*). Se midieron 4 lotes diferentes con el objetivo de obtener medias y desviaciones típicas.

3.2.7.6. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, siglas en inglés), analiza la mayoría de elementos de la tabla periódica con una sensibilidad que llega a niveles de partes por billón (ppb), ideal para trazas.

3.2 METODOLOGÍA

La muestra, en solución, se introduce en forma de nebulizado con argón, en la corriente de argón que genera el plasma en la antorcha. Cuando los componentes de la muestra llegan a la zona de plasma se encuentran con una zona donde las temperaturas pueden llegar a los 10000 °K. Allí las moléculas se rompen en átomos y éstos pierden capas de electrones, resultando iones positivos y electrones (plasma). La corriente de argón arrastra el plasma generado hacia zonas más frías, donde los átomos recuperan los electrones con la consiguiente emisión de fotones característica de cada elemento de la tabla periódica (espectro de emisión) que sirve para el análisis elemental de la muestra. Alternativamente, un campo eléctrico intenso puede arrancar iones positivos de la zona de plasma e introducirlos en un espectrómetro de masas, otra manera de proceder al análisis elemental de los componentes de la muestra (Ammann et al., 2007; Thomas et al., 2001).

Las muestras analizadas en la presente tesis fueron digeridas previamente con ácidos (HNO₃ y HCl) para degradar la materia orgánica que pudiesen tener determinadas muestras. Los ácidos utilizados generaron agua regia que diluía el oro.

El ICP-MS utilizado fue un instrumento *Perkin Elmer Optima 3200RL*, en condiciones estándar, calibrado con patrones preparados con una solución de tiourea de 200 ppm en HCl 1% y utilizando rodio como patrón interno. Los patrones son de 1 g/L trazables a NIST (*National Institute of Standards and Technology de EEUU*). Se analizaron 4 lotes diferentes cuyos valores obtenidos dieron el resultado de valores medios y desviaciones típicas.

Este análisis permitió saber la cantidad de oro de las muestras, por tanto la cantidad y/o concentración de AuNPs. Además, también se utilizó para cuantificar la cantidad de Pt que contienen los fármacos platinados.

A partir del resultado del ICP-MS de las soluciones, se obtuvo la concentración de Au que contenía la muestra. Siguiendo la fórmula que se muestra a continuación (Figura 3.21), obtuvimos el número de NPs de la muestra y por consiguiente, su molaridad.

$$N^{\circ} \text{ NP} = \frac{V_{\text{Au}}}{V_{\text{NP}}} = \frac{\text{masa}_{\text{Au}} / \delta_{\text{Au}}}{\pi \cdot D^3 / 6}$$

Figura 3.21 Ecuación para determinar el número de NPs esféricas.

3.2.7.7. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que utiliza las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos de las moléculas. Esta técnica proporciona información de la estructura, dinámica, estado de reacción y el ambiente químico de las moléculas.

Se realizaron experimentos de RMN 1D y 2D para determinar la estructura del ácido hialurónico y poder determinar la posición estructural de la modificación de tiolación en la molécula. También fue utilizada como herramienta de análisis de las reacciones de síntesis de los ligandos y modificaciones de fármacos para determinar la estructura del compuesto final.

Se registraron en los espectrómetros *Mercury 400* (400 MHz), *Varian Inova-500* (500 MHz), *Varian VNMR500* (500 MHz) y en el *Bruker Avance 600* (600 MHz). Las muestras fueron liofilizadas previamente y como disolventes se utilizaron D₂O, CDCl₃, y DMSO- *d*₆.

La interpretación de los espectros se facilitó empleando los siguientes análisis; ¹H, ¹³C, HSQC, COSY, zTocsy, HMBC y ¹⁹F.

3.2.7.8. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, siglas en inglés) nos muestra la energía absorbida por la muestra en las longitudes de onda del IR, cuando coincide la frecuencia de excitación de un enlace con la emitida por el rayo, dando un espectro de absorbancia o transmitancia que permite interpretar los enlaces presentes en la molécula analizada.

Se ha utilizado el FT-IR para la interpretación de los enlaces de la molécula de HA y poder analizar las modificaciones debidas a la tiolación.

3.2 METODOLOGÍA

Se realizaron en el espectrofotómetro *Thermo Scientific Nicolet iZ120 (ATR diamant, detector DTGS)* en el rango de 4000 a 525 cm^{-1} .

3.2.7.9. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM, siglas en inglés) utiliza una punta de dos micras que se encuentra localizada en un cantiléver, el cual ejerce una fuerza y se deforma elásticamente cuando escanea una muestra bajo su punta. La medida de las deflexiones del cantiléver permite a los sensores detectar los cambios y generar un mapa topográfico de la superficie de la muestra (Moghimi et al., 2005).

Se utilizó el AFM para obtener imágenes y analizar el tamaño, distribución y estabilidad de las muestras.

La muestra que se analizó fue depositada en un substrato de mica. Una gota de 10 μl a una concentración de Au de 100 ppm fue añadida y secada al aire.

Las imágenes por AFM se realizaron con un microscopio Multimodo 8 de fuerza atómica unida a una *Nanoscope V electrónica* (Bruker) que opera en *Peak Force QNM (Quantitative nanomechanical mapping)* a temperatura ambiente. La sonda de AFM que se utilizó en los experimentos tienen nitruro de silicio triangular en el cantiléver con óxido de silicio (SNL-10, Bruker). La constante eléctrica nominal fue 0,35 nN/nm. Las imágenes fueron tratadas con el software *Nanoscope*.

3.2.7.10. Nanosight (NTA)

El Nanosight (NTA, siglas en inglés), es capaz de medir el tamaño de partícula, la agregación y la concentración en la disolución, mediante una luz láser que visualiza la luz dispersada de las partículas. El tamaño puede ser analizado en un rango de 10-2000 nm mediante la relación de velocidad del movimiento browniano de las partículas.

El software de NTA es capaz de identificar y realizar un seguimiento de las NPs individuales que se mueven bajo el movimiento browniano. Este movimiento es referido a un tamaño de partícula concreto de acuerdo con la fórmula derivada de la ecuación de Stokes-Einstein (Figura 3.20) (Filipe et al., 2010).

El Nanosight se utilizó para analizar los diferentes conjugados EDS1, EDS2 y EDS3, para poder obtener el tamaño de partícula y su distribución. Las muestras fueron diluidas en H₂OmilliQ hasta una medida de concentración entre 10⁷ y 10⁹ NP/ml.

Las medidas NTA fueron realizadas con un *Nanosight LM14* (*Nanosight, Amesbury,UK*), con una cámara de alta sensibilidad CMOS y con ajustes de *track length* y *Blur* en automático, el tiempo de exposición fue de 25 ms. Los videos se midieron durante 60s. Las medidas fueron tomadas a temperatura ambiente. El software utilizado para el análisis fue *NTA 2.3 build 0033*.

3.2.7.11. Análisis elemental orgánico (AEO)

El AEO es una técnica que analiza el porcentaje de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en la muestra. La combustión con oxígeno puro a 1000 °C, aproximadamente, provoca la oxidación de la muestra dando como productos CO₂, H₂O, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre y óxidos metálicos. Estos productos, resultado de la combustión, son arrastrados con He a través de un tubo de reducción, transformados en CO₂, H₂O, N₂ y SO₂, y separados selectivamente por columnas de cromatografía de gases específicas para ser detectados por conductividad térmica, proporcionando una señal a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

Con esta técnica, sólo es detectable la materia orgánica, no los metales, por tanto, se utilizó para cuantificar el HA y los diferentes componentes de los sistemas de liberación, como los ligandos e incluso los fármacos.

La muestra se liofilizó previamente al análisis. El análisis fue realizado mediante un analizador elemental orgánico Thermo EA 1108 (Thermo Scientific) trabajando en condiciones estándar recomendadas por el proveedor del instrumento (flujo de helio a 120 ml/min, horno de combustión a 1000 °C, horno de columna cromatográfica a 60 °C, oxígeno dentro de bucle a 10 ml a 100 kPa). Se analizaron 4 lotes diferentes de cada compuesto, cuyos valores obtenidos dieron el resultado de valores medios y desviaciones típicas.

3.2 METODOLOGÍA

También se utilizó un analizador elemental orgánico Thermo EA Flash 2000 (Thermo Scientific) trabajando en condiciones estándar recomendadas por el proveedor del instrumento (flujo de helio a 140 ml/min, horno de combustión a 950 °C, horno de columna cromatográfica a 65 °C, oxígeno dentro de bucle a 10 ml a 250 kPa).

Con los resultados obtenidos por AEO de porcentaje de carbono y nitrógeno, se obtuvo la relación final del número de moléculas de HA respecto a una AuNP. Para obtener este valor hay que calcular los µg de hialurónico que hay en la muestra teniendo en cuenta el peso de muestra analizado y las relaciones molares obtenidos de los resultados de la técnica. En el caso de la introducción del valor de la NP hay que normalizar con el volumen de muestra analizado y la cantidad de Au que se obtiene mediante la técnica de ICP-MS.

Para realizar el cálculo teórico del número de moléculas que hay alrededor de una AuNP, debemos calcular el número teórico de átomos de oro que hay en la superficie de la AuNP. Este cálculo se realiza a través de la siguiente fórmula (Figura 3.22):

$$N^{\circ} \text{ átomos de Au en superficie} = \frac{V_{\text{carcasa esfera}}}{V_{\text{Au}}} = \frac{4/3 \pi [R_n^3 - (R_n - 2R_{\text{Au}})^3]}{4/3 \pi R_{\text{Au}}^3}$$

Figura 3.22 Ecuación para determinar el número de átomos en la superficie de una NP esférica. V = volumen; R_{Au} = radio de un átomo de Au y R_n = radio de la NP.

3.2.7.12. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, siglas en inglés) utiliza termobalanzas para medir el cambio de masa de la muestra con el cambio de temperatura.

Particularmente, en la presente tesis, se utilizó el TGA para conocer el porcentaje de material que recubre la NP. La AuNP no se degrada a la temperatura del análisis, por tanto la curva que se obtiene es de la materia orgánica que la recubre.

La muestra fue liofilizada previamente. El instrumento utilizado para el análisis termogravimétrico fue una termobalanza Mettler STAR S.W. 8.10 en condiciones de temperaturas de 30,0 a 800,0 °C para todas las muestras. Las muestras se calentaron a una velocidad de 10,00 °C/min en aire 50,0 ml/min.

3.2.7.13. Espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA)

La espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA o XPS, siglas en inglés) se obtiene irradiando la superficie de la muestra con rayos X mientras se mide la energía cinética y el número de electrones que se escapan del material. Se utiliza para conocer la estequiometría, el estado químico y la estructura electrónica de los elementos que hay en el material.

Se utilizó el ESCA para analizar las AuNPs, determinando el estado de oxidación del Au y comprobando que la reacción de síntesis de AuNPs se había llevado a cabo completamente. Además también se analizó la composición del EDS1.

Los experimentos de ESCA se hicieron en un *PHI 5500 Multitechnique System (Physical electronics)* con una fuente de rayos X monocromática (*Aluminium Kalfa line* de 1486,6 eV y 350 W), situado en perpendicular al analizador y calibrado utilizando la línea 3d5/2 del Ag con una anchura total a la mitad del máximo (FWHM) de 0,8 eV. El área analizada fue un círculo de 0,8 mm de diámetro y la resolución seleccionada para los espectros fue 187,5 eV al paso de la energía 0,1 eV/paso para los espectros de los diferentes elementos en los espectros de perfil profundo. Se utilizó un cañón de electrones de baja energía (menos de 10 eV) para descargar la superficie cuando fue necesario. Todas las mediciones se realizaron a alto vacío (UVH, *ultra high vacuum*), con unos valores en la cámara de presión entre 5×10^{-9} y 2×10^{-8} torr.

3.2.7.14. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, Siglas en inglés) requiere que la muestra sea conductora de electrones. Eso es posible que suceda directamente con las muestras analizadas, pero en el caso que no lo sean, en ocasiones se recubren con una capa fina de metal. Electrones acelerados se transmiten a la muestra conductora barriendo la superficie y el detector mide la intensidad de electrones que se

3.2 METODOLOGÍA

desprenden. Esta intensidad es leída e interpretada para dar como resultado una imagen en tres dimensiones de la superficie de la muestra.

Se utilizó el SEM con el objetivo de obtener imágenes 3D del sistema EDS1 para poder visualizar la disposición del HASH en las AuNPs.

Las muestras se diluyeron hasta 100 ppm de Au. 10 µl de la muestras se depositaron en una rejilla y se dejaron secar al aire. El equipo utilizado fue un Zeiss DSM 940^o. Las imágenes fueron tomadas con un voltaje de aceleración de electrones desde 2,5 a 15 Kv, la corriente del haz de 36 a 160 pA y los detectores utilizados fueron: TLD (*thought-the -lens detector*); ETD(*everhart-thornley detector*) y LVD (*low vacuum secondary electron detector*).

También se utilizó un equipo FEI Magellan 400 L XHR. El voltaje de aceleración de electrones fue de 20 kV, la corriente del haz de 100 pA, los detectores utilizados fueron: SE (*secondary electrons*, para imagen de superficie) y STEM-HAADF (*scanning transmission electron microscopy - high angle annular dark field*, para imagen de transmisión y contraste de pesos atómicos, donde se veía el oro contrastado respecto a la materia orgánica). El alto vacío era de aproximadamente 10⁻⁵ Pa.

3.2.7.15. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS)

La cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS, siglas en inglés) se utiliza para separar y detectar compuestos en una solución. La muestra a analizar es introducida en una columna (fase estacionaria) mediante disolventes (fase móvil), que hace retrasar la salida de los componentes de la muestra en función de las interacciones químicas o físicas del compuesto con la fase estacionaria. El tiempo de retención de la muestra es característico de la naturaleza del compuesto y de la fase estacionaria y móvil. Los compuestos que van saliendo de la columna a diferentes tiempos van siendo analizados por un espectrómetro de masas.

Se ha utilizado el HPLC-MS para detectar compuestos sintetizados, como los ligandos o las modificaciones de los fármacos, y verificar que los compuestos resultantes eran los esperados.

Los análisis por HPLC se llevaron a cabo en un equipo *Waters Alliance 2795/996/2420/ ZQ Micromass System* con detección UV (254 nm) y masas en línea, empleando una columna *XBridge C18* (4,6 X 50 mm, 3,5 μ m) y como fase móvil (línea A= H₂O + 0,1% ácido fórmico; línea B = CH₃CN + 0,07% ácido fórmico) un gradiente 5% a 100% de B con un flujo de 2 ml/min durante 4,5 min.

La técnica UV-Vis fue realizada en espectrofotómetros de los servicios científicos del Parque Científico de Barcelona; y las técnicas de TEM, HR-TEM, ICP-MS, RMN, FT-IR, AFM, AEO, TGA, ESCA y SEM se realizaron en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). El SEM *FEI Magellan* utilizado, fue del Instituto Catalán de Nanotecnología (ICN).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Nanopartículas de oro

4.1.1. Caracterización de nanopartículas de oro

Para conocer el estado físico-químico de las NPs sintetizadas, se analizó el tamaño, la concentración y la carga, mediante las siguientes técnicas:

- UV-Vis
- TEM
- DLS
- Pot-Z
- ICP-MS

4.1.1.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se realizó el espectro de absorbancia UV-Vis a las AuNPs sintetizadas mediante los protocolos descritos en los apartados: 3.2.1.1 (AuNPs 12 nm) y 3.2.1.2 (AuNPs 4 nm). Se observó el pico máximo de absorbancia del SPR a 520 nm para las AuNPs 12 nm (Figura 4.1) y a 510 nm para las AuNPs 4 nm (Figura 4.2). Al diluir la muestra, se mantuvo el máximo del SPR pero disminuyó la intensidad de absorbancia.

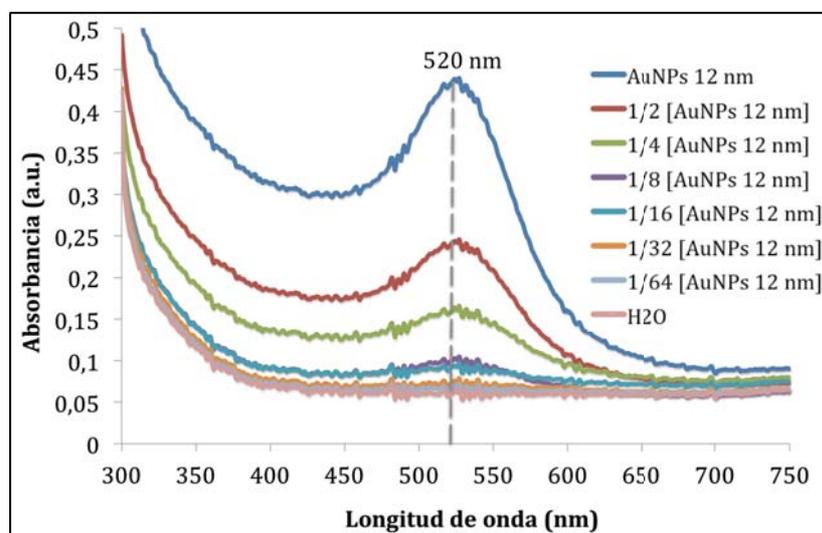


Figura 4.1 Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs 12 nm. Espectro UV-Vis de AuNPs 12 nm donde la banda SPR se mostró a 520 nm y las intensidades variaron en función de la concentración. [AuNP]; 1/2[AuNP]; 1/4[AuNP]; 1/8[AuNP]; 1/16[AuNP]; 1/32[AuNP]; 1/64[AuNP]; control de H₂OmilliQ. La concentración de AuNPs inicial fue de $1,56 \times 10^{12}$ NP/ml (27,31 ppm de Au).

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

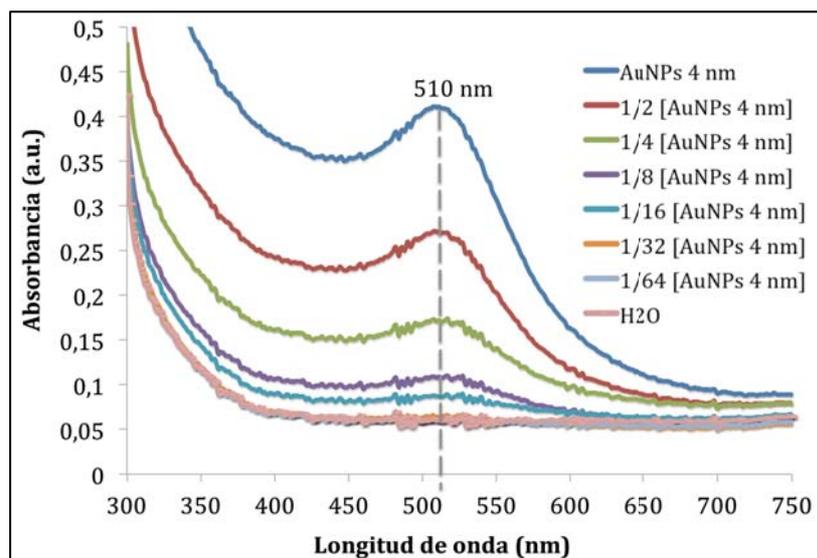


Figura 4.2 Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs 4 nm. Espectro UV-Vis de AuNPs donde la banda SPR se mostró a 510 nm y las intensidades variaron en función de la concentración. [AuNP]; 1/2[AuNP]; 1/4[AuNP]; 1/8[AuNP]; 1/16[AuNP]; 1/32 [AuNP]; 1/64 [AuNP]; control de H₂O milliQ. Se parte de una concentración de $1,11 \times 10^{13}$ NP/ml (45,22 ppm de Au).

4.1.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y HR-TEM

Se analizaron las soluciones de AuNPs (12 nm y 4 nm) por TEM. Las imágenes de las AuNPs 12 nm (Figura 4.3) con su posterior análisis computacional, dieron como resultado una media de $11,08 \pm 2,64$ nm de diámetro (Figura 4.3 C). Además, para completar el estudio de la morfología de las NPs, se analizaron por HR-TEM (Figura 4.3 B).

Las imágenes por TEM de la síntesis de AuNPs 4 nm (Figura 4.3 D), dieron una media de $4,11 \pm 1,28$ nm de diámetro de partícula (Figura 4.3 E).

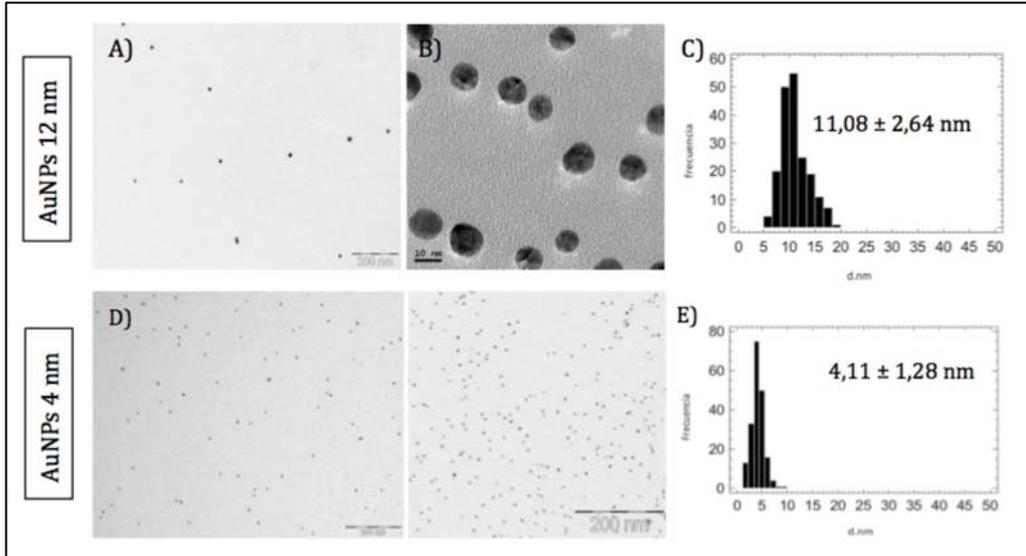


Figura 4.3 Caracterización de las AuNPs 12 nm y AuNPs 4 nm por TEM y HR-TEM. A) Imagen del TEM de la síntesis de AuNPs 12 nm a una concentración de $1,56 \times 10^{12}$ NP/ml (27,31 ppm Au). B) Imagen del HR-TEM de la síntesis de AuNPs 12 nm a una concentración de $1,56 \times 10^{12}$ NP/ml (27,31 ppm de Au). C) Histograma obtenido del análisis de las imágenes (del TEM y HR-TEM A y B). D) Imágenes del TEM de la síntesis AuNPs 4 nm a una concentración de $1,11 \times 10^{13}$ NP/ml (45,22 pm de Au). E) Histograma correspondiente al análisis de las imágenes D.

4.1.1.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

El análisis de las AuNPs 12 nm por DLS mostró la media del tamaño del diámetro hidrodinámico (distribución en número) de $11,56 \pm 0,18$ nm y para la síntesis AuNPs 4 nm el valor (distribución en número) fue de $4,29 \pm 0,62$ nm (Figura 4.4).

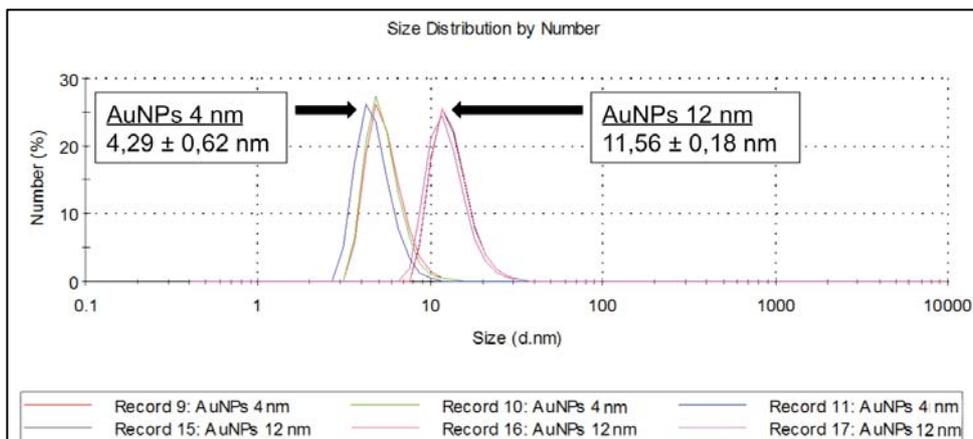


Figura 4.4 Caracterización de las AuNPs 12 nm y 4 nm mediante DLS. Análisis en número del diámetro de AuNPs 12 nm a una concentración de $1,56 \times 10^{12}$ NP/ml (27,31 ppm de Au) y AuNPs 4 nm a una concentración de $1,11 \times 10^{13}$ NP/ml (45,22 pm de Au).

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

4.1.1.4. Potencial Z (Pot-Z)

La caracterización por Pot-Z de las AuNPs 12 nm (Figura 4.5) mostró un valor de carga superficial de $-38,96 \pm 0,93$ mV.

El resultado obtenido para las AuNPs 4 nm mostró una media de la carga superficial (Figura 4.5) de $-23,48 \pm 0,52$ mV.

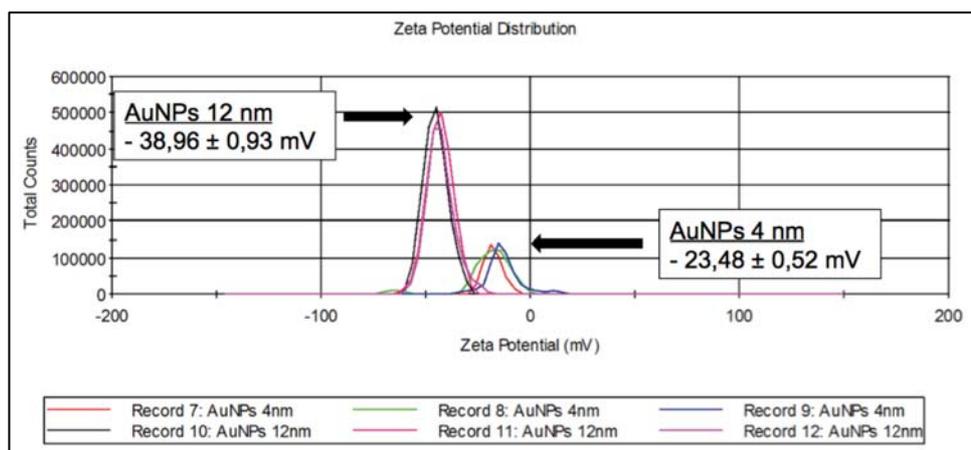


Figura 4.5 Caracterización de las AuNPs 12 nm y 4 nm mediante Pot-Z. Análisis de la carga hidrodinámica de AuNPs 12 nm a una concentración de $1,56 \times 10^{12}$ NP/ml (27,31 ppm de Au) y AuNPs 4 nm a una concentración de $1,11 \times 10^{13}$ NP/ml (45,22 ppm de Au).

4.1.1.5. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La técnica de ICP-MS se utilizó para analizar las síntesis de AuNPs 12 nm (Apartado 3.2.1.1) obteniendo un valor de $27,31 \pm 1,63$ ppm de Au; para la síntesis de AuNPs 4 nm, descrita en el apartado 3.2.1.2, se obtuvo una concentración de Au de $45,22 \pm 1,88$ ppm en solución (Tabla 4.1). A partir de estos resultados se obtuvieron los valores en NP/ml y en nM de las NPs, teniendo en cuenta el tamaño de las NPs y aplicando la formula de la Figura 3.21.

ICP-MS	Conc. Au ppm	Conc. NP /ml	Conc. NPs nM
AuNPs 12 nm	$27,31 \pm 1,63$	$1,56 \times 10^{12} \pm 9,31 \times 10^{10}$	$2,59 \pm 0,15$
AuNPs 4 nm	$45,22 \pm 1,88$	$1,11 \times 10^{13} \pm 4,64 \times 10^{11}$	$18,56 \pm 0,77$

Tabla 4.1 Caracterización de las AuNPs 12 nm y AuNPs 4 nm mediante ICP-MS. A partir de la concentración de Au que se obtuvo mediante ICP-MS, se calculó el número de NP por ml y la molaridad de NPs teniendo en cuenta el tamaño de las partículas.

4.1.2. Escalabilidad de las síntesis de nanopartículas de oro

4.1.2.1. Escalabilidad de AuNPs 12 nm

La escalabilidad de las AuNPs 12 nm se realizó siguiendo la síntesis del apartado 3.2.1.1:

- 1- Aumentando la concentración de Au de 33 ppm (1x) a 100 ppm (3x).
- 2- Aumentando el volumen de 1 L a 10 L tanto con la solución que está a 33 ppm como la que contiene 100 ppm de Au.

Los resultados de la caracterización del aumento de concentración de Au en la síntesis de AuNPs 12 nm (Figura 4.6) mostró un cambio de color de la solución respecto a las AuNPs 1x (Figura 4.6A). El SPR del espectro de absorbancia del UV-Vis se mantuvo en 520 nm (Figura 4.6 B) y las imágenes del TEM (Figura 4.6 C) mostraron una concentración mayor de NPs por mm² de superficie manteniéndose monodispersas y estables (Figura 4.6 D). Los resultados analizados por TEM, DLS y Pot-Z dieron valores iguales que para la síntesis 1x. Finalmente se realizó ICP-MS (Figura 4.6 E) obteniendo un valor de $95,98 \pm 2,99$ ppm de Au.

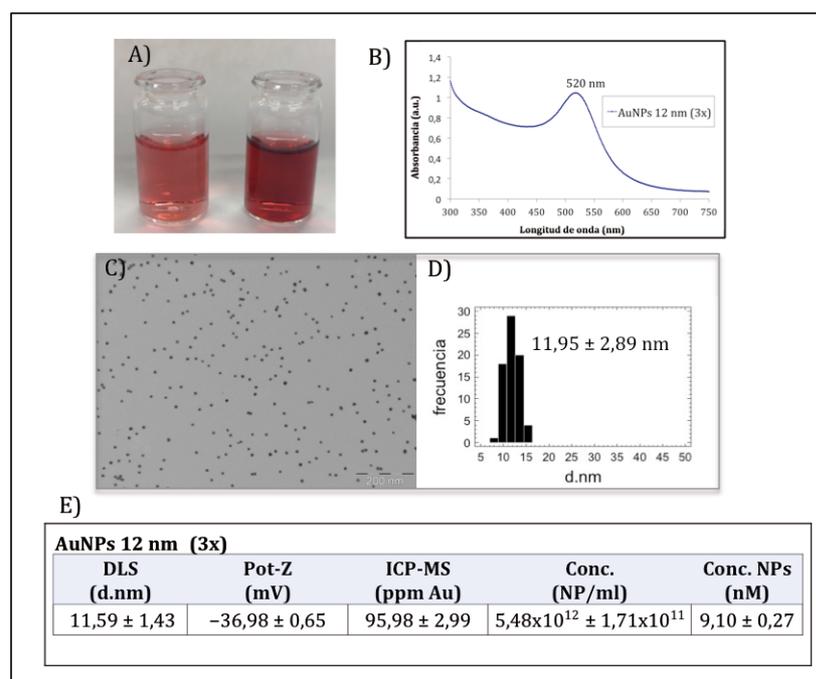


Figura 4.6 Caracterización de las AuNPs 12 nm de síntesis 3x con concentración de Au teórica de 100 ppm. A) Imagen del color de las AuNPs 12 nm con la síntesis 1x (izquierda) y la síntesis 3x (derecha). B) Espectro de UV-Vis de la síntesis 3x de las AuNPs 12 nm. C) Imagen de TEM de la síntesis 3x de AuNPs 12 nm. D) Histograma con el tamaño medio obtenido por TEM. E) Tabla de resultados de DLS, Pot-Z e ICP-MS de la síntesis 3x de AuNPs 12 nm. Resultados de ICP-MS en ppm de Au, concentración de NP/ml y nM.

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

La reproducibilidad de las síntesis, tanto para las AuNPs 12 nm de la síntesis 1x como para la síntesis 3x, se demostró con cuatro lotes diferentes (Tabla 4.2).

	AuNPs 12 nm (1x)			AuNPs 12 nm (3x)		
	DLS (d.nm)	Pot-Z (mV)	ICP-MS (ppm Au)	DLS (d.nm)	Pot-Z (mV)	ICP-MS (ppm Au)
Lote 1	11,59	-38,54	27,10	9,81	-36,76	99,03
Lote 2	11,30	-39,91	25,97	11,64	-37,51	95,89
Lote 3	11,70	-39,53	26,51	13,31	-36,15	93,13
Lote 4	11,64	-37,87	29,67	11,60	-37,50	95,88
Media	11,56	-38,96	27,31	11,59	-36,98	95,98
Desviación	0,18	0,93	1,63	1,43	0,65	2,99

Tabla 4.2 Resumen de los diferentes lotes de síntesis 1x y 3x de AuNPs 12 nm. La tabla recoge los datos de DLS, Pot-Z e ICP-MS como técnicas más características de análisis de la reproducibilidad de las AuNPs.

4.1.2.2. Escalabilidad de AuNPs 4 nm

Como se ha descrito en la síntesis de AuNPs 4 nm (Apartado 3.2.1.2), se consiguió aumentar hasta 250 veces su volumen, obteniendo de esta manera una síntesis de hasta 5000 ml. La reproducibilidad se demostró con cuatro lotes diferentes (Tabla 4.3).

	AuNPs 4 nm		
	DLS (d.nm)	Pot-Z (mV)	ICP-MS (ppm Au)
Lote 1	3,75	-23,87	43,83
Lote 2	4,01	-22,78	44,50
Lote 3	4,23	-23,40	44,55
Lote 4	5,18	-23,88	48,00
Media	4,29	-23,48	45,22
Desviación	0,62	0,52	1,88

Tabla 4.3 Resumen de los diferentes lotes de AuNPs 4 nm. La tabla recoge los datos de DLS, Pot-Z e ICP-MS como técnicas más comunes para el análisis de la reproducibilidad de las AuNPs.

4.1.3. Esterilización y estabilidad de las AuNPs

En la Figura 4.7 se puede comparar las diferencias de color de las siguientes soluciones: AuNPs 12 nm de color rojo, AuNPs 4 nm de color anaranjado y AuNPs agregadas de color azul-negro.

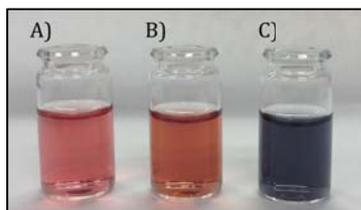


Figura 4.7 Imagen de AuNPs. A) AuNPs 12 nm; B) AuNPs 4 nm y C) AuNPs agregadas.

4.1.3.1. Esterilización mediante filtración con filtros de PES 0,22 μm

En la Figura 4.8 se observan las AuNPs antes de pasar por el filtro (a la izquierda); el filtro, donde se pudo apreciar el color que produjeron las AuNPs adheridas al PES; y las AuNPs después de pasar por el filtro (derecha), donde se vio que el color disminuyó o incluso desapareció al haberse quedado las NPs enganchadas en el filtro. La adhesión de las AuNPs al filtro, sucedió tanto con las AuNPs 12 nm (Figura 4.8 A), como con las AuNPs 4 nm (Figura 4.8 B) y las AuNPs 12 nm que fueron agregadas previamente con cistamina (Figura 4.8 C).

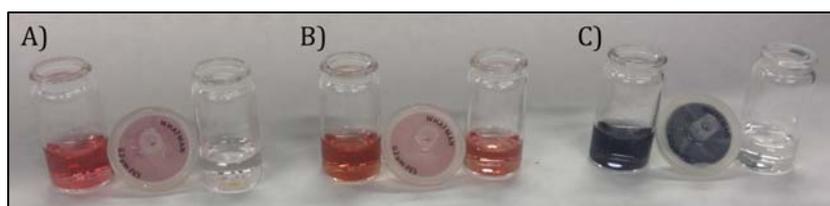


Figura 4.8 Filtración de las AuNPs para su esterilización. A) Imagen de AuNPs 12 nm antes y después de ser filtrada por un filtro estéril de 0,2 μm PES. B) Imagen de AuNP 4 nm antes y después de ser filtrada por un filtro estéril de 0,2 μm PES. C) Imagen de AuNPs agregadas antes y después de ser filtrada por un filtro estéril de 0,2 μm PES.

4.1.3.2. Esterilización mediante autoclavado

En la Figura 4.9 se muestra la imagen de las AuNPs 12 nm (izquierda) y 4 nm (derecha) sin autoclavar (Figura 4.9 A) y a continuación autoclavadas (Figura 4.9 B). No se observaron diferencias visuales significativas.

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

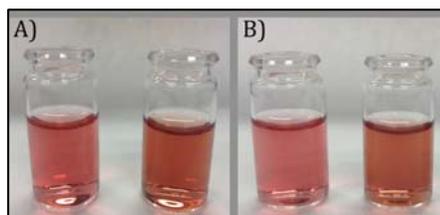


Figura 4.9 Imagen de las soluciones AuNPs esterilizadas con autoclave. A) Imagen de AuNPs 12 nm (izquierda) y AuNPs 4 nm (derecha) no autoclavadas; B) imagen de las AuNPs 12 nm (izquierda) y AuNPs 4 nm (derecha) autoclavadas.

Al no ver diferencias visuales como en el apartado anterior (Apartado 4.1.3.1), fue necesario utilizar técnicas de caracterización físico-químicas más precisas para conocer la estabilidad de las AuNPs después de utilizar el método de autoclavado para esterilizar las AuNPs.

Se realizaron las medidas correspondientes por UV-Vis tanto a las AuNPs 12 nm (Figura 4.10 A) como a las AuNPs 4 nm (Figura 4.10 B) autoclavadas y sin autoclavar, y no mostraron diferencias en sus SPR correspondientes.

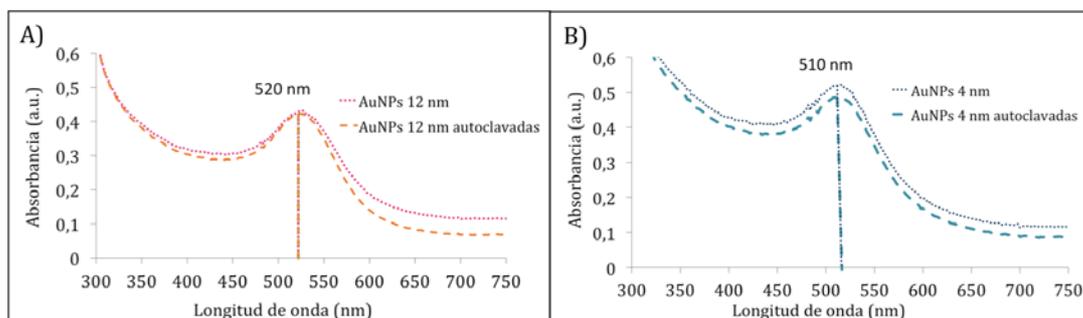


Figura 4.10 Caracterización por espectroscopía de UV-Vis del efecto de la esterilización por autoclave en AuNPs 12 nm y AuNPs 4 nm. A) Espectro de absorbancia de AuNPs 12 nm autoclavadas y no autoclavadas. B) Espectro de absorbancia de AuNPs 4 nm autoclavadas y no autoclavadas.

Las imágenes obtenidas por TEM y el histograma mostraron que las AuNPs 12 nm eran monodispersas y presentaban un tamaño de $12,24 \pm 2,27$ nm (Figura 4.11 B). El resultado de monodispersidad también se vio en las AuNPs 4 nm con un tamaño de $5,81 \pm 2,35$ nm de diámetro (Figura 4.11 D).

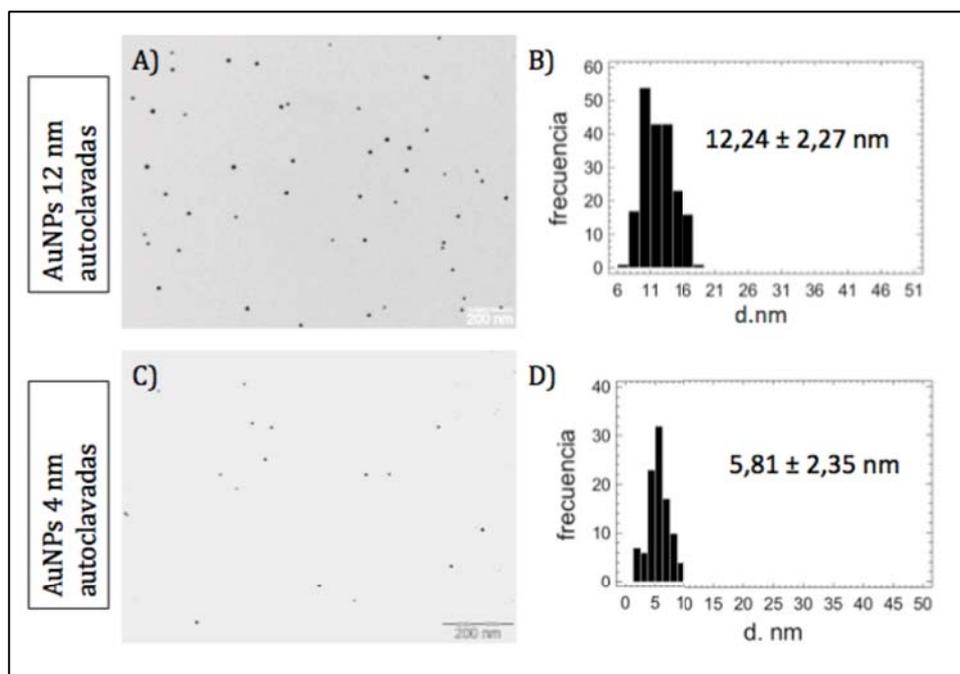


Figura 4.11 Estudio por TEM del efecto del autoclavado en AuNPs 12 nm y AuNPs 4 nm. A) Imagen del TEM de AuNPs 12 nm autoclavadas. B) Histograma de las imágenes de AuNPs 12 nm. C) Imagen de TEM de AuNPs 4 nm autoclavadas. D) Histograma del análisis AuNPs 4 nm.

Los resultados obtenidos por análisis DLS (Tabla 4.4) mostraron un valor del diámetro hidrodinámico de $11,59 \pm 1,43$ nm para las AuNPs 12 nm y de $4,73 \pm 0,89$ nm para las AuNPs 4 nm.

DLS (d.nm)	
AuNPs 12 nm autoclavadas	$11,59 \pm 1,43$
AuNPs 4 nm autoclavadas	$4,73 \pm 0,89$

Tabla 4.4 Caracterización mediante DLS de las AuNPs 12 nm y 4 nm autoclavadas. Análisis en número del radio hidrodinámico de las NPs.

El Pot-Z de las síntesis de AuNPs 12 nm y 4 nm autoclavadas (Tabla 4.5) dieron valores estables de las NPs.

Pot-Z (mV)	
AuNPs 12 nm autoclavadas	$-37,23 \pm 1,67$
AuNPs 4 nm autoclavadas	$-24,46 \pm 2,31$

Tabla 4.5 Caracterización de las AuNPs 12 nm y 4 nm autoclavadas mediante Pot-Z. Análisis de la carga superficial de las NPs.

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Los valores resultantes del análisis de ICP-MS (Tabla 4.6) fueron:

ICP-MS	Conc. Au ppm	Conc. NP /ml	Conc. NPs nM
AuNPs 12 nm autoclavadas	28,62 ± 1,48	1,63x10 ¹² ± 8,46x10 ¹⁰	2,71 ± 0,14
AuNPs 4 nm autoclavadas	46,74 ± 1,43	1,14x10 ¹³ ± 3,51x10 ¹¹	19,18 ± 0,59

Tabla 4.6 Caracterización de las AuNPs 12 nm y 4 nm autoclavadas mediante ICP-MS. Resultados de las ppm de Au, concentración NP/ml y concentración de NPs en nM.

4.1.4. Tabla resumen

A continuación se muestra una tabla resumen del apartado 4.1, cuyo objetivo ha sido la caracterización de las AuNPs.

	AuNP 12 nm 1x	AuNP 12 nm 3x	AuNP 12 nm 1x autoclavadas	AuNP 4 nm	AuNP 4 nm autoclavadas
UV-Vis (nm)	520	520	520	510	510
TEM (d.nm)	11,08 ± 2,64	11,95 ± 2,89	12,24 ± 2,27	4,11 ± 1,28	5,81 ± 2,35
DLS (d.nm)	11,56 ± 0,18	11,59 ± 1,43	11,70 ± 0,10	4,29 ± 0,62	4,73 ± 0,89
Pot-Z (mV)	-38,96 ± 0,93	-36,98 ± 0,65	-37,23 ± 1,67	-23,48 ± 0,52	-24,46 ± 2,31
ICP-MS (ppm Au)	27,31 ± 1,63	95,98 ± 2,99	28,62 ± 1,48	45,22 ± 1,88	46,74 ± 1,43
Conc. (NP/ml)	1,56x10 ¹² ± 9,31x10 ¹⁰	5,48x10 ¹² ± 1,71x10 ¹¹	1,63x10 ¹² ± 8,46x10 ¹⁰	1,11x10 ¹³ ± 4,64x10 ¹¹	1,14x10 ¹³ ± 3,51x10 ¹¹
Conc. NPs	2,59 ± 0,15	9,10 ± 0,27	2,71 ± 0,14	18,56 ± 0,77	19,18 ± 0,59

Tabla 4.7 Tabla resumen de las AUNP. La tabla recoge los datos de UV-Vis, TEM, DLS, Pot-Z, ICP-MS, concentración (NP/ml) y molaridad (nM) de las AuNPs de 12 nm 1x, 12 nm 3x, 12 nm autoclavadas y 4 nm, 4 nm autoclavadas.

4.1.5. Discusión

4.1.5.1. Elección de las AuNPs

Las AuNPs esféricas presentan características químicas, físicas y biológicas intrínsecas a su tamaño nanométrico. Además, su síntesis es reproducible, escalable y rápida. Estas propiedades fueron decisivas a la hora de escoger el portador para el sistema, ya que además de las ventajas físico-químicas y biológicas, es imprescindible que la producción pueda ser escalable a nivel industrial.

Entre las principales características químicas de las AuNPs, destaca relativamente la fácil funcionalización superficial. Generalmente, se funcionalizan mediante enlaces tiol, pero también muestran una gran afinidad por grupos amino, fosfito y bisulfito. También el tamaño físico de la NP es importante ya que permite la circulación por el torrente sanguíneo y los sistemas capilares sin obstruirlos. Además, las AuNPs son las principales candidatas para aplicaciones médicas debido a que son biocompatibles y no tóxicas (Connor et al., 2005).

El agente reductor es un ingrediente clave en la síntesis. Es el principal responsable del tamaño de las NPs, debido a que controla la relación nucleación-crecimiento. El uso de agentes reductores fuertes promueve la nucleación frente del crecimiento. Sin embargo, deben cumplir unos requisitos: i) su estabilidad en agua, ii) su potencial de reducción y iii) su no-interferencia con subproductos de la reacción, por lo tanto, sólo ciertos agentes reductores son capaces de realizar la producción de AuNPs solubles en agua. En esta tesis se escogió el citrato trisódico (Na_3Ct) y el borohidruro de sodio (NaBH_4), ya que el uso de estos reductores y la sal HAuCl_4 permiten la síntesis de AuNPs solubles en agua, biocompatibles y de fácil funcionalización.

El mecanismo general para la estabilización de materiales coloidales en agua fue descrito en la teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Derjaguin et al., 1941; Verwey et al., 1947). Las NPs coloidales tienen una tendencia inherente a la agregación y formación de aglomerados debido a las interacciones de Van der Waals (VdW). Para estabilizar las partículas en frente de estas fuerzas de atracción, es necesario introducir una fuerza interparticular repulsiva, ya sea electrostática o estérica (Figura 4.12). La estabilización electrostática implica la repulsión colombiana entre partículas debido a la doble capa eléctrica formada por los iones adsorbidos en la superficie de la partícula (p.ej. citrato trisódico) y los contraiones correspondientes. Esta estabilización es eficaz en un medio que presente una constante dieléctrica alta como es el agua. En la estabilización estérica, una capa bastante gruesa de moléculas conjugadas en la superficie de las NPs actúan como barrera para la integración de la partícula, asegurando la estabilidad del fluido. Es importante indicar que la estabilización estérica es siempre preferible a la electrostática debido a que la primera proporciona NPs estables en un amplio espectro de fuerzas iónicas.

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

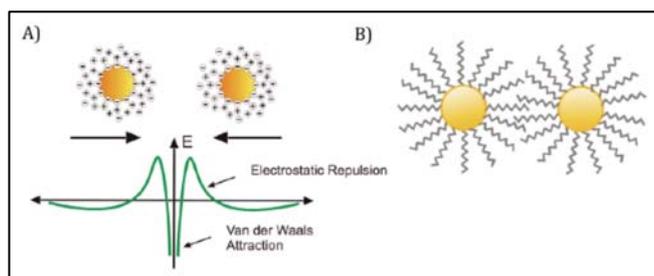


Figura 4.12 Representación de la estabilidad de las AuNPs. A) Representación de la repulsión electrostática entre NPs. B) Representación de la repulsión estérica entre NPs.

Por los motivos expuestos sobre la síntesis y características de este tipo de NPs, se escogieron las AuNPs esféricas como las idóneas para generar el sistema de liberación de fármacos controlados (EDS).

4.1.5.2. Caracterización de las AuNPs

El UV-Vis realizado a las AuNPs 12 nm (Figura 4.1) con un máximo del SPR a 520 nm se corroboró con la longitud de onda descrita en la bibliografía (Klar et al., 1998; Link et al., 1999). También la síntesis de AuNPs 4 nm (Figura 4.2) está descrita que su máximo de SPR es de 510 nm. Tanto para las AuNPs de 12 nm y 4 nm se realizaron diluciones $\frac{1}{2}$ con el objetivo de verificar y normalizar un método cuantitativo de análisis de concentración de AuNP descrito por Hais (Hais et al., 2007). Efectivamente, las intensidades en el gráfico de absorbancia son proporcionales a las concentraciones de las AuNPs y además, los máximos de SPR se mantienen constantes, indicando que no ha habido cambios en las AuNPs al ser diluidas (Figura 4.1; Figura 4.2).

Un método más visual de comprobar el tamaño y la dispersidad de las NPs fue la utilización del TEM para obtener imágenes y analizarlas mediante software especializado (Apartados 3.2.7.2 y 3.2.7.3). Las imágenes obtenidas de las AuNPs de 12 nm y 4 nm (Figura 4.3 A, B y D) revelaron imágenes de las AuNPs monodispersas, esféricas y no aglomeradas. Las AuNPs 12 nm además del TEM, también se analizaron por HR-TEM, viendo algunos de los planos tridimensionales de las formas decaédricas descritas para las AuNPs (Aiken et al., 1999; Jadzinsky et al., 2007). El análisis informático de los valores numéricos de los diámetros de las NPs (Figura 4.3 C y E) dieron una media de $11,08 \pm 2,64$ nm para las AuNPs 12 nm y un valor de $4,11 \pm 1,28$ nm para AuNPs 4 nm, confirmando los diámetros esperados.

El tamaño del diámetro experimental de las AuNPs también se confirmó mediante el análisis por DLS (Figura 4.4), siendo los valores obtenidos para las AuNPs 12 nm de $11,56 \pm 0,18$ nm y las AuNPs 4 nm de $4,29 \pm 0,62$ nm. La comparativa de los valores por TEM (Figura 4.3) y DLS (Figura 4.4) de los diámetros son muy similares, siendo la diferencia de diámetro más elevada de 0,4 nm (en las AuNPs 12 nm).

El Pot-Z realizado a las AuNPs mostró una carga superficial negativa tanto para las AuNPs 12 nm como para las AuNPs 4 nm (Figura 4.5). Las AuNPs 12 nm dieron un valor de $-38,96 \pm 0,93$ mV, más negativo que las de AuNPs 4 nm con un valor de $-23,48 \pm 0,52$ mV. Las AuNPs 12 nm serían más estables electrostáticamente por tener un valor de Pot-Z < -30 mV (www.malvern.com).

Finalmente, la última técnica empleada para caracterizar las síntesis de las AuNPs fue el ICP-MS obteniendo la concentración de Au en solución (Tabla 4.1) y donde los valores obtenidos serán muy relevantes a la hora de igualar soluciones y poder controlar el sistema mediante el seguimiento de estas concentraciones. La concentración de AuNPs 4 nm ($45,22 \pm 1,88$ ppm Au) fue más elevada que para las AuNPs 12 nm ($27,31 \pm 1,63$ ppm Au) debido a la diferencia de concentración de la sal de oro añadida para la síntesis.

La completa caracterización nos confirma que la síntesis puesta a punto, produce unas AuNPs esféricas estables en agua, con un tamaños y cargas determinadas, bien definidas y reproducibles.

4.1.5.3. Escalabilidad de las AuNPs

Dado que la finalidad de este proyecto es poder producir un sistema de liberación de fármacos antitumorales, es imprescindible, dada la envergadura, que la producción sea estable y escalable a grandes cantidades.

La síntesis de las AuNPs 12 nm a una concentración elevada (3x), mostró un color de solución más intenso que las AuNPs 12 nm 1x (Figura 4.6. A). La intensidad de absorbancia del espectro UV-Vis fue mayor para la síntesis 3x (Figura 4.6 B) que para la 1x (Figura 4.1) y en las imágenes del TEM (Figura 4.6 C) se mostraron NPs monodispersas pero con mayor concentración por mm² de superficie que las AuNPs

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

12 nm 1x (Figura 4.3 A). Finalmente, fue decisiva la confirmación del aumento de concentración en 3,5 veces para las AuNPs 12 nm 3x mediante ICP-MS (Figura 4.6 E) (esta diferencia viene dada por la evaporación de agua en el proceso de síntesis).

Además, también se confirmó cualitativamente que el aumento de la concentración no afectó al tamaño de las NPs, mostrando mediante absorción por UV-Vis que la longitud de onda del SPR de las AuNPs 12 nm 3X (Figura 4.6 B) se mantiene como en AuNPs 12 nm 1x (Figura 4.1). Cuantitativamente, tanto el histograma obtenido de los valores analizados del TEM para AuNPs 3x (Figura 4.6 D) como el DLS de AuNPs 12 nm 3x (Figura 4.6 E), comparados con sus análogos 1x (Figura 4.3 C y Figura 4.4), confirman de forma cuantitativa que el diámetro de partícula se mantiene constante ($11,59 \pm 1,43$ nm) al aumentar 3,5 veces la concentración de AuNPs. Los Pot-Z, solo se diferencian de 2 mV entre las AuNPs 12 nm 3x (Figura 4.6 E) y 1X (Figura 4.5) manteniendo valores de estabilidad (Pot-Z < -30 mV).

Los resultados recogidos en las tablas resumen de los diferentes lotes de las AuNPs 12 nm 1x, 3x (Tabla 4.2) y AuNPs 4 nm (Tabla 4.3) confirman la alta reproducibilidad de las síntesis realizadas; siendo los valores de DLS, Pot-Z y ICP-MS muy similares entre lotes.

4.1.5.4. Esterilización y estabilidad de las AuNPs

Una vez se controló la síntesis, escalabilidad y reproducibilidad, se estudió el proceso de esterilización de las AuNPs para poder testarlas en experimentos *in vitro* i/o *in vivo*. Este punto es crítico ya que las diferentes técnicas de esterilización pueden producir agregación a las NPs o modificar características. El objetivo era encontrar un método de esterilización que no alterase el producto ni produjera agregación.

El método visual, además de las técnicas de caracterización físico-químicas empleadas en esta tesis, es un buen indicador de la alteración de las NPs (Figura 4.7). La agregación visualmente se observa en el cambio de color rojo a azul y después a negro, e incluso pueden llegar a verse precipitados (Apyari et al., 2012; Lee et al., 2008).

La esterilización mediante filtros PES 0,2 μm no fue posible para las AuNPs. Las AuNPs 12 nm al ser filtradas se quedaron en el filtro y se recogió una solución transparente (Figura 4.8 A). Se quedaron en el filtro por afinidad al material, ya que el tamaño de los filtros es mucho mayor que el de las NPs. Del mismo modo se comportaron las AuNPs 4 nm (Figura 4.8 B) quedándose enganchadas al filtro pero con la diferencia de que la solución obtenida después de filtrar fue de color rosa claro, indicando que no todas las AuNPs 4 nm se habían quedado en el filtro. En este caso debido al pequeño tamaño de las AuNPs, y a la mayor concentración de NP/ml (Tabla 4.1), existe más superficie activa que contacta con el filtro y satura la superficie del mismo, dejando pasar al resto de NPs. Cuando las AuNPs están agregadas (visualmente color azul (Figura 4.8 C)) y son filtradas, se quedan en el filtro, no por afinidad con el PES sino por el tamaño de los agregados.

Al no haber funcionado la esterilización por filtración, se utilizó el autoclave. Visualmente las AuNPs 12 nm y 4 nm no dieron diferencias en el color de la solución antes y después de ser autoclavadas (Figura 4.9) y fue necesario utilizar técnicas de caracterización físico-químicas no visuales para comprobar si el autoclave había cambiado alguna propiedad de las AuNPs. El UV-Vis realizado a las AuNPs 12 nm y 4 nm antes y después de ser autoclavadas no mostró diferencia en el máximo del SPR, confirmando que el tamaño y la estructura no había cambiado (Figura 4.10). El TEM confirmó que las AuNPs 12 nm y 4 nm (Figura 4.11 A y C) se mantuvieron monodispersas después del autoclavado y los histogramas revelaron que el tamaño de las AuNPs 12 nm y 4 nm no habían aumentado (Figura 4.11 B y D). También los valores del DLS revelaron valores constantes en los diámetros hidrodinámicos de las AuNPs después del autoclavado (Tabla 4.4) y el Pot-Z tampoco reveló diferencias en las cargas superficiales de las AuNPs autoclavadas (Tabla 4.5). Finalmente se realizó una cuantificación de Au donde no se observaron valores de concentración diferentes (Tabla 4.6).

Tras obtener estos resultados, quedó así confirmada la técnica de autoclave como técnica de esterilización de las AuNPs 12 nm y 4 nm, necesaria en los casos en que ha transcurrido un tiempo desde de la síntesis de NPs para bajar la carga bacteriana antes de seguir con la conjugación del sistema EDS completo.

4.2. Ácido hialurónico

4.2.1. Caracterización de la tiolación de HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa

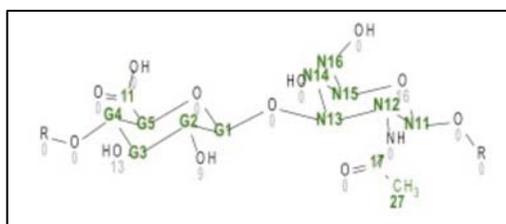
Para conocer el estado físico-químico de la modificación del HA (Figura 3.4), se realizaron análisis de caracterización estructurales, físicos y químicos:

- RMN
- AEO
- FT-IR
- DLS
- Pot-Z
- AFM

4.2.1.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

4.2.1.1.1. RMN HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa

La asignación estructural de las señales de los espectros de RMN para HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1) y HA 8-15 kDa (Anexo Figura 7.2) no modificados se efectuaron mediante los espectros de ^1H , ^{13}C y 2D (zTocsy y HSQC). Para facilitar la asignación, se ha anotado cada átomo de la molécula con un número (Figura 4.13).



con los espectros del HA no modificado (HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1) y HA 8-15 kDa (Anexo Figura 7.2), respectivamente).

En el análisis y comparación de los espectros de ^{13}C de los HA modificados (Anexo Figura 7.3 A y Figura 7.4 A) respecto al HA no modificado (Anexo Figura 7.1 A y Figura 7.2 A) se observaron que las señales más afectadas correspondían a las unidades de glucurónico (en el carbonilo y G5), mientras que la glucosamina (el carbono anomérico N1) se vio afectada en menor extensión (Tabla 4.8).

	Anotación	HA 30-50 kDa	HASH 30-50 kDa	Delta	HA 8-15 kDa	HASH 8-15 kDa	Delta
1	CONH, 17	177,70	177,63	0,14	177,77	177,62	0,15
2	COOH, 11	176,98	174,09	2,89	176,99	174,27	2,72
3	G1	106,02	105,78	0,24	106,01	105,79	0,22
4	N11	103,36	104,05	-0,69	103,37	104,05	-0,68
5	N13	85,40	85,27	0,13	85,38	85,26	0,12
6	G4	82,78	83,02	-0,24	82,78	82,98	-0,20
7	G5	79,17	76,35	2,82	79,17	76,53	2,64
8	N15	78,21	78,27	-0,06	78,22	78,27	-0,05
9	G3	76,41	76,57	-0,16	76,41	76,36	0,05
10	G2	75,33	74,99	0,34	75,33	75,00	0,33
11	N14	71,27	71,10	0,17	71,28	71,11	0,17
12	CH ₂ , N16	63,37	63,41	-0,04	63,37	63,40	-0,03
13	N ₂ , N12	57,15	57,25	-0,10	57,16	57,25	-0,09
14	CH ₃ , 27	25,35	25,30	0,05	25,36	25,30	0,06

Tabla 4.8 Tabla comparativa de la diferencia entre señales del HA (30-50 kDa y 8-15 kDa) modificado y no modificado, analizado por ^{13}C RMN.

Los cambios en el perfil de los espectros de ^1H de los HA modificados (Anexo Figura 7.3 B y Figura 7.4 B) tanto para el 30-50 kDa como para el 8-15 kDa se observaron en la zona de 3,5-3,7 ppm y en la zona 2,9-2,8 ppm respecto al HA no modificado (Anexo Figura 7.1 B y Figura 7.2 B).

Con respecto a los espectros 2D del HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.4 C, D) no se observaron correlaciones entre la estructura del HA y su modificación pero sí en los espectros 2D del HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 C, D, E, F).

4.2 ÁCIDO HIALURÓNICO

El espectro de HSQC del HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 E) determinó la posición de los dos CH₂ (3,29/52,99 y 2,87/23,89 ppm) del fragmento NCH₂CH₂SH. Según el Cosy (Anexo Figura 7.3 C) y el Tocsy (Anexo Figura 7.3 D) ambas señales están acopladas entre sí y no tienen ninguna otra relación adicional. Sin embargo, en el resultado del HMBC (Anexo Figura 7.3 F), se detectó la conexión del HA con los -CH₂- de la cistamina y se han marcado con un círculo las señales en el espectro.

En la comparación de los HSQC entre el HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 E) y HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1 D) se pudieron ver los cambios que se producen en el espectro de protón (Figura 4.14).

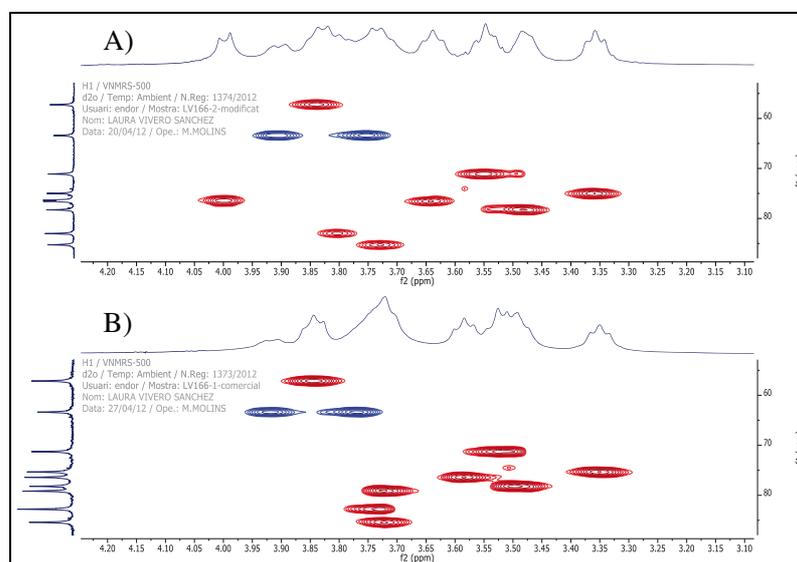


Figura 4.14 Comparación del HASH 30-50 kDa y HA 30-50 kDa por HSQC.
A) Espectro de HSQC (500 MHz, D₂O) del HASH 30-50 kDa. B) HSQC (500 MHz, D₂O) del HA 30-50 kDa.

4.2.1.2. Estudio del carácter anfipático del HASH 30-50 kDa

El HA 30-50 kDa resultó ser insoluble en DMSO-d₆, por el contrario el HASH 30-50 kDa es soluble en DMSO-d₆. Al comparar los espectros de ¹H HASH 30-50 kDa adquiridos en D₂O (Figura 4.15 A) y DMSO (Figura 4.15 B) se observaron diferencias significativas. Los cambios correspondieron a la modificación de algunos desplazamientos químicos y también a la anchura de las señales.

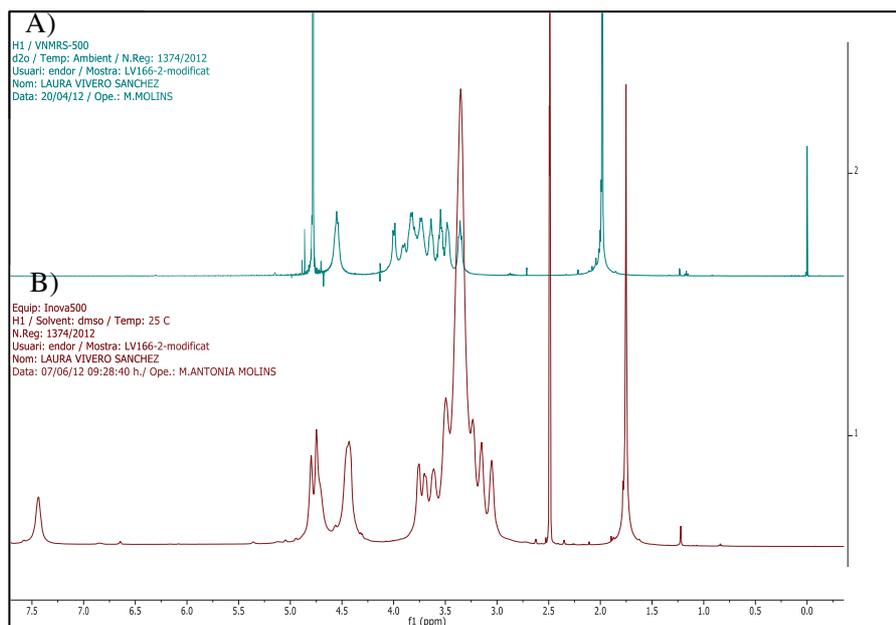


Figura 4.15 Estudio anfipático de HASH 30-50 kDa. A) Espectro de ^1H (500 MHz, D_2O). B) Espectro de ^1H (500 MHz, DMSO).

4.2.1.3. Estudio de la tiolación mediante sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico

Se analizó por RMN la modificación del grupo aromático de la sal sódica del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico cuando el Hg se enlaza al -SH del HASH 30-50 kDa. Como muestran los espectros (Figura 4.16 B y C), las señales del sistema aromático del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico tienen una intensidad muy pequeña en comparación con las diferentes señales del HA. En este caso, la integración de las señales del ácido 4-(hidroximercurico)benzoico con el complejo del HASH 30-50 kDa-complejo de mercurio benzoico, dio como resultado una eficacia de la reacción de 0,26%. Para el HASH 8-15 kDa la integración del $-\text{CH}_3$ (HASH) y el aromático (del derivado de mercurio) dio un valor del 0,5% de tiolación.

4.2 ÁCIDO HIALURÓNICO

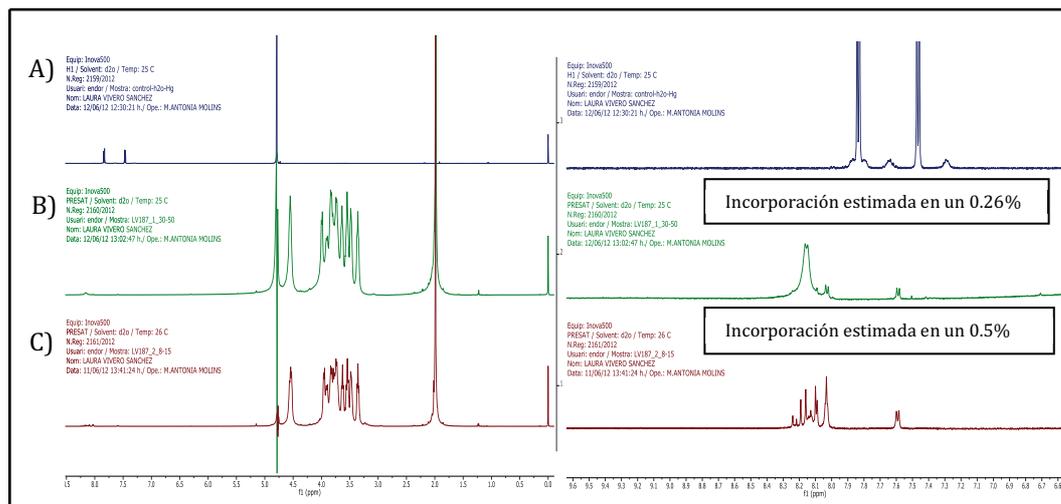


Figura 4.16 Estudio de la tiolación mediante conjugación con ácido 4-(hidroximercurico)benzoico. A) Espectro ^1H de sal sódica 4-(hidroximercurico)benzoico (500 MHz, D_2O). B) Espectro ^1H del HASH 30-50 kDa conjugado a sal sódica 4-(hidroximercurico)benzoico (500 MHz, D_2O). C) Espectro ^1H del HASH 8-15 kDa conjugado a sal sódica 4-(hidroximercurico)benzoico (500 MHz, D_2O).

4.2.1.4. Análisis elemental orgánico (AEO)

Se realizó un AEO del HASH 30-50 kDa y del 8-15 kDa. Para realizar los cálculos de este análisis, se tuvo en cuenta que el % teórico de S para una molécula de 40 kDa (tamaño medio para la molécula HASH 30-50 kDa) que contiene un tiol terminal es de 0,08%. El resultado experimental fue de un 0,07% (Tabla 4.9). Para el HA de 11,5 kDa (tamaño medio de 8-15 kDa) el valor teórico del %S es de 0,28%, sin embargo el resultado experimental fue de un 0,18% (Tabla 4.9).

	HASH 30-50 kDa			HASH 8-15 kDa		
	%C en HA	% N en HA	%S en HA	%C en HA	% N en HA	%S en HA
Experimental	39,43	3,47	0,07	40,50	3,59	0,18
Teórico	44,62	3,75	0,08	44,70	3,83	0,28
Rendimiento			82,50			78,26

Tabla 4.9 Resultado por AEO de la tiolación a través del porcentaje de S en la muestra HASH 30-50 kDa y HASH 8-15 kDa. Se obtuvo el porcentaje de C, N y S en la muestra.

4.2.1.5. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizaron análisis comparativos FT-IR entre el HA 30-50 kDa y el HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.5) y el HA 8-15 kDa con su correspondiente espectro del HA

modificado HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.6). La asignación de señales en los espectros viene determinada por los valores de cada grupo funcional numerados en la Tabla 7.1.

4.2.1.6. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los resultados obtenidos mediante DLS mostraron que en función del disolvente (H₂O o PBS) el diámetro hidrodinámico fue distinto. Se realizaron análisis comparativos entre el HA 30-50 kDa (Figura 4.17 A y C) y HA 8-15 kDa (Figura 4.17 B, C) con los tiolados HASH 30-50 kDa (Figura 4.17 A y C) y HASH 8-15 kDa (Figura 4.17 B y C) respectivamente, en H₂O y PBS, obteniendo la tendencia de que el radio hidrodinámico en agua es mucho mayor que en PBS.

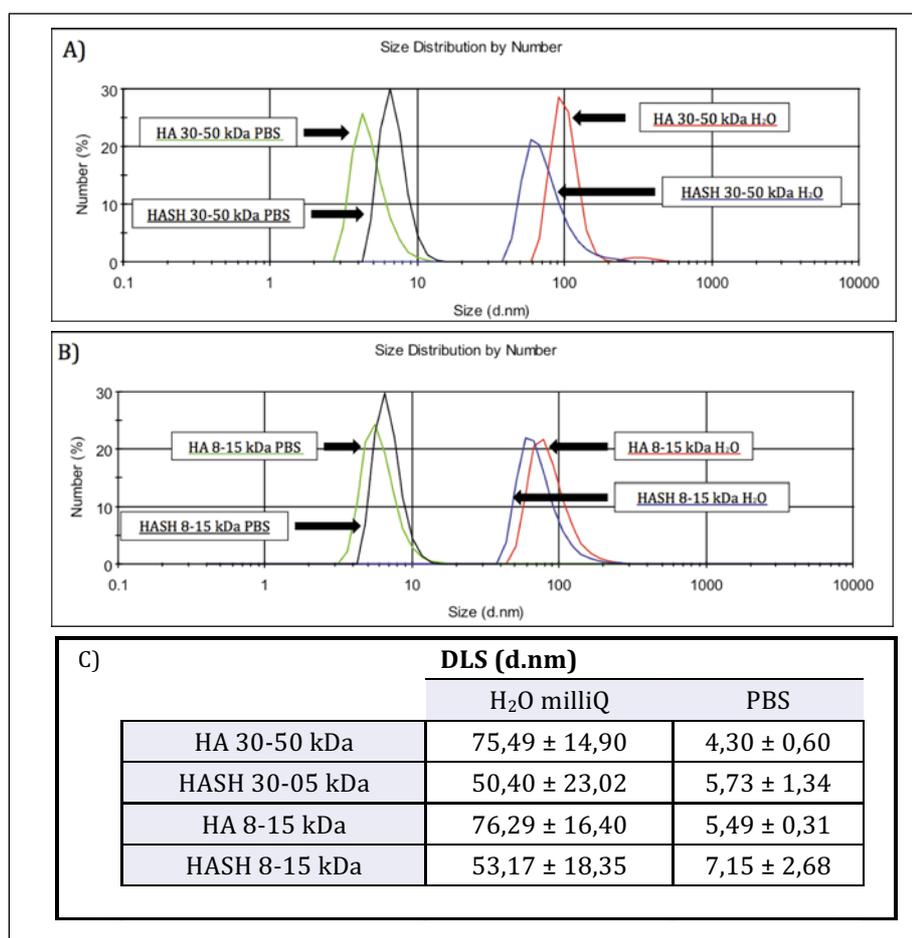


Figura 4.17 Caracterización de la tiolación de HA mediante DLS en H₂O y PBS. A) Gráficos de la distribución en número de HA 30-50 kDa y HASH 30-50 kDa; se analizaron las muestras a 1 mg/ml en H₂O milliQ y en PBS. B) Gráficos del análisis del HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa a 1 mg/ml en H₂O milliQ y en PBS. C) Medidas del pico máximo de la distribución de diámetro de las muestras.

4.2 ÁCIDO HIALURÓNICO

4.2.1.7. Potencial Z (Pot-Z)

Los resultados obtenidos mediante Pot-Z (Figura 4.18) muestran diferencias entre los diferentes disolventes (H₂O y PBS) utilizados y también diferencias entre el HA y HASH. Tanto el PBS como el HA (no modificado por la tiolación) al ser sales, dieron un potencial más elevado.

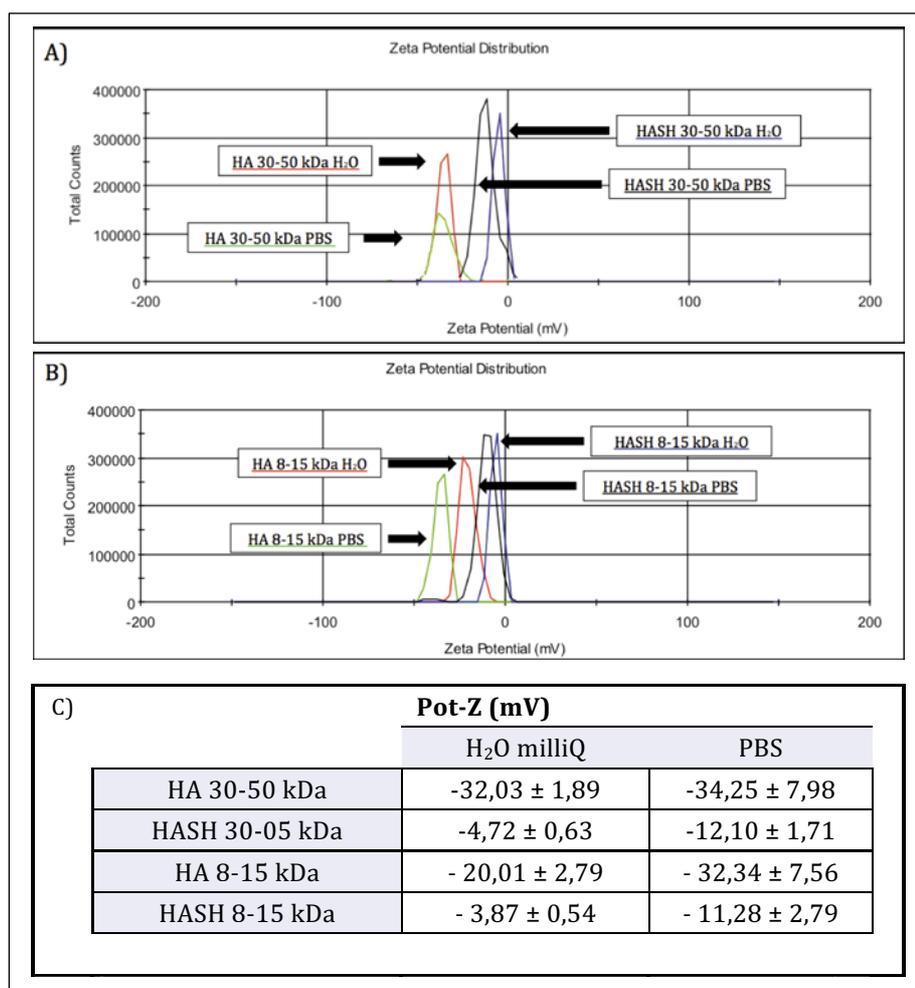


Figura 4.18 Caracterización de la tiolación de HA mediante Pot-Z en H₂O y PBS. Análisis de la repulsión o la atracción electrostática de carga entre partículas. A) Gráfica del análisis de HA 30-50 kDa y HASH 30-50 kDa a 1 mg/ml en H₂O milliQ y en 1 mg/ml de PBS. B) Gráfica del análisis de HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa a 1 mg/ml en H₂O milliQ y en PBS. C) Tabla con los valores medios del pico máximo de la distribución del Pot-Z.

4.2.1.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

En las imágenes de AFM (Figura 4.19 A y B) se observaron estructuras homogéneas y monodispersas sin haber aglomerados. El análisis de la fuerza ejercida por la punta del AFM en el HA 30-50 kDa dio como resultado un diámetro de 60 nm y una altura de 5 nm (Figura 4.19 C).

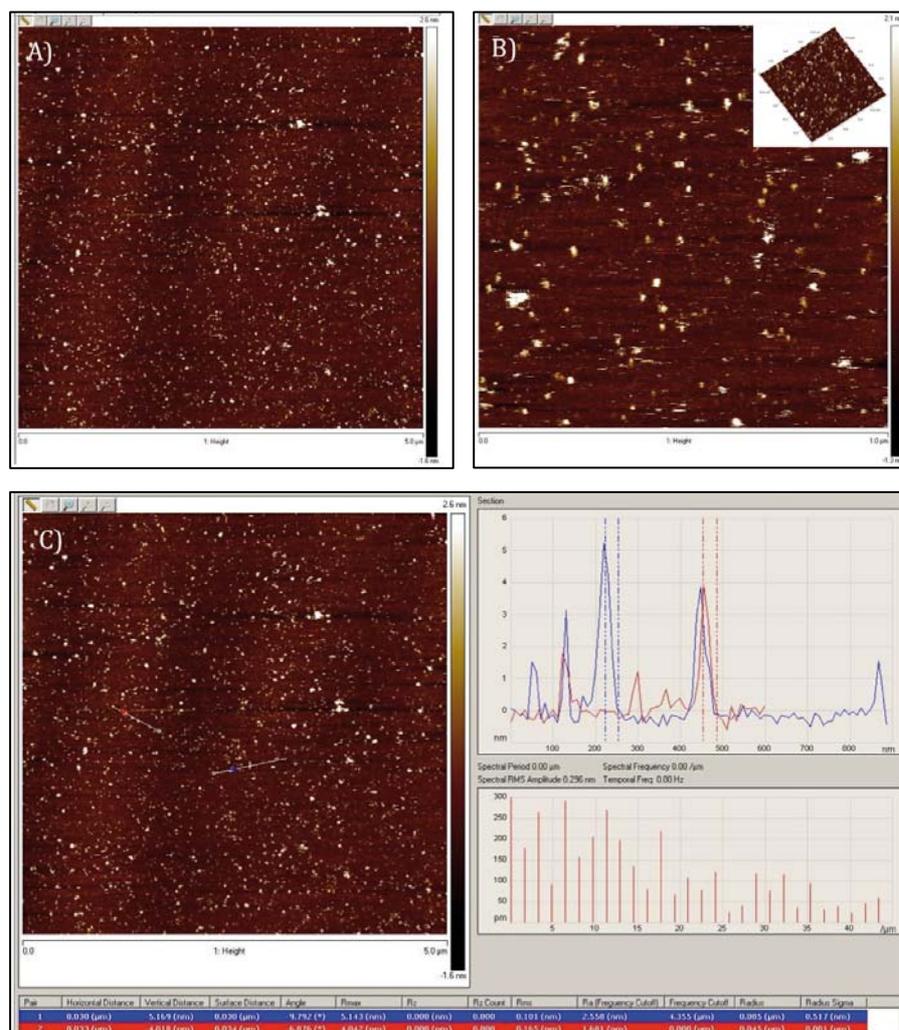


Figura 4.19 Caracterización por AFM del HA 30-50 kDa. A) Imagen captada 5x5 micrones en imagen topográfica. B) Imagen captada 1x1 micrones en imagen topográfica. Inset 3D. C) Imagen captada en 2D.

El análisis de AFM del HASH 30-50 kDa también nos da como resultado de la interpretación de la fuerza ejercida por la punta del AFM un diámetro de partícula de 60 nm y una altura de 5,4 nm (Figura 4.20).

4.2 ÁCIDO HIALURÓNICO

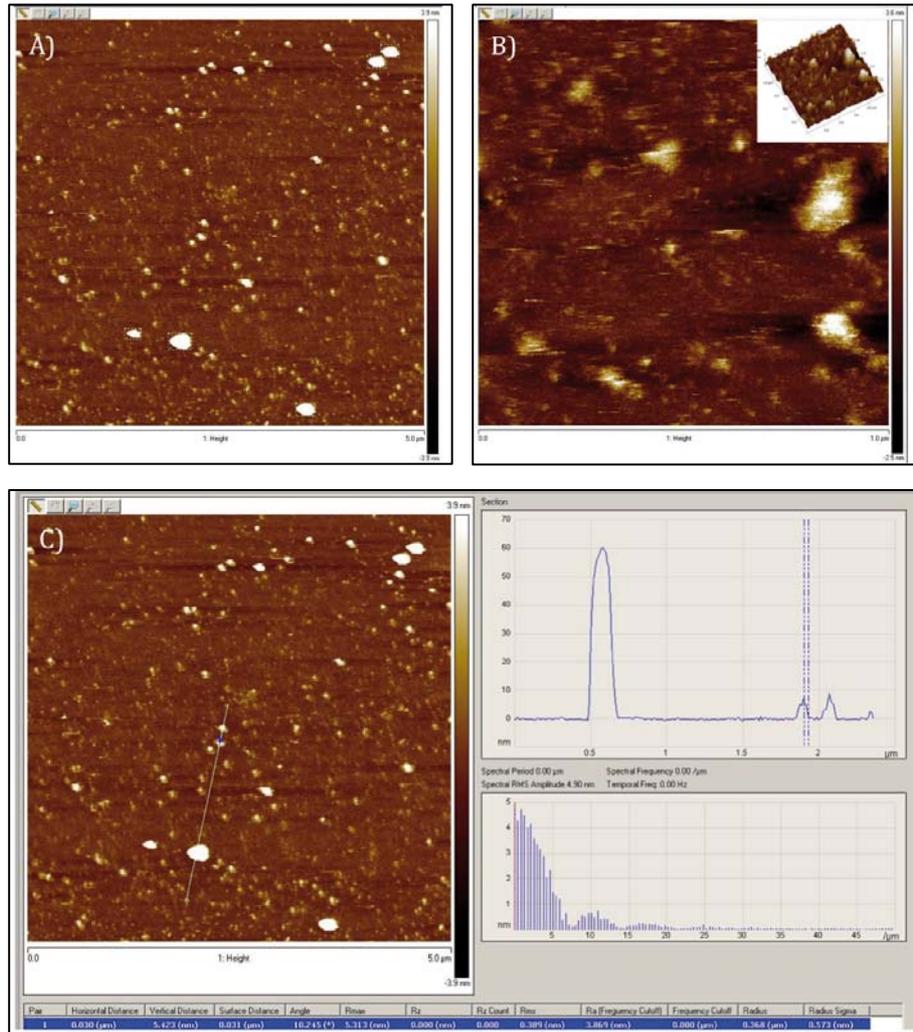


Figura 4.20 Caracterización por AFM del HASH 30-50 kDa. A) Imagen captada 5x5 micrones en imagen topográfica. B) Figura captada 1x1 micrones en imagen topográfica. Inset 3D. C) Imagen captada en 2D.

4.2.2. Esterilidad

Es importante conocer la estabilidad del HA tras ser esterilizado, para posteriormente poderlo utilizar en experimentos *in vitro* e *in vivo*. El HA es estable si se esteriliza mediante filtración de 0,2 μM PES. Sin embargo, al realizarse la esterilización mediante autoclave se obtuvo una solución amarillenta.

4.2.3. Tabla resumen

Se muestra en la Tabla 4.10 el resumen de la caracterización del HA y HASH.

		HA 30-50 kDa	HASH 30-50 kDa	HA 8-15 kDa	HASH 8-15 kDa
RMN			0,26% de S		0,5% de S
AEO			0,07% de S (82,50% R)		0,23% de S (78,26% R)
DLS (d.nm)	H ₂ O	75,49 ± 14,90	50,40 ± 23,02	76,29 ± 16,40	53,17 ± 18,35
	PBS	4,30 ± 0,60	5,73 ± 1,34	5,49 ± 0,31	7,15 ± 2,68
Pot-Z (mV)	H ₂ O	-32,03 ± 1,89	-4,72 ± 0,63	- 20,01 ± 2,79	- 3,87 ± 0,54
	PBS	-34,25 ± 7,98	-12,10 ± 1,71	- 32,34 ± 7,56	- 11,28 ± 2,79
AFM (d.nm/a.nm)		60 (d) / 5(a)	60(d) / 5,4(a)		

Tabla 4.10 *Tabla resumen de la caracterización del HA. La tabla recoge los datos de RMN, AEO, DLS, Pot-Z Y AFM como técnicas más características del análisis del HA y HASH.*

4.2.4. Discusión

4.2.4.1. Elección del HA

La molécula de HA fue escogida por ser reconocida por el receptor CD44 que se sobreexpresa en las células tumorales, tal y como se ha descrito en la introducción de esta tesis. Además, al ser una molécula fisiológica, no presenta toxicidad y es biocompatible.

La función destinada para el HA en el sistema de liberación EDS es la de dirigir los fármacos hacia las células tumorales y en algún caso incorporarlos a su estructura.

La forma de incorporar el HA al sistema EDS es mediante su tiolación para que el grupo funcional -SH se enlace de manera “covalent-like” a las AuNPs (Pensa et al., 2012). Se escogieron tamaños relativamente pequeños en peso molecular de HA debido a la mayor facilidad de modificación sintética y para su posterior creación de un sistema EDS suficientemente pequeño para favorecer su llegada al tumor y ser internalizado por las células.

4.2.4.2. Caracterización del HA

Una vez elegido el HA, los tamaños y la síntesis a seguir para obtener el tiol terminal, se realizaron una serie de experimentos para caracterizar el producto sintetizado.

Estudio de la tiolación del HA

Mediante RMN se obtuvo información estructural de la tiolación y se comprobó en qué grupo funcional del HA se enlazó la cistamina.

Se inició la caracterización mediante RMN ^1H , ^{13}C y 2D (zTocsy y HSQC) del HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1) y HA 8-15 kDa (Anexo Figura 7.2) no modificados, con el objetivo de conocer la molécula y poder realizar comparaciones. Las asignaciones de las señales de la molécula (Figura 4.13) de estos espectros (Anexo Figura 7.1 y Figura 7.2) están de acuerdo con las descritas en la bibliografía (Barbucci et al., 2006; Lago Mendoza et al., 2007; Scott et al., 1984).

Los espectros de las moléculas modificadas HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3) y HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.4), presentaron diferencias respecto a los espectros del HA no modificado (HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1) y HA 8-15 kDa (Anexo Figura 7.2)).

En el análisis y en la comparación de los espectros de ^{13}C tanto para HASH 30-50 kDa como HASH 8-15 kDa se observó que las señales más afectadas correspondían a las unidades de glucurónico y que la glucosamina se vio afectada en mucha menor extensión (Tabla 4.8). En la parte del ácido glucurónico, la parte afectada fue el carbonilo y el G5; y en la glucosamina el carbono anomérico (N1). El cambio en el carbonilo hizo pensar en puentes de hidrógeno, pero las señales tanto del ácido como de la amida tienen una anchura relativamente pequeña (Anexo Figura 7.3 B), lo que a priori descarta la existencia de una asociación en la que intervengan puentes de hidrógeno (Scott et al., 1999). El cambio en el carbono anomérico podría ser debido a la introducción de la cistamina.

En los experimentos de ^1H hubieron cambios en el perfil de los espectros de HA (Anexo Figura 7.1 B y Figura 7.2 B) con sus respectivos tamaños de HASH (Anexo

Figura 7.3 B y Figura 7.4 B) debido a la superposición de los protones anoméricos y a las diferencias de posición de varias señales situadas en la zona de 3,5-3,7 ppm y también en las señales de la zona 2,9-2,8 ppm y con una intensidad sensiblemente menor a las del HA.

El objetivo de realizar experimentos 2D fue la de correlacionar las modificaciones vistas por ^{13}C y ^1H , tanto para HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 A y B) como para HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.4 A y B).

No se observaron correlaciones entre los espectros 2D del HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.4 C y D) pero si en los espectros 2D del HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 C, D, E y F) por esa razón continuamos el estudio con el 30-50 kDa.

Con el espectro de HSQC (Anexo Figura 7.3 E) se determinó la posición de los dos $-\text{CH}_2-$ (3,29/52,99 y 2,87/23,89 ppm) del fragmento $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ de la cistamina. Según el Cosy (Anexo Figura 7.3 C) y el Tocsy (Anexo Figura 7.3 D) ambas señales están acopladas entre sí y no tienen ninguna otra relación adicional. El desplazamiento de 23,89 ppm en ^{13}C (Anexo Figura 7.3 A) es excesivamente bajo para $-\text{NHCH}_2-$. Por lo que no es atribuible la conexión del fragmento de cistamina con el HA.

El HMBC se realizó para comprobar la interconexión entre el HA y el fragmento atribuido a $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$. En el resultado del HMBC se intuye la conexión y se han marcado con un círculo las señales (Anexo Figura 7.3 F). Se intuye la unión entre el HA y el fragmento $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ en 3,29 y 2,87 ppm (Anexo Figura 7.3 B).

En la comparación de los HSQC se puede ver los cambios que se producen en el protón (Figura 4.14).

Estos cambios son muy grandes, igual que los cambios del ^{13}C (carbonilo) como para justificar la integración de la molécula cistamina en el HA. El pH del HA es aproximadamente de 8, mientras que el pH del HASH es aproximadamente de 1. Esta diferencia debe ser la causa principal de la modificación de la conformación y de los grandes cambios en los espectros (Gatej et al., 2005; Maleki et al., 2008). Y solo queda latente la conjugación de la cistamina con el HMBC del HASH 30-50 kDa, y el cambio en el anomérico que es probable que sea debido a la unión de la cistamina.

Carácter anfipático

Las señales del espectro ^1H RMN de HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 B) mostró cambios en el perfil del espectro respecto al ^1H RMN de HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.1 B). Se observó que, aparte de la tiolación, debían haber otros cambios en la molécula, ya que la tiolación se produce en un porcentaje demasiado bajo para producir cambios tan marcados. Se ha descrito un comportamiento similar en un estudio en el que un HA-modificado, al cual se le había incorporado la molécula OSA (Octenil succínico anhidro), tenía carácter anfipático, a diferencia del HA de partida que era hidrófilo (Eenschooten et al., 2010). No obstante, en este caso el HA modificado tenía una elevada densidad de grupos hidrófobos que proporcionaba la incorporación de un 43-49% de OSA.

Se considera que el D_2O es un buen disolvente para los segmentos hidrófilos del HA no modificados y es un mal disolvente para las partes hidrófobas de una posible modificación. Por el contrario el DMSO-d_6 es un buen disolvente para las partes hidrófobas de los HA modificados y peor para los segmentos hidrófilos.

Al comparar los espectros de ^1H HASH 30-50 kDa adquiridos en D_2O y DMSO (Figura 4.15), se observan diferencias significativas similares a las indicadas en el artículo. Los cambios corresponden a la modificación de algunos desplazamientos químicos y también a la anchura de las señales. A diferencia de lo que sucede en el artículo de referencia, el segmento añadido al HA tiene un grado de incorporación de tiol relativamente pequeño (intensidad de las señales situadas sobre 3,30 ppm (Anexo Figura 7.3 B)). No obstante, el hecho de que el HASH 30-50 kDa sea soluble en DMSO-d_6 y D_2O (a diferencia de HA 30-50 kDa que no es soluble en DMSO-d_6), junto con el importante cambio que se observa en los espectros, indican un carácter anfipático del compuesto que se produce tras la tiolación. Además, se observa una señal a 7,5 ppm atribuible al $-\text{NH}-$ de la amida. La estructura terciaria puede estar en la línea de lo que se indica en la bibliografía (Scott et al., 1999).

Cuantificación de la tiolación del HA

Justificando que los cambios grandes en el RMN fueron debidos a cambios estructurales producidos por un cambio de pH y por el carácter anfipático, y que solo vemos pequeños cambios mediante HMBC o en el carbono anomérico en ^{13}C que pueden atribuirse a la tiolación, se recurrió a la conjugación del HA con una sal

aromática de mercurio (Apartado 3.2.3.2 y 3.2.3.4). El Hg tiene afinidad por el azufre del tiol y los grupos aromáticos son muy visibles y característicos en ^1H RMN (Serban et al., 2008).

El resultado de las integraciones de las señales entre el $-\text{CH}_3$ (HASH) y el anillo aromático del derivado de Hg, dieron un valor de tiolación de un 0,26% para el HASH 30-50 kDa y 0,5% para HASH 8-15 kDa (Figura 4.16). Sin embargo, mediante AEO, los valores de la tiolación fueron diferentes, para el HASH 30-50 kDa dio un 0,07% y para el 8-15 kDa un 0,18% (Tabla 4.9). Los valores de RMN son más elevados que para AEO. El % de los elementos por AEO se han extraído mediante las relaciones molares teóricas y experimentales. Como se observa en los resultados, los porcentajes de C y N experimentales no coinciden exactamente con los teóricos, sin embargo, debemos tener en cuenta la humedad de la muestra (que altera el peso real) y también el hecho de que para el cálculo teórico tenemos en cuenta el peso molecular medio, cuando en realidad tenemos un amplio rango de tamaños. Destacar que la cuantificación por RMN es indirecta, mientras que por AEO es directa. Teniendo en cuenta esto y que los valores teóricos se aproximan a los resultados de AEO (en los cuales existe un sesgo debido a la humedad) y no a los obtenidos por RMN mediante la conjugación de la sal de Hg, se considera que los resultados obtenidos por AEO se ajustan más a los esperados.

Caracterización cualitativa del HA

Los experimentos de FT-IR se realizaron con el objetivo de encontrar alguna diferencia en el grupo funcional donde la tiolación tiene lugar. La asignación de bandas del HA coinciden con las descritas en la bibliografía (Anexo Tabla 7.1) (Alkrad et al., 2003) y no se observaron diferencias entre el HA 30-50 kDa y el HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.5) ni entre las bandas obtenidas del HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa (Anexo Figura 7.6). Los cambios en la tiolación son tan pequeños (como se vio mediante RMN y AEO) que no se detectaron mediante FT-IR.

En los tamaños de partícula analizados por DLS sí se observaron diferencias (Figura 4.17). Los resultados mostraron que en H_2O el diámetro de partícula era mayor que en PBS y además, en PBS los valores fueron más constantes y sin haber grandes diferencias entre tamaños ni entre HA y HASH. Está descrito que las sales influyen en la estructura del ácido hialurónico (Mráček et al., 2008). Los iones de la

4.2 ÁCIDO HIALURÓNICO

serie de Hofmeister tienen un efecto significativo en la solubilidad de las sustancias macromoleculares y en la estabilidad de sus respectivas estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. Además, se ha demostrado que iones Mg^{2+} se coordinaron con dos grupos carboxi en la misma cadena de HA en su estructura secundaria y promueven la contracción de la cadena. El PBS contiene Na^+ y K^+ que, siguiendo la serie Hofmeister, influenciarían en la estructura del HA contrayéndola, lo que explicaría que los diámetros hidrodinámicos en PBS disminuyen.

Sin embargo, los cambios en diámetro observados en H_2O de los HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa tenían un diámetro mayor que sus homólogos tiolados HASH 30-50 kDa y HASH 8-15 kDa; esto podría ser debido al carácter anfipático del HASH, produciendo que la molécula se contraiga en los grupos hidrófobos.

La carga superficial de los HA y HASH dieron diferentes resultados según el tamaño (30-50 kDa o 8-15 kDa), según si está tiolado o no (HASH o HA) y según el disolvente utilizado (H_2O o PBS) (Figura 4.18). La diferencia entre tamaños es debido a que el tamaño más grande tiene más repeticiones de monómeros y más grupos funcionales que dan carga negativa. La diferencia entre HA tiolado y no tiolado puede estar influenciado por el carácter anfipático del HASH, pero además por el hecho de que el HA es una sal sódica y el HASH ya ha estado modificado y dializado, por lo que ha perdido iones que contenía antes de la modificación. Finalmente, la diferencia por solvente es debida a que el PBS es una solución salina, donde los iones influyen en la carga final del HA incrementando los valores de las cargas.

Una caracterización más visual de la molécula fue la utilización de AFM para analizar el tamaño y ver la distribución del HA 30-50 kDa (Figura 4.19) y HASH 30-50 kDa (Figura 4.20). Se observaron puntos que representaban el HA y HASH monodispersos y no aglomerados. No se observaron diferencias entre el HA y el HASH en el análisis de tamaño de las partículas que se visualizaron. Se obtuvo un diámetro de 60 nm que se corresponde con el valor obtenido mediante DLS en H_2O (Figura 4.17). Pero queda sin justificar el tamaño en altura de 5 nm calculado mediante AFM.

4.2.4.3. Esterilidad y estabilidad

La importancia de esterilizar la solución de trabajo para realizar estudios posteriores *in vivo* e *in vitro* hizo estudiar la filtración mediante filtros de 0,2 μM PES y mediante autoclave. Los filtros funcionan pero el autoclave llega a altas temperaturas, degradando el HA por pirólisis. Por este motivo, el HA será esterilizado por filtración.

4.3. Conjugación de nanopartículas de oro con ácido hialurónico tiolado

Se realizaron tres productos diferentes en función del tamaño de partícula del portador (12 nm y 4 nm) y del tamaño del polisacárido (30-50 kDa y 8-15 kDa) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4 para obtener un sistema dirigido portador de fármacos (Figura 3.6):

EDS1: AuNPs 12 nm con HASH 30-50 kDa

EDS2: AuNPs 12 nm con HASH 8-15 kDa

EDS3: AuNPs 4 nm con HASH 8-15 kDa

4.3.1. Caracterización de EDS1, EDS2 y EDS3

Para conocer el estado físico-químico de las tres conjugaciones se realizaron análisis de caracterización estructurales, físicos y químicos:

- UV-Vis
- TEM
- DLS
- Pot-Z
- NTA
- ICP-MS
- AEO

4.3.1.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se realizó el espectro de absorbancia de UV-Vis a los tres conjugados de AuNPs-HASH (Figura 4.21). Los conjugados EDS1 y EDS2 se compararon con las AuNPs 12 nm sin conjugar. Se observó que el SPR de los conjugados se desplazó de 520 nm, que corresponde a las AuNPs 12 nm, a 522 nm. Comparando las AuNPs 4 nm con su conjugado EDS3 se observó que el desplazamiento del SPR fue de 510 nm a 512 nm.

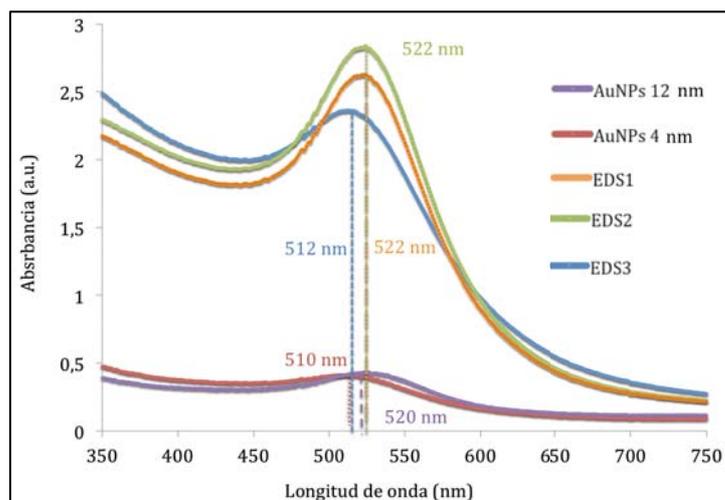


Figura 4.21 Espectro de absorción UV-Vis de los EDS y AuNPs. Espectro de las AuNPs 12 nm a 27 ppm Au; AuNPs 4 nm a 45 ppm Au; EDS1 a 237 ppm Au, EDS2 a 248 ppm Au y EDS3 a 249 ppm Au.

4.3.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó TEM entre las AuNPs y los conjugados con HASH (Figura 4.22). Se observaron AuNPs monodispersas. El HA no puede observarse directamente por TEM, aunque se observó una sombra alrededor de la AuNP del EDS1 (Figura 4.22 A).

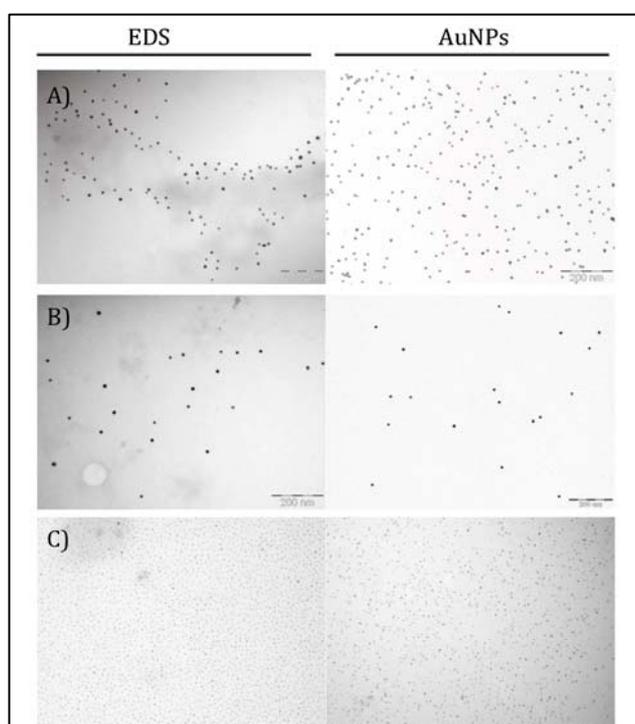


Figura 4.22 Imágenes de TEM de EDS y AuNPs. A) EDS1 y AuNPs 12 nm. B) EDS2 y AuNPs 12 nm. C) EDS3 y AuNPs 4 nm.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

4.3.1.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se obtuvieron resultados del diámetro hidrodinámico de los conjugados EDS mediante DLS (Tabla 4.11). Se realizaron en dos disolventes diferentes: H₂O milliQ y PBS.

DLS (d.nm)		
	H ₂ O milliQ	PBS
EDS1	97,67 ± 6,86	79,56 ± 4,26
EDS2	54,27 ± 10,27	25,70 ± 0,78
EDS3	39,96 ± 5,06	37,68 ± 2,81

Tabla 4.11 Caracterización de los EDS mediante DLS. Análisis del diámetro hidrodinámico de los conjugados (distribución en número). Se analizaron EDS1, EDS2, y EDS3 a 1 mg/ml de HA en H₂O milliQ y en PBS.

4.3.1.4. Potencial Z (Pot-Z)

Los resultados obtenidos mediante Pot-Z (Tabla 4.12) mostraron resultados distintos para los diferentes solventes utilizados (H₂O y PBS).

Pot-Z (mV)		
	H ₂ O milliQ	PBS
EDS1	-38,15 ± 1,27	-19,48 ± 0,74
EDS2	-41,78 ± 1,68	-19,40 ± 0,57
EDS3	-30,93 ± 0,56	-12,53 ± 0,94

Tabla 4.12 Caracterización de los EDS mediante Pot-Z. Análisis de la repulsión o la atracción electrostática o de carga entre partículas. Se analizó EDS1, EDS2 y EDS3 a 1 mg/ml de HA en H₂O milliQ y en PBS.

4.3.1.5. Nanosight (NTA)

Las distribución de tamaño de los sistemas EDS también se analizaron mediante NTA (Figura 4.23), dando como resultado los gráficos de distribución de tamaño de partícula y una cuantificación del valor de tamaño medio para cada muestra. El sistema EDS1 tuvo un valor de 128 ± 15 nm de diámetro de partícula, para el sistema EDS2 se obtuvo un diámetro de 65 ± 2 nm y para el EDS3 un diámetro de 76 ± 4 nm.

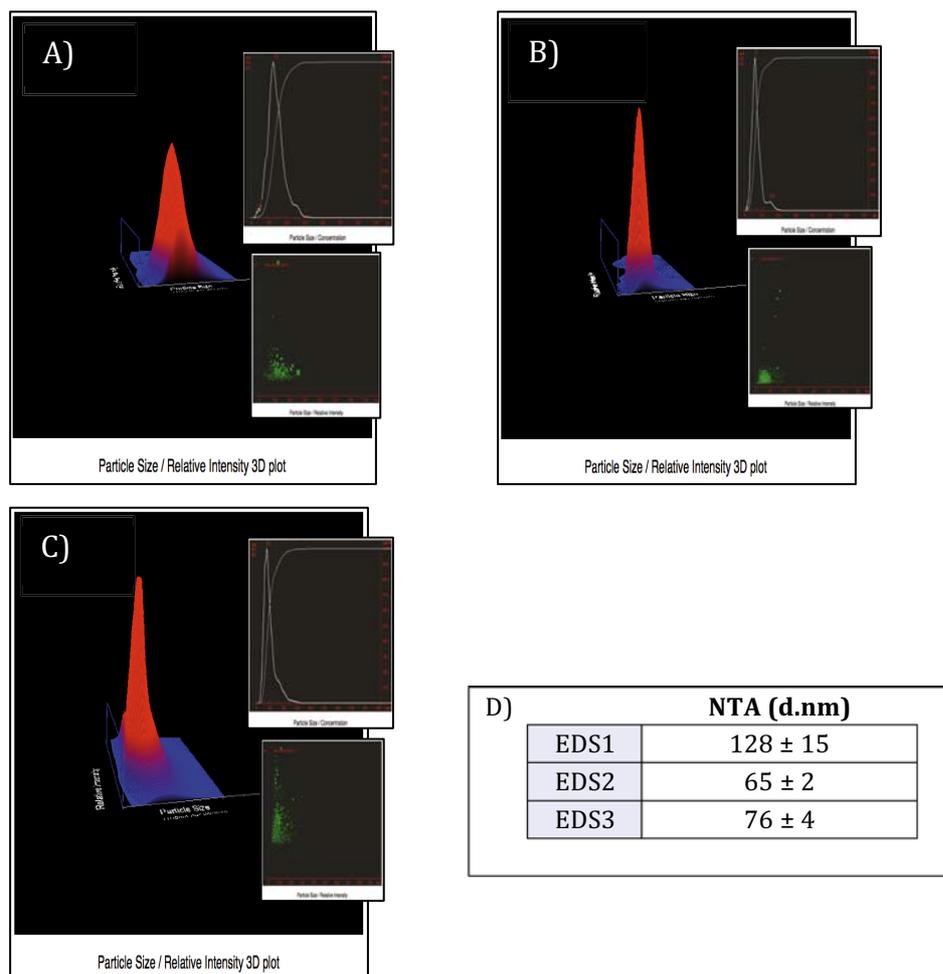


Figura 4.23 Resultados de la distribución de tamaño por NTA. A) EDS1. B) EDS2. C) EDS3. D) Representa la media de los máximos en la distribución del sistema mediante Nanosight.

4.3.1.6. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Los conjugados EDS se analizaron por ICP-MS dando como resultado concentraciones muy homogéneas en las tres conjugaciones y muy próximas a las esperadas (1000 ppm) (Tabla 4.13).

ICP-MS		
	ppm Au	NP/ml
EDS1	948,96 ± 27,76	5,42x10 ¹³ ± 1,59x10 ¹²
EDS2	992,30 ± 66,02	5,67x10 ¹³ ± 3,77x10 ¹²
EDS3	996,13 ± 58,34	2,45x10 ¹⁴ ± 1,43x10 ¹³

Tabla 4.13 Caracterización de los conjugados EDS mediante ICP-MS. Cuantificación de Au de los conjugados EDS1, EDS2 y EDS3.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

4.3.1.7. Análisis elemental orgánico (AEO)

Las muestras de EDS fueron analizadas por AEO para conocer los porcentajes de C, N y H en la muestra (Tabla 4.14) y por tanto la concentración de HA. Mediante el AEO y el ICP-MS se obtuvo el número de moléculas de HA respecto una AuNP.

AEO		
	Nº molec HA/AuNP	µM HA
EDS1	2158,12 ± 127,00	191,88 ± 7,06
EDS2	261,08 ± 40,02	24,36 ± 3,94
EDS3	547,82 ± 47,05	166,51 ± 8,79

Tabla 4.14 Caracterización de los EDS mediante AEO. Cuantificación del Au de los conjugados EDS1, EDS2 y EDS3 obteniendo el valor de moléculas del HA alrededor de una AuNP y la molaridad de HA.

4.3.2. Reproducibilidad

Se analizaron 4 lotes de cada sistema con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de las conjugaciones EDS1, EDS2 y EDS3 (Tabla 4.15).

EDS1								
	DLS (d.nm)		Pot-Z (mV)		Nanosight (d.nm)	ICP-MS (ppmAu)	AE (n ^o molec HA/NP)	pH
	H ₂ OmiliQ	PBS	H ₂ OmiliQ	PBS				
	Lote 1	90,83	74,90	-37				
Lote 2	107,17	81,94	-37,1	-20,3	112	954,65	2271,20	4,93
Lote 3	96,98	84,20	-39,2	-19,6	140	910,24	2028,61	4,93
Lote 4	95,71	77,20	-39,3	-19,5	143	976,30	2069,66	4,96
Media	97,67	79,56	-38,15	-19,48	128	948,96	2158,12	4,95
Desviación	6,86	4,26	1,27	0,74	15	27,76	127,00	0,02
EDS2								
	DLS (d.nm)		Pot-Z (mV)		Nanosight (d.nm)	ICP-MS (ppmAu)	AE (n ^o molec HA/NP)	pH
	H ₂ OmiliQ	PBS	H ₂ OmiliQ	PBS				
	Lote 1	50,51	25,33	-43,9				
Lote 2	61,33	25,00	-39,8	-19,8	65	935,24	271,72	4,93
Lote 3	63,73	26,54	-41,9	-19,8	66	1044,22	204,00	4,92
Lote 4	41,50	25,92	-41,5	-19,4	67	1054,49	297,60	4,89
Media	54,27	25,70	-41,78	-19,40	65	992,30	261,08	4,90
Desviación	10,27	0,68	1,68	0,57	2	66,02	40,02	0,03
EDS3								
	DLS (d.nm)		Pot-Z (mV)		Nanosight (d.nm)	ICP-MS (ppmAu)	AE (n ^o molec HA/NP)	pH
	H ₂ OmiliQ	PBS	H ₂ OmiliQ	PBS				
	Lote 1	39,58	40,85	-31,7				
Lote 2	33,09	38,04	-30,7	-11,4	78	955,25	515,02	4,13
Lote 3	44,83	37,84	-30,4	-12,6	70	995,04	589,70	3,61
Lote 4	42,33	34,00	-30,9	-12,4	77	1079,00	586,65	3,64
Media	39,96	37,68	-30,93	-12,53	76	996,13	547,82	3,71
Desviación	5,06	2,81	0,56	0,94	4	58,34	47,03	0,29

Tabla 4.15 Resumen de los diferentes lotes de los conjugados EDS. La tabla recoge los datos de DLS, Pot-Z, Nanosight, ICP-MS y AEO como técnicas más características del análisis de la reproducibilidad de los conjugados EDS1, EDS2 y EDS3.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

4.3.3. Esterilización y estabilidad de los EDS

La esterilización de los conjugados se realizó mediante filtración con filtros 0,2 μm PES. La esterilización por autoclavado ya se descartó tras los resultados obtenidos con el HASH. En la Figura 4.24 se muestra en A (EDS1), B (EDS2) y C (EDS3) que la filtración se llevó a cabo satisfactoriamente sin ninguna pérdida ni cambio de color en el filtro. Sin embargo, en la Figura 4.24 D, donde se testó un control de AuNPs 4 nm con HA 30-50 kDa no tiolado, la filtración no fue correcta ya que parte de las AuNPs se quedaron adheridas en el filtro.

En este experimento, tras añadir la cistamina a todas las soluciones que habían pasado por el filtro, solo agregaron las de la Figura 4.24 D.

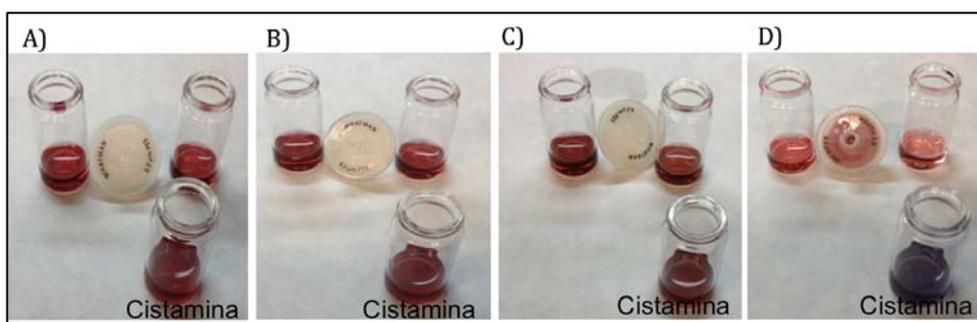


Figura 4.24 Imágenes de la esterilización y estabilidad de los conjugados EDS. A) EDS1 filtrado y con cistamina 0,074 nM B) EDS2 filtrado y con cistamina 0,074 nM. C) EDS3 filtrado y con cistamina 0,074 nM. D) AuNPs-HA sin tiolar filtrado y con cistamina 0,074 nM.

4.3.4. Tabla Resumen

En la tabla (Tabla 4.16) se muestran los resultados de caracterización de los tres sistemas.

	12 nm 1x	4 nm	EDS1	EDS2	EDS3
UV-Vis (nm)	520	510	522	522	512
DLS (d.nm) (H ₂ O)	11,56 ± 0,18	4,29 ± 0,62	97,67 ± 6,86	54,27 ± 10,27	39,96 ± 5,06
Pot-Z (mV) (H ₂ O)	-38,48 ± 1,82	-25,23 ± 1,21	-38,15 ± 1,27	-41,78 ± 1,68	-30,93 ± 0,56
NTA (d.nm)			128 ± 15	65 ± 2	76 ± 4
ICP-MS (ppm Au)	27,31 ± 1,63	45,22 ± 1,88	948,960 ± 27,76	992,30 ± 66,02	996,13 ± 58,34
Conc. (NP/ml)	1,56x10 ¹² ± 9,3x10 ¹⁰	1,11x10 ¹³ ± 4,64x10 ¹¹	5,42x10 ¹³ ± 1,59x10 ¹²	5,67x10 ¹³ ± 3,77x10 ¹²	2,45x10 ¹⁴ ± 1,43x10 ¹³
AEO (N ^o molec. HA/NP)			2158,12 ± 127,00	261,08 ± 40,02	547,82 ± 47,05

Tabla 4.16 Tabla resumen de las AuNPs 12 nm 1x, AuNPs 4 nm y los conjugados EDS. La tabla recoge los datos de UV-Vis, DLS, Pot-Z, NTA, ICP-MS, Concentración (NP/ml) y AEO de las AuNPs 12 nm 1x y 4 nm y los conjugados EDS1, EDS2 y EDS3.

4.3.5. Eficacia *in vitro* para la selección del candidato EDS

4.3.5.1. Citotoxicidad

Los estudios de citotoxicidad del EDS se realizaron en la línea celular Panc-1, ya que esta línea tumoral de páncreas expresa niveles elevados del receptor CD44 (Tabla 4.17). El estudio mostró que los candidatos EDS2 y EDS3 no presentan ninguna toxicidad para las células a las concentraciones testadas (hasta 1000 ppm de Au). Sin embargo, EDS1 mostró niveles de toxicidad superiores, presentando un IC50 cercano a las 100 ppm de Au.

IC50	Panc-1	
	Ppm Au	
EDS1	97 ± 42 ppm	
EDS2	No tóxico hasta 1000 ppm	
EDS3	No tóxico hasta 1000 ppm	

Tabla 4.17 Tabla de IC50 en Panc-1 de los candidatos EDS1, EDS2 y EDS3. IC50 de los candidatos expresados en ppm de Au.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

4.3.5.2. Internalización

Continuando con la línea celular Panc-1, se realizó un experimento de internalización del Au de los EDS a las células (Figura 4.25). Los resultados mostraron que en EDS1 hubo más internalización de Au que en el resto, seguido de EDS3 y finalmente EDS2, que presenta niveles muy bajos de Au.

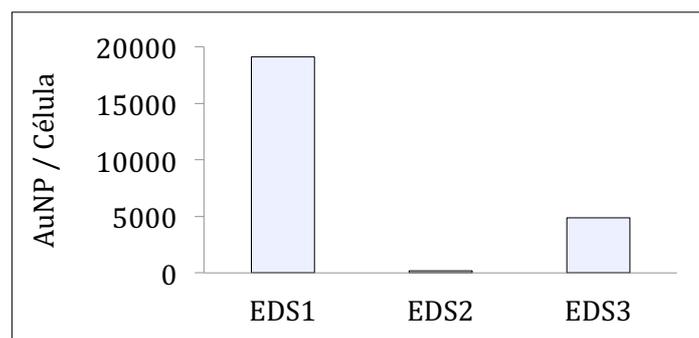


Figura 4.25 Internalización de EDS1, EDS2 y EDS3 en Panc-1.
Representación de la cantidad de AuNPs en una célula de Panc-1 en los tres sistemas EDS.

4.3.6. Caracterización del candidato EDS1

Mediante la caracterización de los tres sistemas EDS se pudo concluir que el candidato EDS1 era el que mejor resultados obtuvo a nivel de caracterización y de efectividad *in vitro*, principalmente por la elevada internalización que presentó. Por ese motivo, se completó la caracterización de este candidato con el fin de conocer mejor sus propiedades físico-químicas. Se realizaron análisis de:

- FT-IR
- TGA
- ESCA
- TEM
- SEM
- AFM

4.3.6.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El resultado del espectro FT-IR del candidato EDS1 (Anexo Figura 7.7) no mostró diferencias en los espectros, con respecto a los análisis realizados anteriormente en HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.5 B) ni HA 30-50 kDa (Anexo Figura 7.5 A).

4.3.6.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA (Anexo Figura 7.8) evidenció una pérdida de peso orgánico de un 72,3%, siendo la única parte orgánica la HASH.

4.3.6.3. Espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA)

El espectro de EDS1 (Figura 4.26) obtenido mediante ESCA mostró una superposición exacta de los espectros por separado de HASH 30-50 kDa y AuNPs 12 nm, describiendo la estructura electrónica de cada compuesto del sistema.

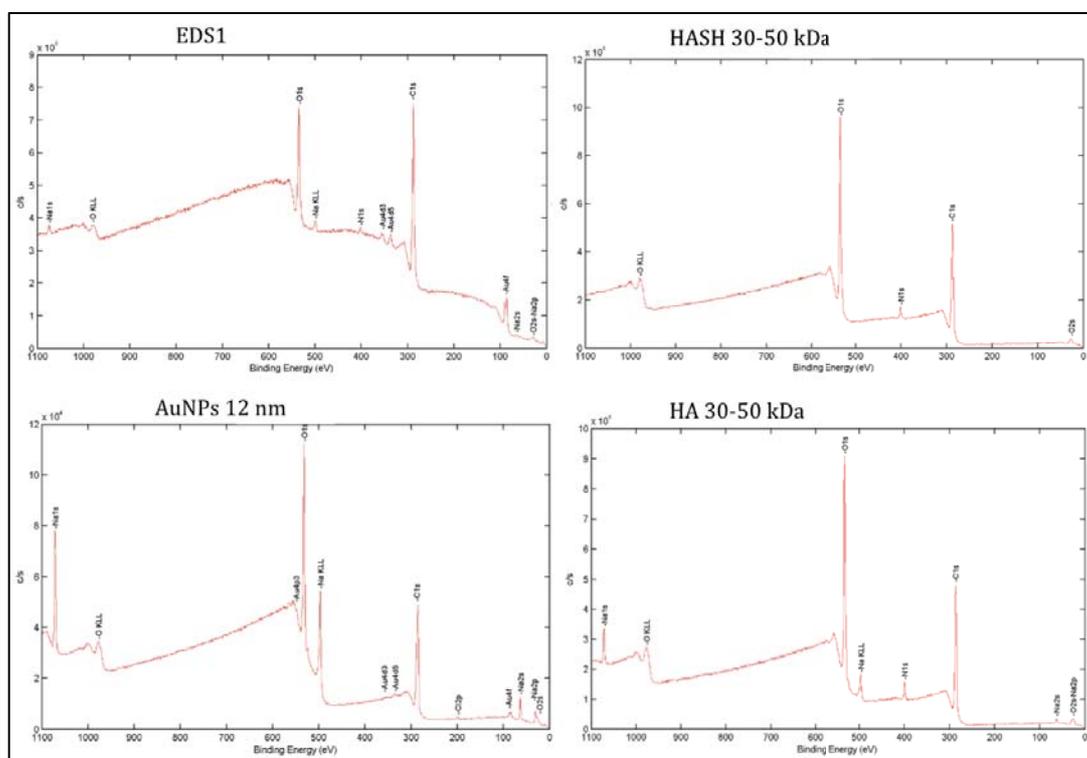


Figura 4.26 Caracterización por ESCA de EDS1 comparándolo con HASH 30-50 kDa, HA 30-50 kDa y las AuNPs 12 nm. Se obtienen los espectros generales de ESCA de los compuestos.

Además, por ESCA también se analizó el estado de oxidación del oro en la solución de EDS1 (Figura 4.27). Para las AuNPs tenemos unos valores de 87,5 y 83,8 eV mientras que la conjugación se desplaza hasta valores de 86,8 y 83 eV.

El carbono (Figura 4.27) de las AuNPs viene determinado por el citrato de sodio, con enlaces C-C, C-H y C=O. En el EDS1 hay 3 enlaces distintos, uno es el de los C-H mas C-C, y los otros son C-O y C=O.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

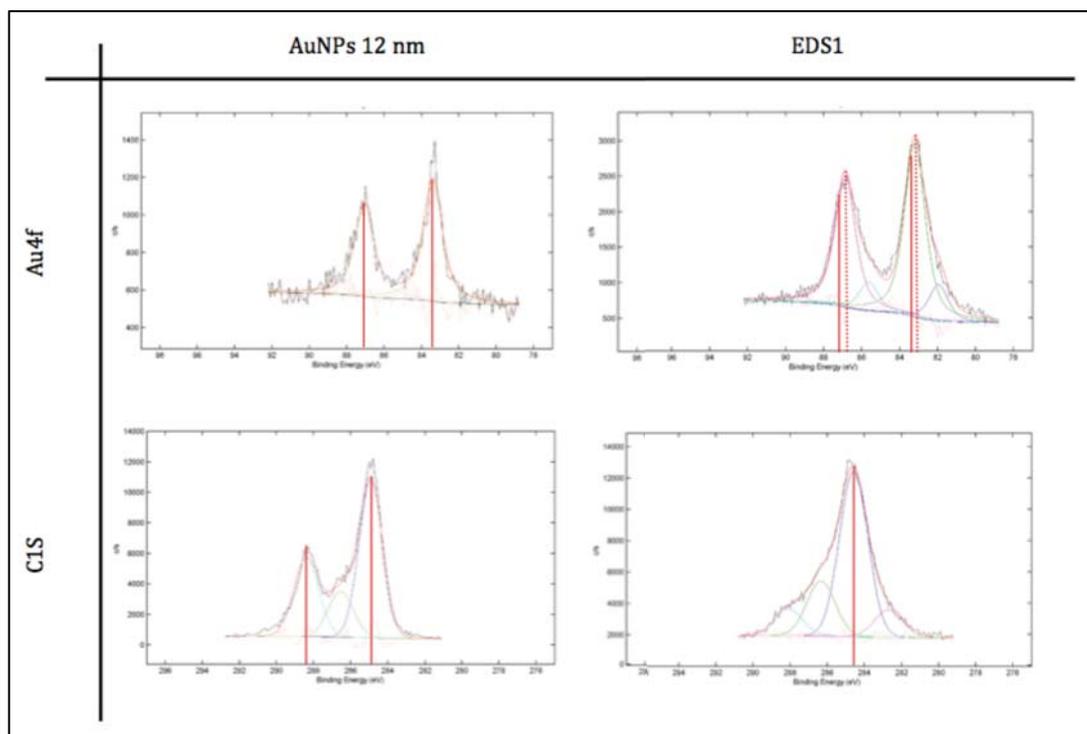


Figura 4.27 Espectro del ESCA en las regiones espectrales Au4f y C1s, de las AuNPs 12 nm y el EDS1.

4.3.6.4. Microscopía electrónica de transmisión con técnica de tinción negativa (TEM)

Las muestras de AuNPs y EDS1 fueron analizadas de nuevo por TEM pero realizando previamente una tinción negativa. En la Figura 4.28 se muestra la comparativa entre las AuNPs y el EDS1.

La comparativa de las dos muestras sin tinción negativa, ya muestra algunas diferencias en las imágenes, donde se puede observar una sombra gris alrededor de las AuNPs de la muestra EDS1.

La tinción con acetato de uranilo 2% (pH 4) mostró una sombra gris muy tenue y poco definida alrededor de las AuNPs. Sin embargo, la muestra de EDS1 mostró una sombra más evidente y definida.

En las imágenes obtenidas mediante la tinción de fosfotungstato de sodio (pH 7,5) no se observaron diferencias entre AuNPs y EDS1.

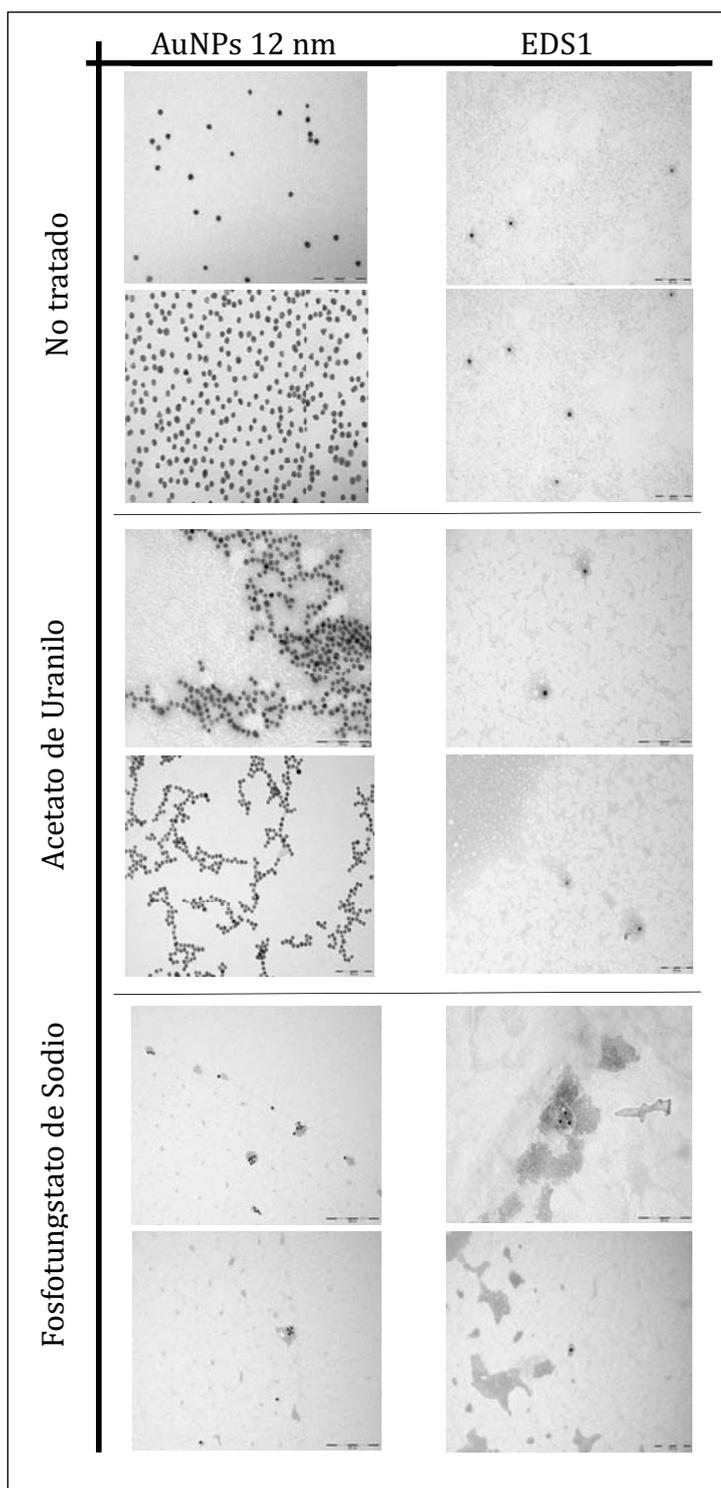


Figura 4.28 Comparación de las imágenes obtenidas en el TEM mediante tinción negativa. Tinción de las AuNPs 12 nm (izquierda) y EDS1 (derecha) mediante Acetato de Uranil 2% pH 4 y Fosfotungstato de Sodio pH 7,5.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

4.3.6.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de EDS1 (Figura 4.29) mostraron las AuNPs como esferas blancas mientras que el HA se observó con un color gris más intenso. Cabe destacar que siempre se encontraban las AuNPs conjuntamente con el HA.

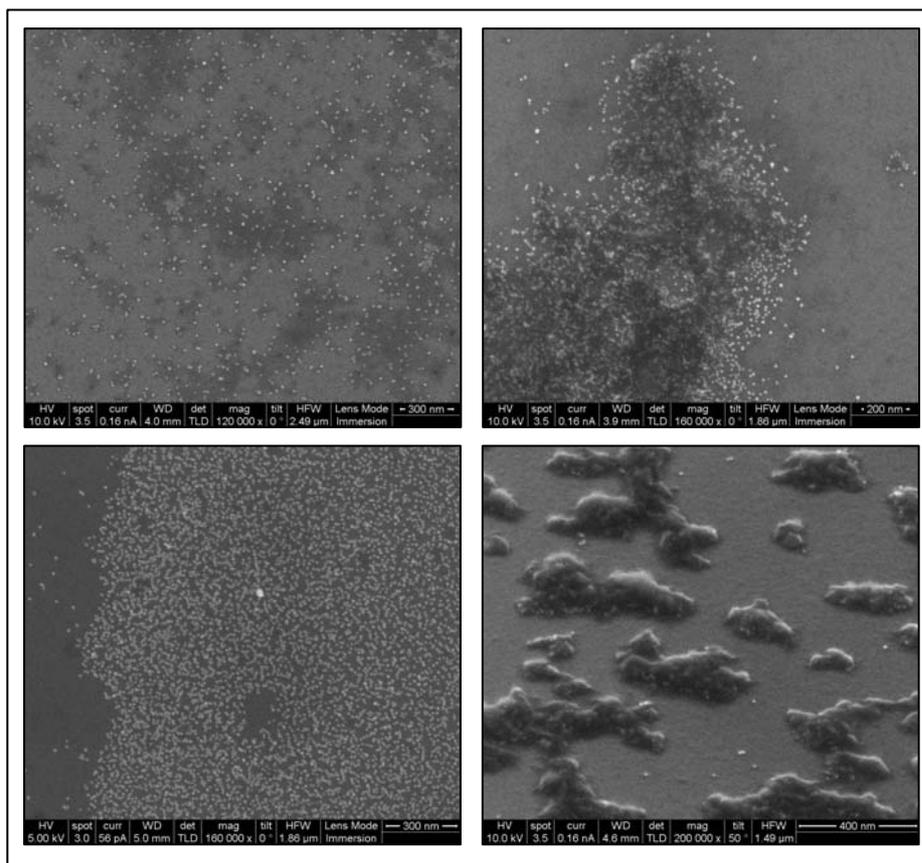


Figura 4.29 Imágenes tomadas del EDS1 mediante SEM entre 10 y 5 kv.

Las imágenes de EDS1 fueron obtenidas por STEM-HAADF (Figura 4.30). La imagen A son AuNPs 12 nm, esferas blancas como se obtuvieron en el anterior análisis con SEM. La muestra B y C se distingue el HA por su nube blanca y las AuNPs como esferas blancas que se encuentran en esa nube.

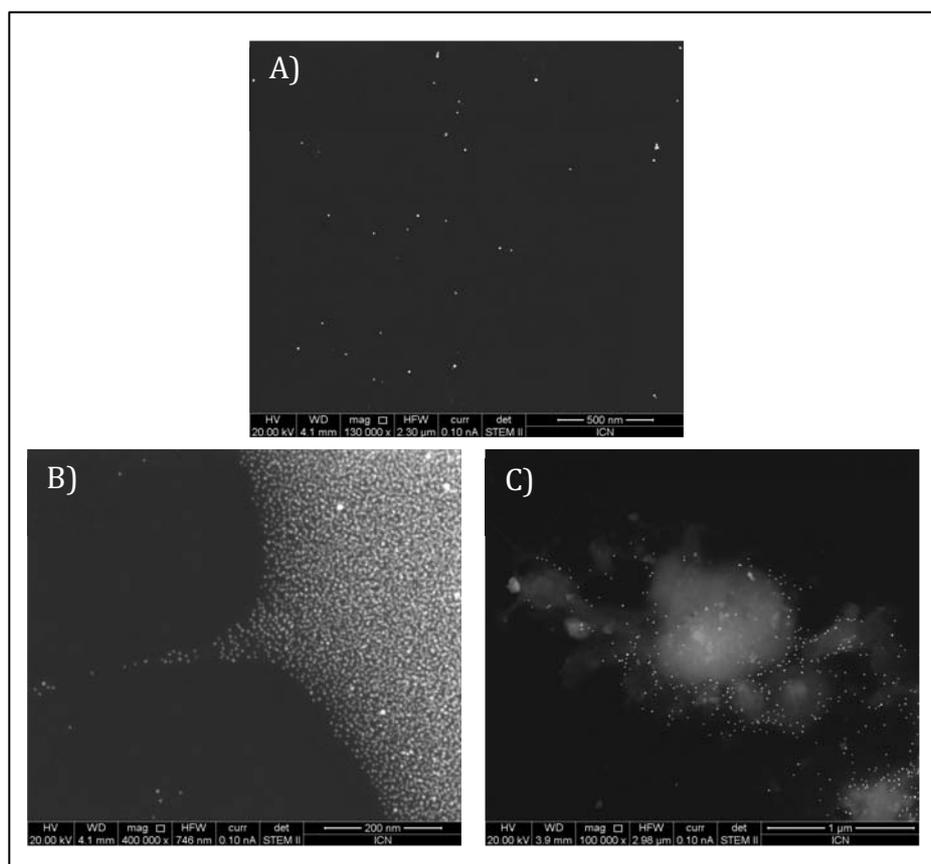


Figura 4.30 Imágenes tomadas del EDS1 por STEM-HAADF a 20 kV. A) Imagen de AuNPs 12 nm; B) y C) Imágenes del EDS1.

4.3.6.6. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes de AFM del sistema EDS1 mostraron dos tipos de esferas (Figura 4.31). Se observó que las esferas grandes se encontraban sobre unos $0,109 \mu\text{m}$ ($12,0 \text{ mV}$) de diámetro horizontal; mientras que las esferas pequeñas $0,031 \mu\text{m}$ ($37,49 \text{ mV}$) de diámetro horizontal. Los 37 mV significa que el material desfasa más respecto al material más duro (soporte de mica), por tanto representa un material más blando como el HA.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO TIOLADO

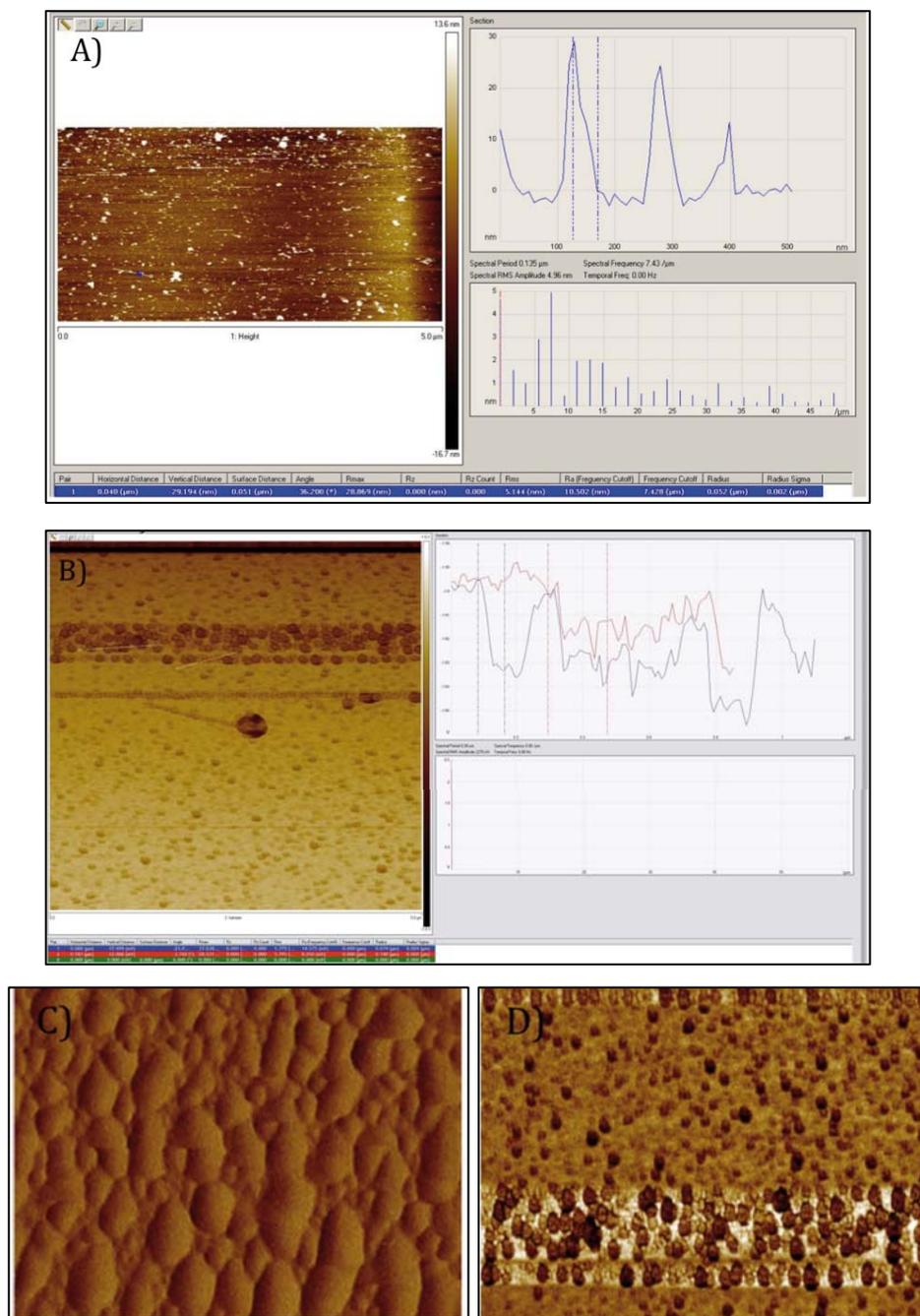


Figura 4.31 Imágenes tomadas por AFM del EDS1. A) Imagen captada 5x3 micrones en imagen topográfica y su análisis. B) Figura captada 5 µm en imagen topográfica y su análisis. C) Imagen obtenida a 2 µm. D) Imagen obtenida a 5 µm.

4.3.7. Discusión

4.3.7.1. Elección de la conjugación EDS

Una vez sintetizados y caracterizados los dos componentes del EDS, (AuNPs y HASH), se estudiaron diferentes combinaciones para obtener el sistema más eficaz.

La combinación de tamaños seleccionados se realizó estudiando el número de átomos de oro en la superficie de la AuNPs. De la caracterización realizada a las AuNPs conocemos los diámetros de partícula (Tabla 4.7) y aplicando la fórmula de la Figura 3.22 se obtuvo para las AuNPs 12 nm un valor de ≈ 8000 átomos de Au en su superficie y ≈ 1000 átomos de oro en superficie para las AuNPs 4 nm.

Para aproximar cuantitativamente la interacción de oro-azufre (Vericat et al., 2005), el destino del protón sulfhidrilo (Hasan et al., 2002) y la conformación de la fracción orgánica, dependen de la molécula conjugada y no es trivial. Jandzinsky et. al. mostró la cristalización y la determinación de la estructura por rayos X de un ácido p-mercaptobenzoico (p-MBA) protegiendo a las AuNPs, que comprendió 102 átomos de oro y 44 de p-MBAs (Jadzinsky et al., 2007). Sin embargo, el criterio para combinar los diferentes tamaños de HASH (30-50 y 8-15 kDa) y AuNPs (12 y 4 nm) fue mediante la justificación de que las AuNPs 12 nm tienen más átomos de Au en superficie y por eso se combinaron con el HASH 30-50 kDa y 8-15 kDa; en cambio las AuNPs 4 nm tienen menos átomos de Au en superficie y se decidió conjugarlo solo con el tamaño de HA más pequeño (HASH 8-15 kDa).

4.3.7.2. Caracterización de los EDS

Tras la síntesis de los tres candidatos seleccionados, se realizó una caracterización exhaustiva para poder escoger el mejor de ellos y continuar con el proyecto.

Se realizó un espectro UV-Vis comparando los tres EDS entre ellos y también con las AuNPs 12 y 4 nm, de esta manera se observó el cambio en el SPR al añadir el HASH (Figura 4.21). Los desplazamientos de los EDS respecto a las AuNPs fueron de 2 nm según el tamaño de AuNP. Estos cambios son causados por el enlace Au-SH, ya que se produce una reducción en la densidad de electrones de las AuNPs (Lica et al., 2004) produciéndose una transferencia de carga de los electrones 5d de los átomos de

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO

superficie a los 3p del S. Además, también se produce un incremento de la amortiguación debido a la localización de carga en la superficie de la NP (Crespo et al., 2004; Hövel et al., 1993; Zhang,P. et al., 2003). Sin embargo, la amortiguación no mostró grandes cambios en la anchura de la curvatura del espectro, por lo que justifica sistemas estables y no agregados. El HASH le da estabilidad estérica a las AuNPs estabilizándolas frente la carga electroestática que tenían al estar con el citrato. El incremento en la intensidad de absorbancia quedó justificado por las diferencias de concentración entre las AuNPs y los EDS (Figura 4.1 y Figura 4.2).

Visualmente no hubieron diferencias en las muestras de TEM entre las AuNPs (12 y 4 nm) y sus conjugados EDS (1, 2 y 3) (Figura 4.22). El HASH no tiene suficiente densidad electrónica para verse por el TEM, con lo que las imágenes de los conjugados son igual que las AuNPs (Lee,H. et al., 2008; Lee,M.-Y. et al., 2012). Sin embargo, en algunas imágenes (Figura 4.22 A) se intuye una sombra alrededor de las AuNPs del EDS1 que podría corresponder a un efecto producido por el secado del agua de la muestra en contacto con HA.

En cuanto al análisis del diámetro de los sistemas EDS, se utilizó el DLS. Al conocer que las sales afectaban al HASH se realizaron las medidas de tamaño hidrodinámico de los EDS1, 2 y 3 en H₂O y en PBS (Tabla 4.11). Se confirmó que en PBS los valores son menores que en H₂O, tal y como se observó en el análisis de los HASH (Figura 4.17). Además, los valores en H₂O se ratificaron al realizar la caracterización del diámetro de partícula por NTA (Figura 4.23), obteniendo valores similares en DLS y NTA para cada EDS. Analizando cuantitativamente el valor obtenido de los diámetros queda confirmado el hecho de que el HASH se ha conjugado a la AuNP. Los valores son mayores que cada material por separado (Tabla 4.16).

Las cargas superficiales de los sistemas EDS dan valores menos negativos en PBS que en H₂O (Tabla 4.12). Los valores en H₂O son más estables y además son inferiores al disminuir el tamaño de partícula, debido a que los grupos funcionales que dan esa carga negativa también disminuyen.

Los resultados obtenidos mediante AEO de los conjugados (Tabla 4.14) son justificables teniendo en cuenta los átomos en superficie para EDS 1 y 3. El conjugado EDS1 tiene un diámetro de partícula de 12 nm, ello conlleva tener ≈ 8000 átomos de Au y una superficie efectiva mayor que para el conjugado con AuNPs de 4 nm. Para el conjugado EDS3, las NPs tienen un diámetro mas pequeño que el resto y por ello menos átomos de Au en su superficie (≈ 1000 átomos de oro), sin embargo, contiene mayor número de NPs por mililitro, $2,48 \times 10^{14}$ NP/ml (Tabla 4.13). En relación al conjugado EDS2, éste tiene una superficie mayor que la de 4 nm pero conjuga menos HASH. En la Tabla 4.10, que resume la tiolación del HA, se observó que el rendimiento de la reacción para el HASH 8-15 kDa era menor (78,26%) que para el HASH 30-50 kDa (82,50%). Queda sin ser justificable la poca conjugación en el EDS2.

La Tabla 4.15 recoge la poca variabilidad físico-química que hay entre diferentes lotes de producción de EDS. Se confirma que el sistema de síntesis y caracterización es estable y reproducible.

4.3.7.3. Esterilización y estabilidad de los EDS

Ya se ha comentado en esta tesis la importancia de esterilizar las muestras para su posterior aplicación biológica. Para confirmar que el producto que había pasado por el filtro todavía mantenía sus propiedades, se añadió cistamina. Tal y como se demostró en el apartado de esterilidad y estabilidad de las AuNPs (Figura 4.8), la cistamina hace desestabilizar las NPs sin conjugar y por tanto agregan y cambian rápidamente de color.

Para medir el grado de estabilidad de los sistemas, se realizó una incubación con cistamina, donde solo agregó la solución de AuNPs conjugadas a HA no tiolado (Figura 4.24 D), debido a que no tienen el HA conjugado de manera covalente, perdiendo así estabilidad. Solo las AuNPs recubiertas con HASH se mantienen estables.

Por tanto, concluimos que el método adecuado para esterilizar las soluciones de EDS sería mediante filtración, y además, se obtuvo un método visual mediante cistamina para saber si el HASH ha recubierto las AuNPs y las ha estabilizado.

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO

4.3.7.4. Eficacia *in vitro* para la selección del candidato EDS

Además de la caracterización físico-química de los tres EDS, se realizaron experimentos *in vitro* (toxicidad e internalización) para definir y seleccionar un candidato final idóneo para encapsular fármacos antitumorales.

El objetivo del experimento de citotoxicidad era comprobar si el sistema era tóxico. Se escogió Panc-1, como línea celular tumoral por su elevada expresión del receptor CD44. Los resultados de IC50 (Tabla 4.17) mostraron que EDS2 y EDS3 no eran tóxicos a concentraciones hasta 1000 ppm, pero para EDS1 se obtuvo un valor de 97 ± 42 ppm Au. Otros estudios realizados en este laboratorio y no presentados en esta tesis, demostraron que este candidato no presenta ninguna toxicidad en células sanas. Además, existen publicaciones que demuestran que un sistema de AuNPs 12 nm con HASH de 5 kDa no presentó toxicidad en la línea 3T3 de fibroblastos (Di Guglielmo et al., 2012).

La cuantificación de Au intracelular como método para determinar el grado de internalización en la célula de los EDS (Figura 4.25), dio como resultado para EDS1 un mayor número de AuNP por célula. Respectivamente, EDS3 y EDS2 fueron de mayor a menor internalización de Au. La internalización tiene lugar mediante la unión del sistema al receptor CD44. Analizando la cantidad de HA que tiene cada EDS (Tabla 4.16) se vio una correspondencia entre la cantidad de HA y la internalización intracelular, dándose una mayor internalización cuando hay mayor cantidad de HA por NP en el sistema.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tanto en la caracterización físico-química (Tabla 4.16) como en los estudios *in vitro* (Tabla 4.17 y Figura 4.25), se decidió elegir el EDS1 como sistema de liberación de fármacos. Los motivos principales fueron:

- El EDS1 contiene mayor número de moléculas y tiene un tamaño superior de HA. Esta característica podría favorecer que el sistema se mantuviese más tiempo en sangre, ya que tamaños demasiado

pequeños pueden eliminarse rápidamente. (Li et al., 2012; Morigi et al., 2012).

- La carga elevada y negativa del sistema también es una característica de estabilidad y poca toxicidad, aunque las pruebas *in vitro* confirmaron una leve toxicidad en células tumorales a concentraciones elevadas.
- El EDS1 fue el que presentó mayor internalización de Au en las células. Por tanto, mayor cantidad de droga será transportada al interior de la célula.

4.3.7.5. Caracterización del candidato EDS1

Tras haber seleccionado el candidato definitivo, se continuó realizando diversos estudios para completar la caracterización.

El FT-IR se realizó con el objetivo de analizar algún cambio en los grupos funcionales del HASH al conjugarse con la AuNP. Los resultados del espectro del EDS1 (Anexo Figura 7.7) demuestran que no hay diferencias significativas con los espectros de HA y HASH (Anexo Figura 7.5), lo que demuestra que los grupos funcionales no se han modificado al ser conjugada la molécula HASH con las AuNPs.

La cuantificación de la cantidad de HASH que hay en el EDS1, obtenidos a partir de los análisis de AEO e ICP-MS, mostró un 89,5% de HASH en peso seco. Sin embargo, en el TGA (Anexo Figura 7.8) vimos un 72,3% de pérdida de peso orgánico, es decir HASH. Esta diferencia se debe a que en AEO se analiza también las moléculas de agua que pueda contener, mientras que en el TGA se obtiene el valor de H₂O en la muestra independientemente de la materia orgánica. Por tanto, el TGA demostró que había un 9,3% de H₂O en el EDS. El método de liofilización no dejó la muestra totalmente seca para los análisis.

Se realizó un estudio mediante la técnica ESCA con el objetivo de ver la conjugación del HASH 30-50 kDa y las AuNPs 12 nm. Las señales obtenidas en las muestras HA y HASH se corresponden con los descritos en la bibliografía (Pasqui et al.,

4.3 CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ÁCIDO HIALURÓNICO

2007), con la diferencia que en el HA se observó el Na de la sal del hialuronato, mientras que el HASH ha perdido ese Na en la diálisis, sin embargo no se detectó el -SH. En las AuNPs se identificaron las energías de enlace correspondientes al Au y al citrato (Mikhlin et al., 2011). Para el sistema EDS1 se obtuvo un espectro correspondiente a la superposición de los espectros AuNPs 12 nm y HASH 30-50 kDa.

El análisis de las regiones espectrales de Au4f y C1S de AuNPs 12 nm y EDS1 se realizaron a partir de los resultados de ESCA (Figura 4.27). Como se describe en la bibliografía (Huo et al., 2008), el Au presenta un doblete de picos que se considera un único enlace; para el Au³⁺ los picos se muestran a 89 y 86 eV, para Au¹⁺ a 88,5 y 84,5 eV mientras que para Au⁰ los valores son de 87,5 y 83,8 eV. En el análisis de EDS1 se obtuvieron dos picos de Au (Figura 4.27) que se ajustan a la posición descrita en la bibliografía para el estado de oxidación del Au⁰, confirmando que la sal de oro se ha reducido completamente en la síntesis. Los valores energéticos Au4f se desplazan hacia valores menores de energía al estar conjugados al HASH. Los valores para C1S de las AuNPs viene determinado por el citrato, siendo los enlaces C-C, C-H y C=O detectados y justificados por la bibliografía (Park et al., 2014). También para el análisis de EDS1 los valores correspondientes a los enlaces C-H, C-C y C-O, C=O están referenciados en la bibliografía (Mikhlin et al., 2011).

Debido a que las imágenes del TEM de los EDS (Figura 4.22) no concluyeron imágenes definitivas de la materia orgánica se aplicó la técnica de tinción negativa para TEM en el sistema EDS1 con el objetivo de visualizar el HA alrededor de la AuNP. Solo las muestras de EDS1 mediante acetato de uranilo mostraron un sombreado distinguiendo la materia orgánica, sin embargo se observó materia orgánica donde no habían AuNPs, por lo que señala un exceso de HA en la formulación. El fosfotungstato de sodio dio tinción en las AuNPs sin conjugar, por lo que el resultado en el EDS1 no es fiable (Figura 4.28).

Los resultados obtenidos mediante tinción negativa por TEM no fueron tan buenos como se esperaba y se realizó un análisis de las muestras por SEM para conseguir finalmente visualizar la materia orgánica de nuestro sistema EDS1. Los resultados obtenidos mediante dos analizadores SEM diferentes, siempre mostraron

imágenes donde el HA no se encuentra aislado, sino que se encontraba alrededor de las AuNPs (Figura 4.29 y Figura 4.30).

La caracterización del EDS1 se finalizó realizando un análisis por AFM (Figura 4.31). Los resultados mostraron dos tamaños de partícula diferentes (Figura 4.31 C). La fuerza ejercida por el cantiléver en cada tamaño de esfera confirmó que en la esfera grande el material era mas duro debido probablemente al contenido de AuNPs. En cambio, en la esfera pequeña, la fuerza aplicada es menor y se hunde más debido a que contiene tan solo HA. Este análisis nos confirma que a pesar de haber eliminado los restos de HA no conjugados a la AuNP, todavía tenemos exceso de HA en el sistema EDS1, como también reflejó el TEM con tinción negativa (Figura 4.28).

4.4. Caracterización de la conjugación de EDS1 al fármaco antitumoral

En los puntos anteriores se han descrito y analizado el portador del sistema (AuNP) y el elemento que dirige el sistema a las células tumorales (HASH), llegando a la conclusión de que EDS1 era el óptimo candidato. En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos de incorporar fármacos antitumorales al sistema EDS1 para validar el sistema de liberación controlado.

4.4.1. Síntesis y caracterización del EDS1 con cisplatino

4.4.1.1. Vía A Cis

4.4.1.1.1. Caracterización de la síntesis del ligando L

Para llevar a cabo la síntesis por la vía A, se sintetizó el ligando L que proporcionó el tiol para enlazar el Cis con la NP. La síntesis del ligando se realizó en dos pasos como se describe en el apartado 3.2.5.1.1.

El primer paso fue la carboxilación de la cistamina obteniendo el derivado carboxi-metilado de cistamina (Figura 3.11) que se caracterizó mediante RMN (Anexo Figura 7.9). Los resultados para ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) fueron: 4,15-4,20 (8H, q, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$); 3,63 (8H,s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,09-3,13 (4H, t, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); 2,83-2,87 (4H, t, $-\text{CH}_2-\text{S}$); 1,26-1,29 (12H, t, $-\text{CH}_3$). También se caracterizó por HPLC-MS (Figura 4.32) obteniendo una masa molecular de 497,2 Da.

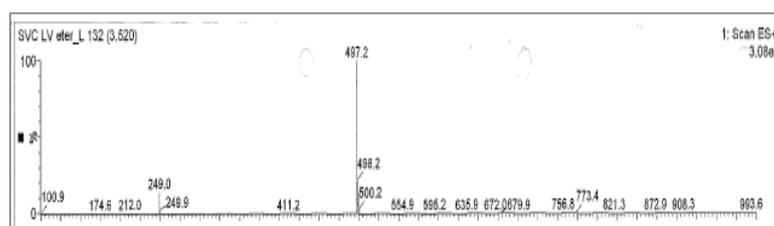


Figura 4.32 Espectro de masas del derivado carboxi-metilado de cistamina.

Finalmente se continuó con la reacción y se obtuvo el ligando L (Figura 3.11). Se caracterizó mediante RMN (Anexo Figura 7.10), obteniendo el espectro asignado a la molécula, ^1H RMN (DMSO , 400 MHz, ppm): 3,45 (8H,s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-$); 2,92-2,95 (4H, t, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); 2,79-2,82 (4H, t, $-\text{CH}_2-\text{S}$).

4.4.1.1.2. Caracterización de la conjugación vía A Cis

Se realizó la caracterización del sistema vía A Cis mediante UV-Vis, TEM, DLS, Pot-Z e ICP-MS utilizando estas técnicas como las más importantes para conocer el sistema.

El UV-Vis mostró el mismo SPR a 525 nm para A.1 y A.2 (Figura 4.33 A). Las imágenes del TEM mostraron los sistemas vía A.1 Cis y vía A.2 Cis (Figura 4.33 B) sin aglomerados y se vieron las AuNPs monodispersas. Sin embargo, en el DLS realizado para la vía A.1 el radio hidrodinámico en número es ligeramente más pequeño que para la vía A.2 (Figura 4.33 C) y la carga superficial de la vía A.1 también es ligeramente menor que en la A.2. Para conocer la concentración de Cis que se cargó en el sistema se analizó la cantidad de Pt mediante ICP-MS y como resultado se obtuvo una mayor encapsulación para la vía A.1 con un ratio de 3187,42 moléculas de Cis por AuNP.

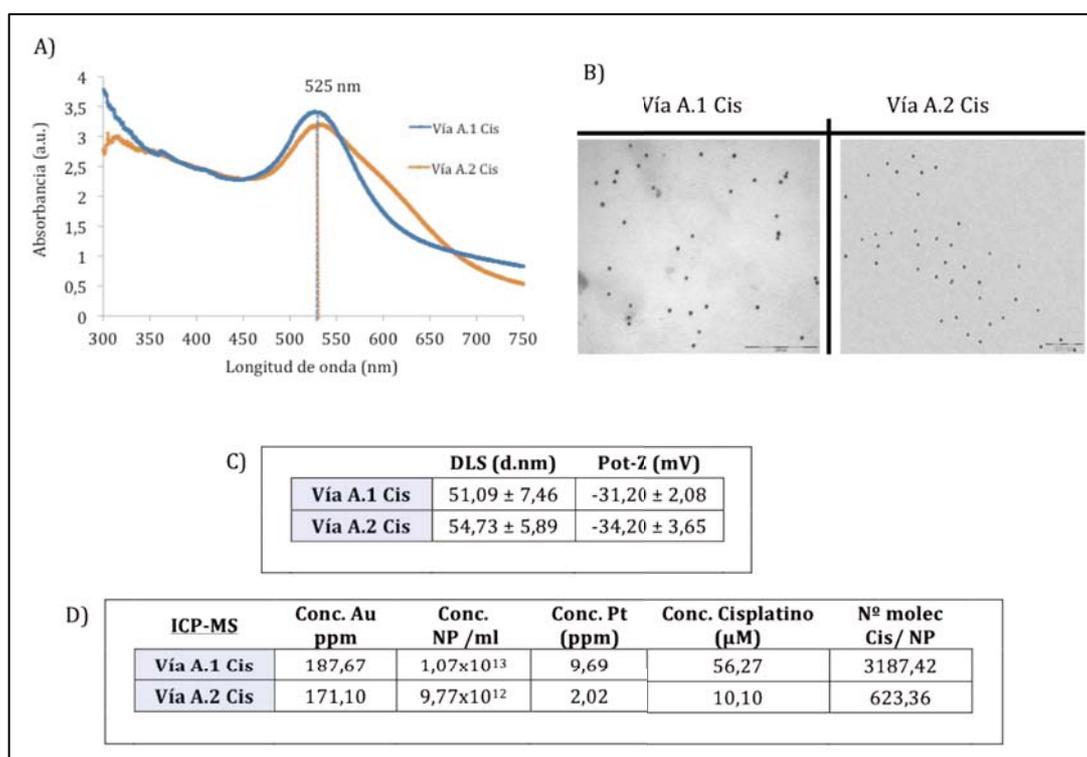


Figura 4.33 Caracterización de la vía A Cis. A) Espectro del UV-Vis de la vía A.1 y A.2 Cis. B) Imágenes del TEM de la vía A.1 y A.2 Cis. C) Resultados del diámetro hidrodinámico en número y de la carga superficial de la vía A.1 y A.2 Cis. D) Resultados de ICP-MS del sistema vía A Cis.

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

4.4.1.2. Vía B Cis

La vía B Cis se diseñó con el objetivo de conjugar al EDS1 el fármaco mediante un ligando (MUA) que une al fármaco directamente a la AuNP mediante tioles (Figura 3.12). El sistema MUA-Cis se conjugó con diferentes concentraciones (B.1 Y B.2) al EDS1.

Para caracterizar la vía B Cis se realizó un UV-Vis donde se obtuvieron las SPR de las dos concentraciones (B.1 y B.2) al mismo máximo de 525 nm (Figura 4.34 A). Las imágenes del TEM (Figura 4.34 B), mostraron AuNPs monodispersas y sistemas no aglomerados. El DLS y el Pot-Z no mostraron mucha diferencia entre los conjugados B.1 y B.2 Cis (Figura 4.34 C). Sin embargo, el resultado extraído del análisis por ICP-MS reveló una alta conjugación de Cis en el sistema A.1 comparado con el sistema A.2 (Figura 4.34 C).

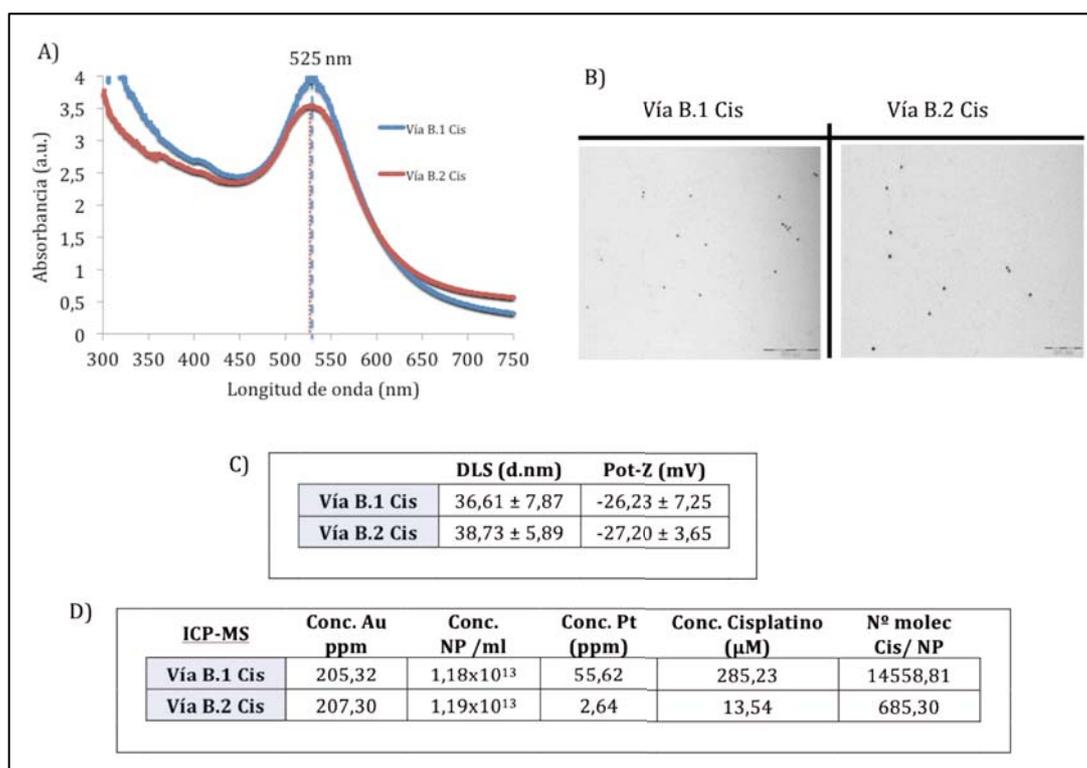


Figura 4.34 Caracterización de la vía B Cis. A) Espectro del UV-Vis de la vía B.1 y B.2 Cis. B) Imágenes del TEM de la vía B.1 y B.2 Cis. C) Resultados del diámetro hidrodinámico en número y de la carga superficial de la vía B.1 y B.2 Cis. D) Resultados de ICP-MS del sistema vía B Cis.

4.4.1.3. Vía C Cis

El fármaco se ha ligado al sistema EDS1 por encapsulación al polisacárido del sistema a través de los grupos carboxílicos del glucurónico del HA (Figura 3.13). Se prepararon diferentes concentraciones de Cis (C.1, C.2 y C.3) en la encapsulación.

En la vía C Cis se volvió a utilizar el UV-Vis, el TEM y el ICP-MS como técnicas más comunes para caracterizar el sistema EDS-fármaco. El UV-Vis mostró un valor máximo de SPR de 525 nm para las tres concentraciones (C.1, C.2 y C.3) (Figura 4.35 A). Las imágenes del TEM mostraron las AuNPs sin agregaciones (Figura 4.35 B). Los radios hidrodinámicos de los tres productos incrementaron al disminuir la concentración de Cis pero en el Pot-Z los valores obtenidos incrementan el valor negativo al incrementar la concentración de Cis (Figura 4.35 C). Los valores obtenidos en el análisis de ICP-MS fueron valores muy elevados para el producto C.1 Cis, obteniendo 96698,84 moléculas de Cis por cada AuNP (Figura 4.35 D).

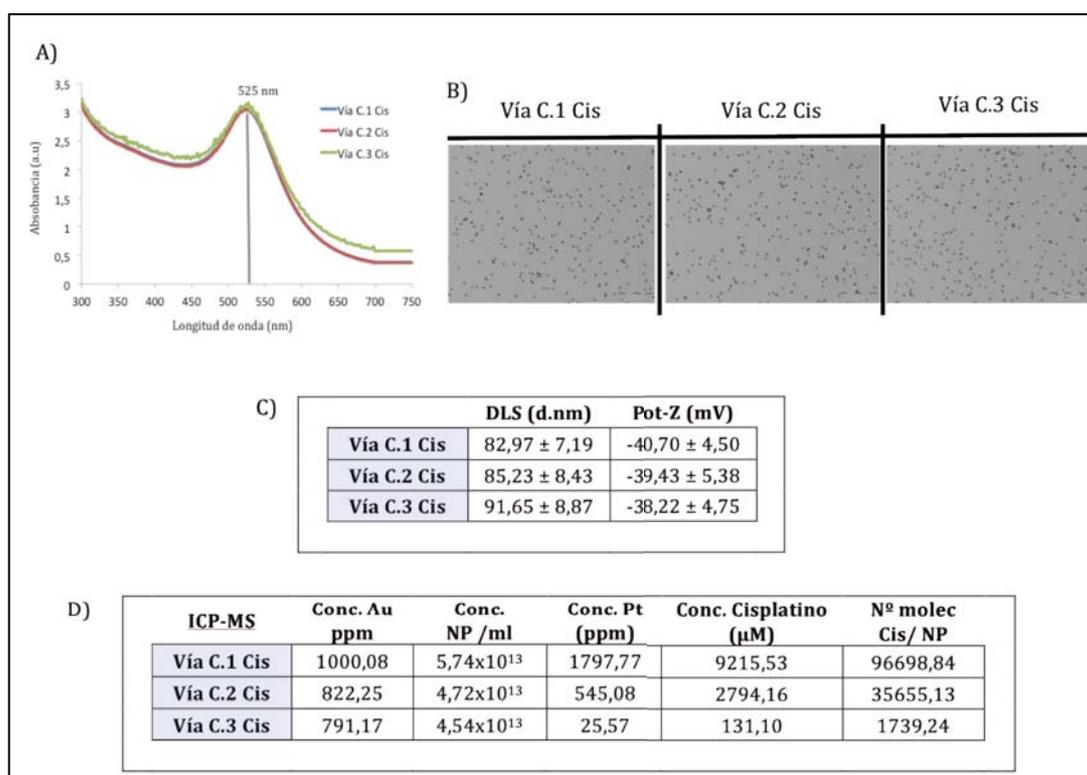


Figura 4.35 Caracterización de la vía C Cis. A) Espectro del UV-Vis de la vía C.1, C.2 y C.3 Cis. B) Imágenes del TEM de la vía C.1, C.2 y C.3 Cis. C) Resultados del diámetro hidrodinámico en número y de la carga superficial de la vía C.1, C.2 y C.3 Cis. D) Resultados de ICP-MS del sistema vía C Cis.

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

4.4.1.4. Caracterización de C.1 Cis

El compuesto vía C.1 Cis resultó ser el compuesto que más fármaco encapsuló (Figura 4.35 C). Se siguió caracterizando el compuesto C.1 Cis mediante AEO, TGA y RMN.

El análisis por AEO del compuesto C.1 Cis dio un valor de 2315,32 moléculas de HA respecto a una AuNP y una concentración de Cis de 9135,46 μ M (Tabla 4.18).

AEO		
	Nº molec HA/AuNP	μ M Cis
Vía C.1 Cis	2315,32 \pm 89,54	9135,46 \pm 4,29

Tabla 4.18 Caracterización de C.1 Cis por AEO.

El análisis por TGA (Anexo Figura 7.11) dio un valor del 43,58% para HASH y 18,33% para el Cis. La muestra para TGA fue liofilizada y se observó una humedad en la muestra del 2,79%. El 35,3% restante correspondió al Au.

Comparando los datos del TGA (Anexo Figura 7.11) con los del AEO (Tabla 4.18) e ICP-MS (Figura 4.35 D), se obtuvieron unos valores en porcentaje de materia muy parecidos y comparativos entre técnicas (Tabla 4.19).

	ICP-MS y AEO	TGA
% HASH	47,07	43,58
% Cis	14,83	18,33

Tabla 4.19 Comparativa del % de HASH y Cis mediante ICP-MS, AEO y TGA.

El RMN del compuesto vía C.1 Cis (Anexo Figura 7.12) no se diferencia del HASH 30-50 kDa (Anexo Figura 7.3 B). El hecho de tener AuNPs en la solución de análisis da señales más anchas y menos definidas.

4.4.1.5. Estabilidad del producto C.1 Cis

Se estudió la estabilidad en el tiempo del producto vía C.1 Cis en las condiciones de almacenaje (solución acuosa a 4 °C), donde se observó que la pérdida de Cis fue de un 10% tras 1 mes y se mantuvo a los 3 meses (Figura 4.36).

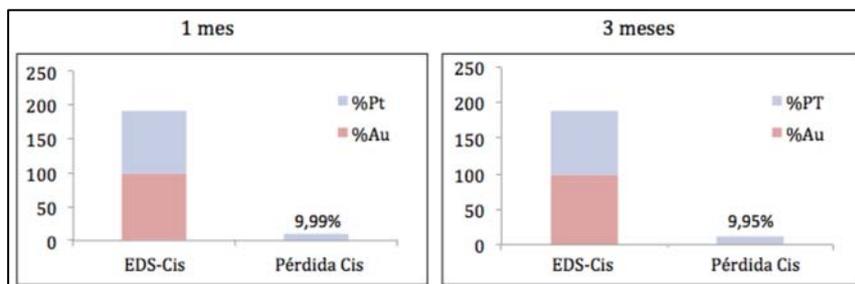


Figura 4.36 Estudio de estabilidad caracterizando la pérdida de Pt del Cis en C.1 Cis. Tiempo de análisis 1 y 3 meses.

En la Figura 4.37 se muestra la influencia del pH en la liberación del fármaco. Para pH 7, pH 5 y pH 3 en PBS la liberación del cisplatino fue creciente con el tiempo. Se observó que a pH 3, a las 24 h la liberación de platino es mayor que a pH 5 y 7 respectivamente.

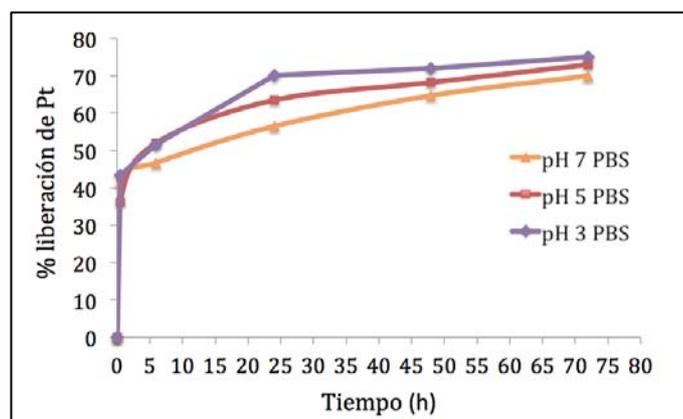


Figura 4.37 Influencia del pH en la liberación del Cis del C.1 Cis. La liberación del Pt del Cis en el tiempo (0h, 30', 1h, 6h, 24h, 48h y 72 h) influenciado por el pH 7, pH 5 y pH 3 en PBS.

Los resultados de estabilidad con la enzima hialuronidasa (Figura 4.38) mostraron el efecto de la enzima catalizando la hidrólisis del HA y liberando todo el Cis encapsulado.

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

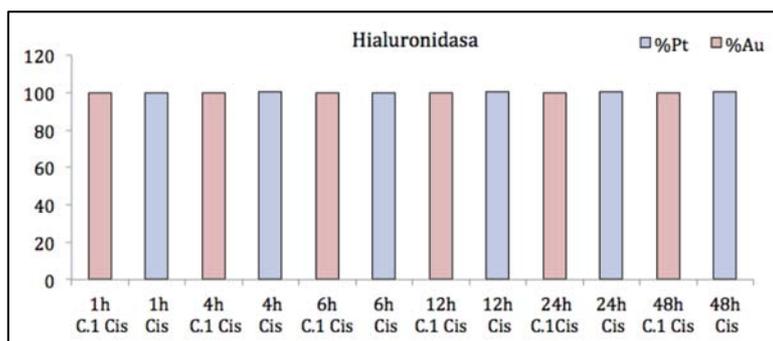


Figura 4.38 Influencia de la hialuronidasa en la liberación del Cis en C.1

Cis. La liberación del Pt del Cis en el tiempo (1h, 4h, 6h, 12h, 24h y 48 h).

4.4.1.6. Eficacia *in vitro* del sistema C.1 Cis

Se testó *in vitro* el sistema C.1 Cis añadiendo como control el EDS1 y el Cis. El IC50 calculado del experimento de citotoxicidad en la línea celular Panc-1, dio como resultado valores similares para el C.1 y el Cis, (Tabla 4.20).

IC50	Panc-1	
	Ppm Au	μM Cis
EDS1	97 ± 42	-
Cis	-	11,5 ± 2,6
C.1 Cis	1,9 ± 1	8,3 ± 4

Tabla 4.20 Valores de IC50 del C.1 Cis. Experimento de citotoxicidad realizado en Panc-1 a EDS1, Cis y C.1 Cis.

4.4.2. Síntesis y caracterización de EDS1 con oxaliplatino

4.4.2.1. Vía A Oxa

La vía A se diseñó con el objetivo de tener el fármaco modificado con capacidad de unirse a las AuNPs a través de tioles (Figura 3.14), a diferentes concentraciones (A.1 Y A.2).

La caracterización realizada al sistema A Oxa fue análoga a la de Cis, utilizando las mismas técnicas de caracterización. El UV-Vis dio máximos de SPR diferentes en las dos concentraciones A.1 y A.2 Oxa (Figura 4.39 A), sin embargo en las imágenes de TEM no se observaron aglomerados (Figura 4.39 B). Los valores de DLS y Pot-Z de las dos muestras mostraron valores similares entre ellos (Figura 4.39 C). El ICP-MS mostró más número de moléculas de Oxa para el A.1 que para el A.2 (Figura 4.39 D).

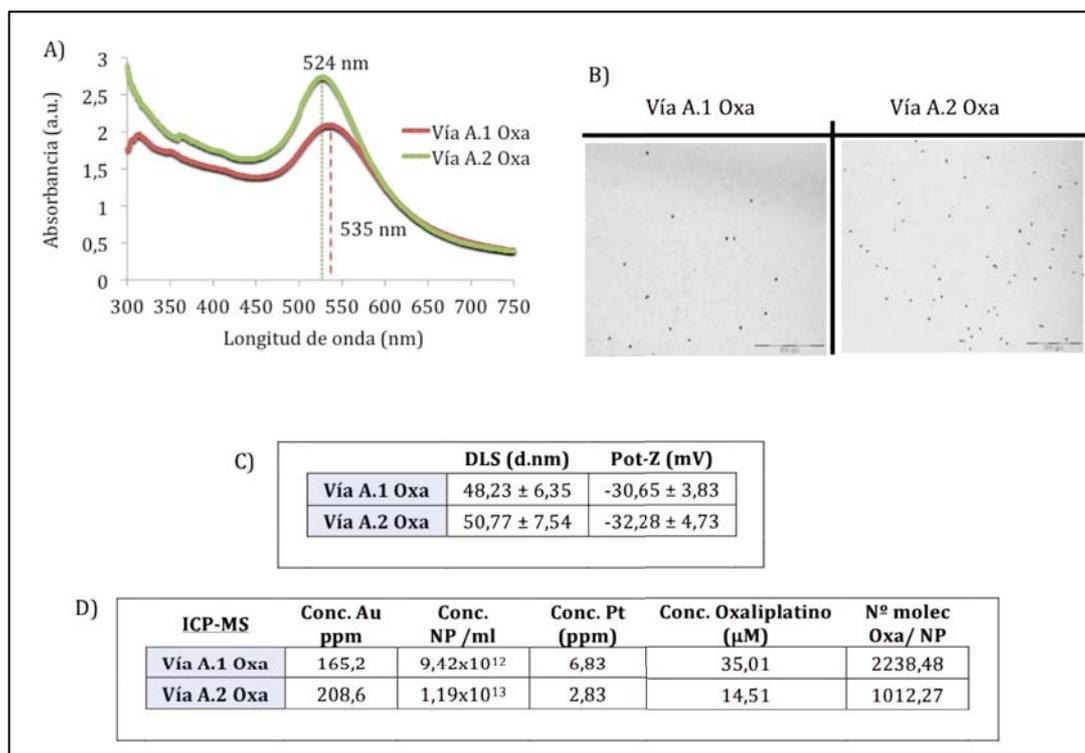


Figura 4.39 Caracterización de la vía A Oxa. A) Espectro del UV-Vis de la vía A.1 y A.2 Oxa. B) Imágenes del TEM de la vía A.1 y A.2 Oxa. C) Resultados del diámetro hidrodinámico en número y de la carga superficial de la vía A.1 y A.2 Oxa. D) Resultados de ICP-MS del sistema vía C Oxa.

4.4.2.2. Vía B Oxa

El fármaco se ha ligado al sistema EDS1 por encapsulación al polisacárido, través de los grupos carboxílicos (Figura 3.15). Se realizaron tres conjugaciones a concentración diferentes de Oxa (B1, B2 y B3).

La vía B Oxa en su caracterización por UV-Vis dio un máximo de SPR en las tres concentraciones (B.1, B.2 y B.3) de 525 nm (Figura 4.40 A). En el estudio por TEM, las imágenes mostraron las AuNPs en estado monodisperso (Figura 4.40 B). El radio hidrodinámico de las tres conjugaciones son valores entre 92 y 94 nm de diámetro y la carga superficial son valores que fueron desde -36 y -37 mV (Figura 4.40 C). Aunque el DLS y el Pot-Z dieron valores similares para las tres concentraciones, el ICP-MS mostró diferentes encapsulaciones para el fármaco (Figura 4.40 D). El número de moléculas de Oxa por AuNP fue de 4418,02 para el B.1, 1714 para B.2 y 993,27 para B.3.

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

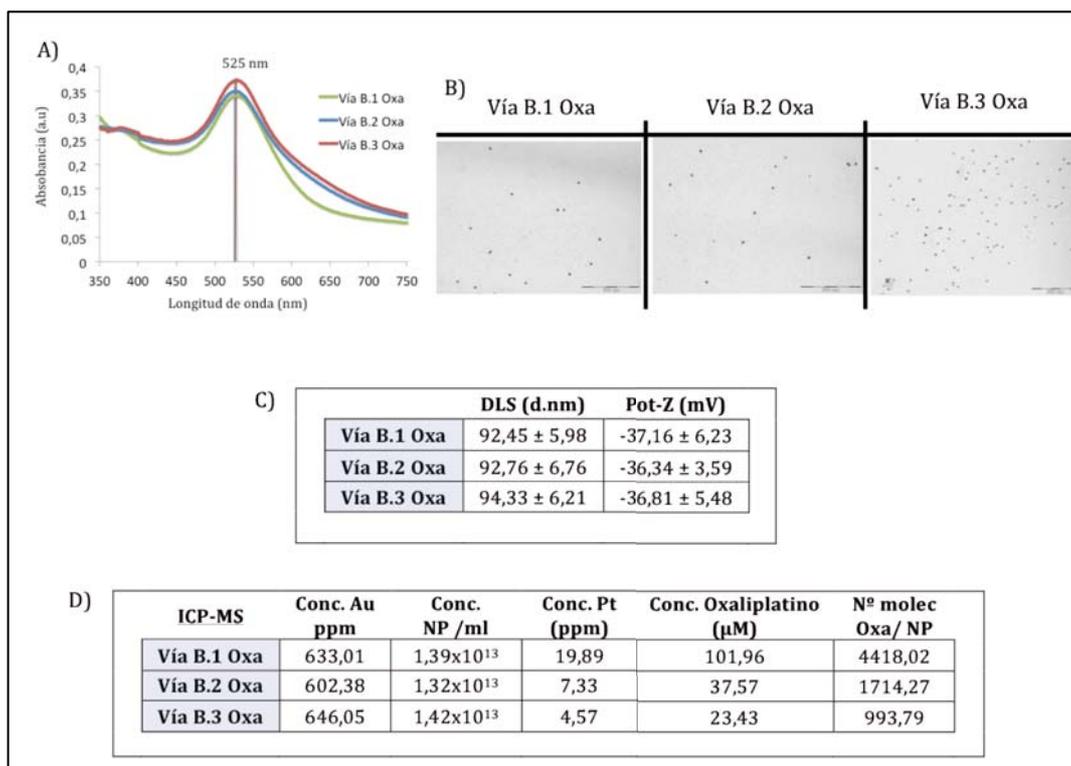


Figura 4.40 Caracterización de la vía B Oxa. A) Espectro del UV-Vis de la vía B.1, B.2 y B.3 Oxa. B) Imágenes del TEM de la vía B.1, B.2 y B.3 Oxa. C) Resultados del diámetro hidrodinámico en número y de la carga superficial de la vía B.1, B.2 y B.3 Oxa. D) Resultados de ICP-MS del sistema vía B Oxa.

4.4.2.3. Eficacia *in vitro* de los sistemas EDS1-oxaliplatino

Se analizó el IC₅₀ del fármaco individual y el sistema EDS1 *versus* los sistemas que mostraron mayor encapsulación de Oxa (A.1, B.1 y B.2 Oxa) en la línea celular Panc-1 (Tabla 4.21). El IC₅₀ del producto A.1 Oxa fue el valor más tóxico de los analizados, seguido por B.1, mientras que la vía B.2 fue similar al fármaco individual.

IC ₅₀	Panc-1	
	Ppm Au	μM Oxa
EDS1	97 ± 42	-
Oxa	-	15,84 ± 1,30
A.1 Oxa	10,50 ± 1,23	2,05 ± 2,17
B.1 Oxa	45,60 ± 2,13	7,34 ± 2,32
B.2 Oxa	104,92 ± 1,87	15,78 ± 1,45

Tabla 4.21 Valores de IC₅₀ de la vía B Oxa. Experimento de citotoxicidad realizado en Panc-1 a EDS1, Oxa, A.1, B.1 y B.2 Oxa.

4.4.3. Síntesis y caracterización de EDS1 con 5-fluorouracilo

4.4.3.1. Vía A 5-Fu

Se estudiaron las posibles opciones que se describen en el apartado 3.2.5.3.1, siendo las dos concentraciones A.1 5-Fu y A.2 5-Fu las analizadas por UV-Vis y TEM (Figura 4.41).

En el espectro de UV-Vis se observó la polidispersidad y aglomeración de la muestra reflejado en la anchura de la curva del espectro (Figura 4.41 A). Además, en las imágenes del TEM se observó agregación de las AuNPs (Figura 4.41 B).

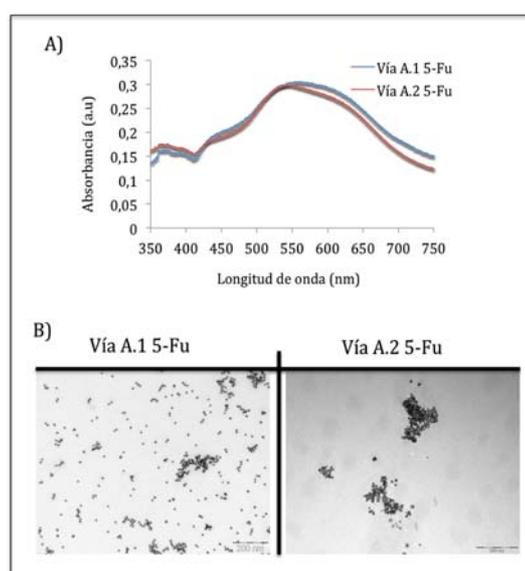


Figura 4.41 Caracterización de la vía A 5-Fu. A) Espectro del UV-Vis de la vía A.1 y A.2 5-Fu. B) Imágenes del TEM de la vía A.1 y A.2 5-Fu.

4.4.3.2. Vía B 5-Fu

La síntesis de la vía B 5-Fu se caracterizó por la modificación del 5-Fu al cual se le añadió un grupo funcional tiol (-SH). Este grupo tiol es el responsable de la unión covalente entre la AuNP y el 5-Fu (Apartado 3.2.5.3.2).

Derivado ácido 5-Fu

El ácido derivado de 5-Fu se caracterizó mediante RMN ¹H (Anexo Figura 7.13), obteniéndose la asignación de todas las señales de la estructura del ácido derivado del 5-Fu:

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

-Asignación del ácido derivado (Anexo Figura 7.13): ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm): 4,36 (2H, s, N-CH₂-COOH); 8,09 (1H, d, C=CH₂-N,5-FU); 11,9 (1H, -OH).

Adicionalmente, también se realizó un espectro de RMN de ^{19}F (Anexo Figura 7.14):

-Asignación del ácido derivado: (^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm):170,56 (1F, S, 5-Fu).

Derivado tiolado 5-Fu

Se realizó el espectro ^1H RMN (Anexo Figura 7.15) del derivado tiolado del 5-Fu:

-Asignación de la estructura del derivado tiolado 5-Fu: ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm): 2,7 (2H,t,-S-CH₂-C-); 4,2 (2H,s,N-CH₂-CONH-); 7,6 (1H,d, C=CH₂-N,5-FU); 8,3 (1H,t, -C-NH-CO-).

También se realizó un espectro de RMN de ^{19}F (Anexo Figura 7.16):

-Asignación del 5-Fu tiolado: ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm): 169,9 (F, S, 5-Fu).

El HPLC-MS realizado al compuesto 5-Fu tiolado dio la masa exacta de 492,4578 Da del producto (Anexo Figura 7.17).

Una vez se obtuvo la modificación de la molécula de 5-Fu, se llevó a cabo la conjugación con el EDS1. Previamente se realizaron experimentos de solubilidad y agregación.

Conjugación con EDS1

La molécula de 5-Fu modificada fue disuelta en DMSO y conjugada a las AuNPs, no se disolvió y dieron agregación. Sin embargo, cuando se conjugó previamente el HASH 30-50 kDa a la solución de NPs dió como resultado la no agregación.

Se realizó un espectro de RMN de ^{19}F (Anexo Figura 7.18) para verificar la conjugación. Se observaron dos picos de ^{19}F lo que demostró que la conjugación no se realizó homogéniamente:

-Asignación al espectro del conjugado EDS1-5-Fu: ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400MHz, ppm): 76,0; 169,9 (F, S, S, 5-Fu).

4.4.3.3. Vía C 5-Fu

La tercera vía de síntesis para el sistema EDS1-5-Fu consistió en la activación de los grupos carboxilo del HASH, para favorecer la unión de la molécula 5-Fu (Apartado 3.2.5.3.3).

En la reacción de activación del hialurónico y conjugación con el 5-Fu, se detectó dos picos en el espectro de RMN (Anexo Figura 7.19) igual que en la vía B 5-Fu:

-Asignación al espectro del conjugado EDS1-5-Fu: ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400MHz, ppm): 76,0; 169,8 (F, S, S, 5-Fu).

4.4.4. Discusión

4.4.4.1. Elección de los fármacos

Una vez escogido el EDS1 por sus características como sistema para la liberación de fármacos, se eligieron las moléculas con actividad antitumoral para validarlo. Se experimentó con Cis y Oxa, dos fármacos platinados con amplias utilidades y además de fácil trazabilidad; el 5-Fu se escogió para validar un fármaco con un mecanismo de actuación diferente respecto a los anteriores fármacos.

Se conoce que la configuración espacial para Cis (Pt II) es planar, mientras que para Oxa (Pt IV) es octaédrica. A su vez, dentro de los compuestos Pt (II), se distinguen dos isómeros según su disposición "cis" o "trans". La especie química Cis es la que tiene actividad antitumoral y se nombró cisplatino (Harder et al., 1975). El Oxa, también con actividad antitumoral, tiene farmacocinética, distribución tisular y toxicidad diferente a la del Cis (Fink et al., 1996; Rixe et al., 1996; Spingler et al., 2001). Este fármaco es activo en algunas líneas celulares que adquieren resistencia al Cis (Beale et al., 2003; Raymond et al., 2002).

Los fármacos escogidos se estudiaron para conjugarlos al sistema EDS1 a través del HASH o de ligandos. Se sintetizaron a través de enlaces sensibles al pH para

su posterior liberación en el entorno tumoral, además de la liberación vía degradación de HA por las hialuronidasas presentes en la membrana celular.

Un ejemplo de liberación dependiente del pH es el óxido nítrico (regula múltiples procesos celulares incluyendo la angiogénesis, vasodilatación y respuesta inmune) en condiciones ácidas (pH 3) a partir de sus nanoconjugados covalentes con AuNPs estabilizadas con poliamina (Mocellin et al., 2007; Polizzi et al., 2007). Este mecanismo tiene aplicación en la liberación de fármacos en el interior de los tejidos inflamatorios y tumorales (pH 6,8) o vesículas celulares como endosomas (pH 5,5-6) y lisosomas (pH 4,5-5,0) que presentan un ambiente ligeramente ácido (Engin et al., 1995; Mellman et al., 1986).

4.4.4.2. Validación EDS1 con cisplatino

Vía A Cis

El sistema vía A Cis requirió de un ligando cuya síntesis (Apartado 3.2.5.1.1) y caracterización (Apartado 4.4.1.1.1) se realizaron con éxito obteniendo el producto L purificado. Además de contener el tiol necesario para el enlace con la AuNP, el enlace L-Cis es sensible al cambio de pH como se describe en la bibliografía (Xu et al., 2009). Una vez realizado este paso, se sintetizó el complejo de la vía A Cis con dos concentraciones diferentes (A.1 y A.2) y se caracterizó obteniendo mas encapsulación de Cis en A.1 Cis que en A.2 Cis (Figura 4.33 D), siendo los dos conjugados estables y homogéneos.

Vía B Cis

El sistema vía B Cis (Figura 4.34) se conjugó correctamente para las dos concentraciones (B.1 Cis y B.2 Cis) y se obtuvieron sistemas homogéneos y estables. La encapsulación de Cis es mayor para el conjugado B.1 Cis.

El ligando MUA contiene el grupo $-COO^-$ que permite liberar el Cis vía pH. Esta propiedad ha sido estudiada por Ren, creando un sistema de liberación de fármacos basado en Au-Au₂S conjugadas con MUA y Cis. Dio un resultado de máxima absorción de Cis (80%) en la superficie de las NPs justificando la dependencia del sistema con el pH (Ren et al., 2003). También Comenge realizó una conjugación de MUA con AuNPs y Cis justificando una liberación pasiva controlada del fármaco por pH, además de la

influencia de cargas en el sistema de coordinación MUA-Cis (Comenge et al., 2010). Tanto Ren como Comenge utilizan sistemas de NPs conjugadas a MUA y Cis pero no tienen en el sistema ningún compuesto que lo dirija a las células tumorales.

Vía C Cis

Las tres concentraciones sintetizadas en la vía C Cis fueron caracterizadas. Los valores más estables son para el C.1 Cis con menor tamaño de diámetro de partícula y más carga negativa en superficie (Figura 4.35).

Comparando todos los conjugados de Cis (vía A, B y C Cis) (Figura 4.33, Figura 4.34 y Figura 4.35), el complejo vía C.1 Cis es el que más Cis encapsula de todos. A mayor encapsulación de fármaco, menos concentración del sistema deberemos administrar para conseguir el mismo efecto.

Los resultados obtenidos mediante la caracterización por AEO, TGA e ICP-MS del C.1 Cis (Tabla 4.18 y Tabla 4.19) dieron valores de encapsulación del fármaco similares a los estudios de Jeong (Jeong et al., 2008) pero ligeramente inferior a los estudios de Xie (Xie et al., 2010). Tanto Jeong como Xie sintetizaron sistemas que encapsulaban Cis, pero sin AuNPs, las cuales, ayudarían a que la llegada del fármaco a la célula sea más masiva.

Jeong sintetizó NPs de HA con Cis, donde presenta la fracción molar del disacárido/Cis entre 17 y 5,6; mientras que para nuestro C.1 Cis ese valor equivale a 6,6 (mediante los resultados de Tabla 4.18 y Tabla 4.19). Sin embargo, hay que destacar que Jeong trabajó con HA de 1,5 MDa. El HA es de peso molecular mas elevado que el utilizado para el EDS1 y por tanto tiene mas posiciones donde enlazar el Cis y por tanto, aumentar el grado de encapsulación.

Xie utilizó un tamaño de HA similar al del EDS1 (35 kDa), obteniendo porcentajes de eficacia de la conjugación de Cis de entre el 73% al 34%. Los valores para C.1 Cis, teniendo en cuenta la adición inicial de Cis al sistema (Apartado 3.2.5.1.3) y el valor final de conjugación mediante AEO (Tabla 4.18), se obtuvo un 37% de eficacia. Aunque el valor de eficacia es menor para el sistema C.1 Cis que el publicado por Xie, en nuestro sistema la liberación del fármaco en las mismas condiciones es menor (Figura 4.36 y Figura 4.37), obteniendo así un sistema de liberación que se

4.4 CONJUGACIÓN DEL EDS1 AL FÁRMACO ANTITUMORAL

mantendrá estable durante más tiempo en circulación. El sistema de Xie a las 20 h en PBS ha liberado más de un 60%, mientras que el C.1 Cis a pH 7 PBS a las 20 h ha liberado un 52% aproximadamente de Cis (Figura 4.37). Además, en H₂O el C.1 Cis es estable, mientras que el sistema publicado por Xie libera el fármaco (Figura 4.36).

La Figura 4.37 muestra la influencia del pH en la liberación del fármaco en el C.1 Cis en diferentes condiciones. Se observó que a pH 3 a las 24 h la liberación de platino fue mayor debido a que a pH ácido el HA se hidroliza en β -(1 \rightarrow 4) y por tanto libera el fármaco. El pH 7 fue el más estable, siendo más estable en H₂O (Figura 4.36) que en PBS. Esto justificaría que la liberación en PBS a pH 7 fue debido a los iones del PBS y no por al pH. Esta descrito (Mráček et al., 2008) que la degradación del HA está influenciada, principalmente, por la temperatura, la composición de la solución, y también por el pH. Describen la influencia de los iones en el comportamiento del HA, mostrando como resultado una dependencia entre la solvatación del HA en agua y la fuerza iónica que en particular estudiaron sobre la variedad de sal disociada. Estos resultados muestran que la solvatación de HA por el agua es fuertemente dependiente de la fuerza iónica y en particular de la variedad de sal disociada en las soluciones acuosas de HA (NaCl, MgCl₂, KI, KF).

La liberación de Cis al incubar el sistema con hialuronidasa (Figura 4.38) hace pensar que al llegar el sistema a la célula vía CD44, las hialuronidasas degradaran el HA y liberaran dentro de la célula el Cis, sumándose también la vía de liberación del fármaco por el cambio de pH que se produce al entrar en la célula (Furukawa et al., 2013), además de que el entorno celular del tumor es ácido. Esta hipótesis se respalda con los resultados de internalización celular del sistema C.1 Cis que se muestran en la tesis doctoral de Hanna Parkkola (Hanna Parkkola, *Hyaluronic acid coated gold nanoparticles as an anti-cancer drug delivery system-biological characterization and efficacy*, Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, pendiente de publicación), donde el sistema C.1 Cis fue incubado en las células (Panc-1). La internalización del Au y Pt fueron analizados por ICP-MS, dando como resultado más internalización de Pt que de Au en proporción al sistema sintetizado. El hecho de que internalice más Pt confirma que la liberación gracias al efecto de las hialuronidasas existe y empieza a liberar el Cis antes de la internalización del sistema completo (C.1 Cis) y se libere por pH.

Finalmente se realizaron experimentos de citotoxicidad para el C.1 Cis (Tabla 4.20) donde no se observaron diferencias significativas entre el IC50 de Cis y de C.1 Cis. Xie, con su conjugado HA-Cis tampoco vio diferencias en el valor de IC50 con el Cis en la línea humana de pulmón A549 (Xie et al., 2010). Las ventajas que aporta un sistema liberador de fármacos es que protegen a la droga y la dirigen directamente a las células tumorales, evitando los tejidos sanos y aumentando la acumulación en el tumor. Es por eso que las técnicas *in vitro* no son las técnicas más idóneas para comprobar la mejora de la eficacia. Sin embargo, en la tesis de Hanna Parkkola, antes mencionada, se realizaron experimentos *in vivo* con el C.1 Cis obteniendo más eficacia que con el fármaco Cis, tratando ratones atómicos con tumores subcutáneos de páncreas.

4.4.4.3. Validación EDS1 con oxaliplatino

Vía A Oxa

El sistema vía A Oxa fue diseñado homológamente al vía A Cis, utilizando el ligando L para unir el fármaco con la AuNP. La caracterización realizada a las dos concentraciones (A.1 y A.2 Oxa) (Figura 4.39) dieron resultados diferentes, obteniendo un sistema A.1 Oxa estable y homogéneo, mientras que el resultado de UV-Vis para A.2 Oxa mostró un desplazamiento del SPR mayor del esperado (Figura 4.39 A). Sin embargo las imágenes de TEM (Figura 4.39 B) y el tamaño de partícula por DLS (Figura 4.39 C) no mostraron la agregación que se intuía en el desplazamiento del SPR.

Vía B Oxa

La vía B Oxa se sintetizó con el diseño de conjugación de la vía C Cis. El fármaco se retuvo entre las moléculas del HASH mediante sus grupos funcionales $-COO^-$. La caracterización realizada a estos tres compuestos (B.1, B.2 y B.3 Oxa) dio sistemas estables y homogéneos (Figura 4.40). El sistema B.1 Oxa dio un diámetro de partícula menor y el resultado de Pot-Z fue más negativo (Figura 4.40 C), además se retuvo mayor cantidad de Oxa que el resto de conjugados (B.2 y B.3 Oxa) (Figura 4.40 D).

Se realizaron experimentos de citotoxicidad de los compuestos que más Oxa encapsularon (A.1, B.1 y B.2 Oxa). Los IC50 en la línea celular Panc-1 dio un valor más tóxico en A.1 Oxa respecto al Oxa (Tabla 4.21).

En el estudio de Brown donde encapsula Oxa mediante PEG (Polietilenglicol tiolado) a las AuNPs, se realizaron estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares (Brown et al., 2010). Dependiendo de las líneas celulares se obtuvieron valores de IC50, que diferían más del control de Oxa que el candidato B.1 Oxa (Tabla 4.21), sin embargo, en otras líneas el incremento fue menor.

4.4.4.4. Validación EDS1 con 5-fluorouracilo

Vía A 5-Fu

Para completar la validación de EDS1, se utilizó un fármaco que actúa diferente a los anteriores, el 5-Fu. En este caso también se utilizó como una de las estrategias, la unión del ligando L. La caracterización mostró para las diferentes concentraciones (A.1 y A.2 5-Fu), un sistema no estable y polidisperso (Figura 4.41). El espectro de UV-Vis mostró sistemas agregados por su anchura de curva en el espectro, además de un SPR desplazado al color azul (Figura 4.41 A). El TEM confirmó que habían AuNPs aglomeradas y mostraron sistemas polidispersos (Figura 4.41 B). Un estudio realizado por Mohamed et.al, (Mohamed et al., 2012) mostró los resultados del 5-Fu con AuNPs donde el espectro de UV-Vis, también está desplazado hacia el azul y la anchura de curva también aumentó. Además las imágenes de TEM mostradas son AuNPs aglomeradas.

Vía B 5-Fu

La estrategia en la vía B 5-Fu es diferente al resto que se han descrito hasta el momento en la presente tesis. El B 5-Fu se modificó para obtener el tiol en la molécula y luego conjugarlo al sistema EDS1; en las anteriores conjugaciones la adición del fármaco se realizaba sobre el ligando que ya se encontraba ligado al EDS1.

La síntesis del ácido derivado del 5-Fu (Apartado 3.2.5.3.2) se realizó según estudios previos (Huang et al., 2005; Xiong et al., 2009; Zhou et al., 2010). Se realizó un ^1H RMN (Anexo Figura 7.13) y la asignación de señales concuerda con las descritas por Huang en sus estudios. La señal encontrada en el espectro de RMN ^{19}F (Anexo Figura 7.14) se desplazó 1 ppm respecto al comercial (Figura 7.20):

-Asignación del 5-Fu comercial: (^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm): 171,86; 171,84 (1F, d, 5-Fu).

La síntesis de la tiolación del derivado ácido del 5-Fu (Apartado 3.2.5.3.2) se realizó siguiendo la reactividad experimentada en los estudios de Xiong (Xiong et al., 2009). La verificación del compuesto fue realizada mediante ^1H RMN, ^{19}F RMN y HPLC-MS (Anexo Figura 7.15, Figura 7.16 y Figura 7.17) que demostraron la obtención del compuesto diseñado.

El hecho de obtener dos señales en el espectro de RMN ^{19}F de la conjugación del 5-Fu tiolado con el EDS1 (Anexo Figura 7.18) confirmó dos especies diferentes.

Vía C 5-Fu

La conjugación de la vía C 5-Fu fue diseñada análogamente a la vía C Cis y B Oxa, donde el fármaco se enlaza al HA del EDS1. El resultado mediante ^{19}F RMN (Anexo Figura 7.19) del compuesto C 5-Fu confirmó que la síntesis, tampoco fue la esperada, ya que aparecen dos señales demostrando dos especies diferentes.

Las dos señales de los espectros ^{19}F RMN para las vías B y C 5-Fu (Anexo Figura 7.18 y Figura 7.19) se mostraron en el mismo valor de desplazamiento, por lo que parece que el 5-Fu se conjuga de la misma manera en las dos vías. Quedan por determinar estas señales, pero podrían pertenecer a la conjugación del fármaco directamente a la AuNP y al grupo carboxílico del HASH. Las amidas y aminas tienen afinidad por la superficie de la AuNP, como se ha comentado anteriormente (Apartado 4.1.5.1), además de poder realizar una sustitución nucleófila en el grupo carboxilo del D-glucurónico del HASH.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los objetivos de la tesis marcados para desarrollar y validar un sistema de liberación de fármacos se han logrado con éxito, concluyendo que:

- Se puso a punto la síntesis y la correcta caracterización de AuNPs como portador del sistema, obteniendo tamaños de 4 nm y 12 nm, con escalabilidad tanto de volumen como de concentración para su posterior fabricación industrial. Además, se validó el autoclavado como técnica para esterilizar la solución coloidal, un paso imprescindible previo a los estudios pre-clínicos.
- Se obtuvo un HA tiolado y pudo ser correctamente caracterizado. La caracterización muestra evidencias de la incorporación del -SH en la parte terminal de la molécula. Además, estos estudios han permitido conocer el carácter anfipático del HASH.
- Se consiguió la conjugación óptima de las AuNPs con el HASH, con los diferentes tamaños. La caracterización, puesta a punto para estos nanosistemas, nos confirma que son NPs estables en diferentes medios. Además, se escogió el método de esterilización por filtración por ser el que menos afectó al sistema. A través de los experimentos *in vitro* se concluyó que el EDS1 era el candidato más adecuado como sistema de liberación, ya que fue el que más se internalizó en la línea celular Panc-1.
- Los fármacos seleccionados se consiguieron unir al sistema EDS1 a través de diferentes vías que aseguraban una liberación inducida por el cambio de pH intracelular.
- El fármaco Cis fue conjugado con éxito por diferentes vías, mostrando estabilidad. El conjugado obtenido por la vía C.1 Cis, fue el que presentó una mayor concentración de fármaco. Las pruebas realizadas

CONCLUSIONES

con este candidato confirmaron que la liberación del fármaco se produce por la variación del pH. Finalmente, también demostró que el fármaco unido al EDS1 tiene una eficacia *in vitro* superior que el fármaco solo.

- El fármaco Oxa pudo ser conjugado con éxito por dos de las vías analizadas obteniendo sistemas estables. Además, se demostró *in vitro* que la eficacia de estos candidatos es superior a la del fármaco solo.
- El fármaco 5-Fu no pudo ser conjugado con éxito. Las vías estudiadas producían la agregación de las nanopartículas o no podían ser purificadas. Nuevas estrategias serán estudiadas para poder conjugar este fármaco.

El sistema de liberación se ha podido validar con dos de los tres fármacos estudiados con los que se han obtenido compuestos con una concentración controlada de fármaco y estables tanto en agua como en medios fisiológicos. Los fármacos son liberados al producirse el cambio de pH esperado a nivel intracelular y presentan mayor eficacia antitumoral que el fármaco estándar.

Esta tesis demuestra que, la tecnología basada en nanopartículas metálicas conjugadas a oligosacáridos de ácido hialurónico funciona como una plataforma para la obtención de sistemas de liberación de diferentes fármacos antitumorales.

El paso siguiente es el estudio *in vivo* de estos sistemas para confirmar la eficacia y seguridad. Estos estudios se han realizado en paralelo en otra tesis (Hanna Parkkola, *Hyaluronic acid coated gold nanoparticles as an anti-cancer drug delivery system-biological characterization and efficacy*, Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, pendiente de publicación) obteniendo buenos resultados de eficacia para C.1 Cis.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLOGRAFÍA

- Abyaneh, M. K., Paramanik, D., Varma, S., Gosavi, S. W., & Kulkarni, S. K. (2007). Formation of gold nanoparticles in polymethylmethacrylate by UV irradiation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40 (12), 3771-3779. doi:10.1088/0022-3727/40/12/032
- Agasti, S. S., Chompoosor, A., You, C.-C., Ghosh, P., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2009). Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 5728-5729. doi:10.1021/ja900591t
- Aiken, J. D., & Finke, R. G. (1999). A review of modern transition-metal nanoclusters: Their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 145(1-2), 1-44. doi:10.1016/S1381-1169(99)00098-9
- Alivisatos, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P., & Schultz, P. G. (1996). Organization of "nanocrystal molecules" using DNA. *Nature*, 382, 609-611. doi:10.1038/382609a0
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research : An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 12(7), 2313-2333. doi:10.1007/s11051-010-9911-8
- Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S., & Neubert, R. (2003). Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), 545-550. doi:10.1016/S0731-7085(02)00682-9
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303, 1818-1822. doi:10.1126/science.1095833
- Allison, D. D., & Grande-Allen, K. J. (2006). Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering*, 12, 2131-2140. doi:10.1089/ten.2006.12.ft-153

BIBLIOGRAFÍA

- Altman, R. D., & Moskowitz, R. (1998). Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. *Hyalgan Study Group. The Journal of rheumatology*, *25*, 2203–2212.
- Amaral, M., Gomes, P. S., Lopes, M. A., Santos, J. D., Silva, R. F., & Fernandes, M. H. (2008). Nanocrystalline Diamond as a Coating for Joint Implants: Cytotoxicity and Biocompatibility Assessment. *Journal of Nanomaterials*, 1-9. doi:10.1155/2008/894352
- Ammann, A. A. (2007). SPECIAL FEATURE: Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of mass spectrometry*, *42*, 419–427. doi:10.1002/jms
- Apyari, V. V, Dmitrienko, S. G., Arkhipova, V. V, Atnagulov, A. G., & Zolotov, Y. A. (2012). Determination of cysteamine using label-free gold nanoparticles. *Anal. Methods*, *4*(10), 3193–3199. doi:10.1039/C2AY25675D
- Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2012). Nano-regenerative medicine towards clinical outcome of stem cell and tissue engineering in humans. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(9), 1991–2000. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01534.x
- Azzopardi, E. a, Ferguson, E. L., & Thomas, D. W. (2013). The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*, 257–74. doi:10.1093/jac/dks379
- Bae KH, Chung HJ, P. T. (2011). Nanomaterials for Cancer Therapy and Imaging. *Molecules and cells*, *32*, 295-302. doi: 10.10071s10059-011-0051-5
- Balazs, E. (1979). *U.S. Patent, 4,141,973*.
- Balazs. E.A. (1983). Sodium hyaluronate and viscosurgery. In: Miller D, Stegmann R, editors; *A Guide to Its Use in Ophthalmic Surgery*. New York: Wiley Medical Publishers; 5–28.

- Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*, 5, 363–372. doi:10.2174/1568011054222364
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 5, 1897–1910. doi:10.1002/sml.200801716
- Barbucci, R., Leone, G., Chiumiento, A., Di Cocco, M. E., D’Orazio, G., Gianferri, R., & Delfini, M. (2006). Low- and high-resolution nuclear magnetic resonance (NMR) characterisation of hyaluronan-based native and sulfated hydrogels. *Carbohydrate Research*, 341(11), 1848–58. doi:10.1016/j.carres.2006.04.046
- Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J., & Mousa, S. A. (2008). Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(4), 273–82. doi:10.1016/j.nano.2008.06.002
- Beale, P., Judson, I., O’Donnell, A., Trigo, J., Rees, C., Raynaud, F., Turner, A., Simmons, L., Etterley, L. (2003). *A Phase I clinical and pharmacological study of cis-diamminedichloro(2-methylpyridine) platinum II (AMD473)*. *British journal of cancer*, 88, 1128–1134. doi:10.1038/sj.bjc.6600854
- Brown, S. D., Nativo, P., Smith, J.-A., Stirling, D., Edwards, P. R., Venugopal, B., Flint, D., Plimb, J., Graham, D., Wheate, N. J. (2010). Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13), 4678–84. doi:10.1021/ja908117a
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 7, 801–802.
- Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. A., & Langer, R. (2004). Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules*, 6(1), 386–391. doi:10.1021/bm049508a

- Cerdevall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggadr, T., Donnelly, SC., Cagney, G., Linse, S., Dawson, KA. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*. 46 (30), 5754–6. doi:10.1002/anie.200700465
- Champion, J. A., & Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4930–4934. doi:10.1073/pnas.0600997103
- Chen, H., Roco, M. C., Li, X., & Lin, Y. (2008). Trends in nanotechnology patents. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 123–5. doi:10.1038/nnano.2008.51
- Chen, W. Y. J., & Abatangelo, Gi. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, 7(2), 79–89. doi:10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x
- Chen, Y.-S., Hung, Y.-C., Liao, I., & Huang, G. S. (2009). Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(8), 858–864. doi:10.1007/s11671-009-9334-6
- Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., & Xia, Y. (2009). Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Letters*, 9, 1080–1084. doi:10.1021/nl803487r
- Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.-Y., Han, B. S., Kim, S.H., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(1), 16–24. doi:10.1016/j.taap.2008.12.023
- Choi, K. Y., Min, K. H., Na, J. H., Choi, K., Kim, K., Park, J. H., Kwon, I.C., Jeong, S. Y. (2009). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *Journal of Materials Chemistry*, 19(24), 4102–4107. doi:10.1039/b900456d

- Chow, M. K., & Zukoski, C. F. (1994). Gold sol formation mechanisms: role of colloidal stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 165, 97–109. doi:10.1006/jcis.1994.1210
- Cobley, C. M., Chen, J., Cho, E. C., Wang, L. V., & Xia, Y. (2011). Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 40, 44–56. doi:10.1039/b821763g
- Comenge, J., Romero, F., Sotelo, C., Domingues, F., Puentes, V. (2010). Exploring the binding of Pt drugs to gold nanoparticles for controlled passive release of cisplatin. *Journal of controlled release*, 148 (1), e21-e56. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.041
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 1, 325–327. doi:10.1002/sml.200400093
- Cowman, M. K., & Matsuoka, S. (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 340, 791–809. doi:10.1016/j.carres.2005.01.022
- Crespo, P., Litrán, R., Rojas, T. C., Multigner, M., de la Fuente, J. M., Sánchez-López, J. C., Garcia, M.A., Hernando, M.A., Penadés, S., Fernández, A. (2004). Permanent magnetism, magnetic anisotropy, and hysteresis of thiol-capped gold nanoparticles. *Physical Review Letters*, 93, 087204. doi:10.1103/PhysRevLett.93.087204
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Prémat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 16(2), 505-22. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293–346. doi:10.1021/cr030698+

- Deplanche, K., Merroun, M. L., Casadesus, M., Tran, D. T., Mikheenko, I. P., Bennett, J. a, Zhu, J., Jones, I., Attard, G., Wood, J., Seleneska-Pobell, S., Macaskie, L. E. (2012). Microbial synthesis of core/shell gold/palladium nanoparticles for applications in green chemistry. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 9(72), 1705–12. doi:10.1098/rsif.2012.0003
- Derjaguin, B., & Landau, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43(1-4), 30-59. doi:10.1016/0079-6816(93)90013-L
- Dhar, S., Daniel, W. L., Giljohann, D. A., Mirkin, C. A., & Lippard, S. J. (2009). Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 14652–14653. doi:10.1021/ja9071282
- Di Guglielmo, C., De Lapuente, J., Porredon, C., Ramos-López, D., Sendra, J., & Borràs, M. (2012). In vitro safety toxicology data for evaluation of gold nanoparticles-chronic cytotoxicity, genotoxicity and uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12, 6185–91. doi:10.1166/jnn.2012.6430
- Doane, T. L., Burda, C. (2012). The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2885–911. doi:10.1039/c2cs15260f
- Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469–478. doi:10.1038/nnano.2007.223
- Doyen, M., Bartik, K., & Bruylants, G. (2013). Journal of Colloid and Interface Science UV - Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold - citrate aggregates. *Journal of colloid and interface science*, 399, 1–5. doi:10.1016/j.jcis.2013.02.040
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2740. doi:10.1039/c1cs15237h

- Dreaden, E. C., Mackey, M. A., Huang, X., Kang, B., & El-Sayed, M. A. (2011). Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chemical Society Reviews*, 40, 3391–3404. doi:10.1039/c0cs00180e
- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101–41. doi:10.1021/mp200394t
- Eenschooten, C., Guillaumie, F., Kontogeorgis, G. M., Stenby, E. H., & Schwach-Abdellaoui, K. (2010). Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride–modified hyaluronic acid derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 597–605. doi:10.1016/j.carbpol.2009.09.011
- Engin, K., Leeper, D.B., Cater, J.R., Thistlethwaite, A.J., Tupchong, L. & Mcfarlane, J. D. (1995). Extracellular pH distribution in human tumors. *J. Hyper-therm*, 11(2), 211-216.
- ESF (2005). A report of European Science Foundation Policy Briefing. Scientific forward look on nanomedicine.
- Etheridge, M. L., Campbell, S. a, Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), 1–14. doi:10.1016/j.nano.2012.05.013
- Fadeel, B., & Garcia-Bennett, A. E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 362–374. doi:10.1016/j.addr.2009.11.008
- Faraday, M. (1857). The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 145-181. doi:10.1098/rstl.1857.0011
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug. *ACS. Nano*, 3(1), 16–20. doi:10.1021/nn900002m

BIBLIOGRAFÍA

- FDA, U. S. (2007). A Report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force July 25, 2007.
- Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. An invitation to open up a new field of physics. *Engineering and Science*, 23:5, 22.
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796–810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehmé, A., Christen, R. D., Howell, S. B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Research*, 56, 4881–6.
- Finkelstein, A. E., Walz, D. T., Batista, V., Mizraji, M., Roisman, F., & Misher, A. (1976). *Auranofin. New oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases*, 35, 251–257. doi:10.1136/ard.35.3.251
- Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 241, 20–22. doi:10.1038/physci241020a0
- Furukawa, T., Arai, M., Garcia-Martin, F., Amano, M., Hinou, H., & Nishimura, S.-I. (2013). Glycoblotting-based high throughput protocol for the structural characterization of hyaluronan degradation products during enzymatic fragmentation. *Glycoconjugate Journal*, 30(2), 171–82. doi:10.1007/s10719-012-9395-0
- Galm, U., Hager, M. H., Van Lanen, S. G., Ju, J., Thorson, J. S., & Shen, B. (2005). Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chemical Reviews*, 105, 739–758. doi:10.1021/cr030117g
- Gatej, I., Popa, M., Rinaudo, M. (2005). Role of the pH on hyaluronan behaviour in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 6,61-67. doi: 10.1021/bm40050m

- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., & Discher, D. E. (2007). Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature Nanotechnology*, 2, 249–255. doi:10.1038/nnano.2007.70
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57, 727–741. doi:10.1016/S0006-2952(98)00307-4
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1307–15. doi:10.1016/j.addr.2008.03.016
- Gibson, J. D., Khanal, B. P., & Zubarev, E. R. (2007). Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11653–61. doi:10.1021/ja075181k
- Gill, P., Werhiz, J., Scadden, D. (1996). Randomized phase III trial of liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of clinical oncology*, 14(8), 2353-64.
- Goodman. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chem.*, 15, 897–900. doi: 10/1021/bc049951i
- Gordon, A., Fleagle, J., Guthrie, D. (2001). Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *Journal of clinical oncology*, 19(14), 3312–3322.
- Gradishar, W., Tjulandin, S., Davidson, N. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(31), 7794–7803. doi:10.1200/jco.2005.04.937
- Gu, Y.-J., Cheng, J., Lin, C.-C., Lam, Y. W., Cheng, S. H., & Wong, W.-T. (2009). Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 196–204. doi:10.1016/j.taap.2009.03.009

BIBLIOGRAFÍA

- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–21. doi:10.1021/ac0702084
- Hamburg, M. A. (2012). FDA 's Approach to Regulation of Products of Nanotechnology. *Science and regulation*, 336, 11–12. doi: 10.1126/science-1205441
- Harder, H. C. (1975). Renaturation effects of cis and trans platinum II and IV compounds on calf thymus deoxyribonucleic acid. *Chemico-Biological Interactions*, 10, 27–39. doi:10.1016/0009-2797(75)90044-7
- Haruta, M., Kobayashi, T., Sano, H., & Yamada, N. (1987). Novel gold catalysts for the oxidation of carbon monoxide at a temperature far below 0.DEG.C. *Chemistry Letters*, 16(2), 405-408. doi:10.1246/cl.1987.405
- Hasan, M., Bethell, D., & Brust, M. (2002). The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: (1)H NMR spectroscopic evidence from solutions of gold clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 1132–1133. doi:10.1021/ja0120577
- Hillyer, J. F., & Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1927–1936. doi:10.1002/jps.1143
- Hoffman, A. S., Stayton, P. S., Press, O., Murthy, N., Lackey, C. A., Cheung, C., Black, F., Campbell, J., Fausto, N., Kyriakides, T. R., Bornstein, P. (2002). Design of “smart” polymers that can direct intracellular drug delivery. *Polymers for Advanced Technologies*, 13, 992–999. doi:10.1002/pat.232
- Hough, R. M., Noble, R. R. P., & Reich, M. (2011). Natural gold nanoparticles. *Ore Geology Reviews*, 42(1), 55–61. doi:10.1016/j.oregeorev.2011.07.003
- Hövel, H., Fritz, S., Hilger, A., Kreibig, U., & Vollmer, M. (1993). Width of cluster plasmon resonances: Bulk dielectric functions and chemical interface damping. *Physical Review B*, 48(24), 18178-18188. doi:10.1103/PhysRevB.48.18178

-
- Huang, J., Qu, J. Q., Wang, L. F., Liu, Y. Q., Wang, Y. Y., Song, Y. M., Zhang, C. J., Zhan, R. (2005). Synthesis , Characterization , and Antioxidative Activity of Ternary Rare-Earth Complexes of 5-Fluorouracil-1-acetic Acid. *Chem.Pap.*, 59(4), 267–270.
- Huo, Z., Tsung, C.-K., Huang, W., Zhang, X., & Yang, P. (2008). Sub-two nanometer single crystal Au nanowires. *Nano Letters*, 8(7), 2041–4. doi:10.1021/nl8013549
- Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 2, 188–200. doi:10.1038/nrc749
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, S. P., McDonald, J.A., Kimata, K. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 25085–25092. doi:10.1074/jbc.274.35.25085
- Jadzinsky, P. D., Calero, G., Ackerson, C. J., Bushnell, D. a, & Kornberg, R. D. (2007). Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5849), 430–3. doi:10.1126/science.1148624
- Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(11), 653–64. doi:10.1038/nrclinonc.2010.139
- Jeong, Y., Kim, S., Jin, S., Ryu, H., Jin, Y., Jung, T., Kim, I., Jung, S. (2008). Cisplatin-Incorporated Hyaluronic Acid Nanoparticles Based on Ion-Complex Formation. *Pharmaceutical nanotechnology*, 97(3), 1268–1276. doi:10.1002/jps
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3, 145–150. doi:10.1038/nnano.2008.30
- Jin, Y., Wang, P., Yin, D., Liu, J., Qin, L., Yu, N., Xie, G., Li, B. (2007). Gold nanoparticles prepared by sonochemical method in thiol-functionalized ionic liquid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1-3), 366–370. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.02.060

- Jordan, M. A., Thrower, D., & Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Research*, *51*, 2212–2222.
- Kabashin, A. V, Meunier, M., Kingston, C., & Luong, J. H. T. (2003). Fabrication and Characterization of Gold Nanoparticles by Femtosecond Laser Ablation in an Aqueous Solution of Cyclodextrins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *107*, 4527–4531. doi:10.1021/jp034345q
- Kattumuri, V., Katti, K., Bhaskaran, S., Boote, E. J., Casteel, S. W., Fent, G. M., Robertdom, D., Chandrasekhar, M., Kannan, R., Katti, K. V. (2007). Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *3*, 333–341. doi:10.1002/sml.200600427
- Katz, E., & Willner, I. (2004). Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *43*, 6042–6108. doi:10.1002/anie.200400651
- Kaye, S. B. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer*, *78* (3), 1–7.
- Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y., & Maiti, S. (2007). Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *8*, 1237–1240. doi:10.1002/cbic.200700165
- Khlebtsov, N., & Dykman, L. (2011). Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*, *40*(3), 1647–71. doi:10.1039/c0cs00018c
- Klar, T., Perner, M., Grosse, S., Von Plessen, G., Spirkl, W., & Feldmann, J. (1998). Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles. *Physical Review Letters*, *80*(19), 4249–4252. doi: 10.1103/physrevlett.80.4249
- Koster, D. A., Palle, K., Bot, E. S. M., Bjornsti, M.-A., & Dekker, N. H. (2007). Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature*, *448*, 213–217. doi:10.1038/nature05938

- Kumar, K. P., Paul, W., & Sharma, C. P. (2011). Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility. *Process Biochemistry*, 46(10), 2007–2013. doi:10.1016/j.procbio.2011.07.011
- Kurkina, T., & Balasubramanian, K. (2012). Towards in vitro molecular diagnostics using nanostructures. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 69(3), 373–88. doi:10.1007/s00018-011-0855-7
- Lago Mendoza, G. (2007). Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. *Centro de Histoterapia Placentaria. Instituto de Farmacia*.
- LaMer, V., & Dinegar, R. (1950). Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical society*, 72(119), 4847-4854. doi: 10.1021/ja0116ta001
- Laurent, T. C., Laurent, U. B., & Fraser, J. R. (1996). The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology*, 74(2), A1–7. doi:10.1038/icb.1996.32
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656–72. doi:10.1039/c2cs15261d
- Lee, H., Lee, K., Kim, I. K., & Park, T. G. (2008). Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobos. *Biomaterials*, 29(35), 4709–18. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.038
- Lee, M.-Y., Yang, J.-A., Jung, H. S., Beack, S., Choi, J. E., Hur, W., Koo, H., Kim, K., Yoo, S., Hahn, S. K. (2012). Hyaluronic acid-gold nanoparticle/interferon α complex for targeted treatment of hepatitis C virus infection. *ACS Nano*, 6(11), 9522–31. doi:10.1021/nn302538y
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 4, 26–49. doi:10.1002/smll.200700595

- Li, Y., Wang, J., Wientjes, M. G., & Au, J. L.-S. (2012). Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(1), 29-39. doi:10.1016/j.addr.2011.04.006
- Lica, G. C., Zelakiewicz, B. S., Constantinescu, M., & Tong, Y. (2004). Charge Dependence of Surface Plasma Resonance on 2 nm Octanethiol-Protected Au Nanoparticles: Evidence of a Free-Electron System. *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 19896–19900. doi:10.1021/jp045302s
- Link, S., & El-Sayed, M. a. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212–4217. doi:10.1021/jp984.7960
- Liu, X., Dai, Q., Austin, L., Coutts, J., Knowles, G., Zou, J., Chen, H., Huo, Q. (2008). A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 2780–2782. doi:10.1021/ja711298b
- Lundquist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cerdvall, T., Dawson, KA. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105(38), 14265-79. doi:10.1073/pnas.0805135105
- Luo, Y., Bernshaw, N. J., Lu, Z.-R., Kopecek, J., & Prestwich, G. D. (2002). Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharmaceutical Research*, 19(4), 396–402. doi: 10.1023/A:1015170907274
- Luo, Y., Prestwich, G. D. (1999). Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid-Antitumor Bioconjugate. *Bioconjugate chemistry*, 10(5), 755-763. doi: 10.1021/bc9900338
- Lynch, I., Cerdvall, T., Lundquist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., Dawson, KA. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 134-235, 167-174. doi: 10.1002/anie.200700465

- Maleki, A., KJoniksen, A., Nyström, B. (2008). Effect of pH on the behaviour of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular symposia*, 274(1), 131-140. doi: 10.1002/masy.200851418
- Mashimoto, M., Saegusa, H., Chiba, S., Kitagawa, H., & Myoshi, T. (1988). *Patent*, 63,123,392.
- McIntosh, C. M., Esposito, E. A., Boal, A. K., Simard, J. M., Martin, C. T., & Rotello, V. M. (2001). Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 7626–7629. doi:10.1021/ja015556g
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., & Noble, P. W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *The Journal of Clinical Investigation*, 98, 2403–2413. doi:10.1172/JCI119054
- Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual Reviews, Inc*, 55, 663-700. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
- Metz, O., Stoll, W., & Plenert, W. (1982). Meningosis prophylaxis with intrathecal ¹⁹⁸Au-colloid and methotrexate in childhood acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 49, 224–228. doi:10.1002/1097-0142(19820115)49:2<224::AID-CNCR2820490205>3.0.CO;2-O
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J.Biol.Chem*, 107, 629–634.
- Mie, G. (1908). Beitrzur Optik trMedien, speziell kolloidaler Metall"ösungen. *Annalen Der Physik*, 25, 377–445. doi:10.1002/andp.19083300302
- Mikhlin, Y., Karacharov, A., Likhatski, M. (2011). Submicrometer intermediates in the citrate synthesis of gold nanoparticles: new insights into hte nucleation and crystal growth mechanisms. *Journal of colloid and interface science*, 362(2), 330-6. doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.077

- Minelli, C., Lowe, S. B., & Stevens, M. M. (2010). Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 6(21), 2336–57. doi:10.1002/sml.201000523
- Mocellin, S., Bronte, V., & Nitti, D. (2007). Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Medicinal Research Reviews*, 27, 317–352. doi:10.1002/med.20092
- Moghimi, S. M., Hunter, a C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(3), 311–30. doi:10.1096/fj.04-2747rev
- Mohamed, M. B., & Abdel-Ghani, N. T. (2012). 5-Fluorouracil induces plasmonic coupling in gold nanospheres: new generation of chemotherapeutic agents. *J Nanomed Nanotechnol*, 3:7, 146. doi: 10.4172/2157-7439
- Moreland, L. W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Research & Therapy*, 5, 54–67. doi:10.1186/ar623
- Morigi, V., Tocchio, A., Bellavite Pellegrini, C., Sakamoto, J. H., Arnone, M., & Tasciotti, E. (2012). Nanotechnology in Medicine: From Inception to Market Domination. *Journal of Drug Delivery*, 1-7. doi:10.1155/2012/389485
- Morrow, K. J., Bawa, R., & Wei, C. (2007). Recent advances in basic and clinical nanomedicine. *The Medical Clinics of North America*, 91, 805–843. doi:10.1016/j.mcna.2007.05.009
- Mráček, A., Varhaníková, J., Lehocký, M., Gřundělová, L., Pokopcová, A., & Velebný, V. (2008). The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. *Molecules*, 13(5), 1025–1034. doi:10.3390/molecules13051025
- Nakamoto, M., Yamamoto, M., & Fukusumi, M. (2002). Thermolysis of gold(I) thiolate complexes producing novel gold nanoparticles passivated by alkyl groups. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 15, 1622–1623. doi:10.1039/b203736j

- Noble, P. W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 21, 25–29. doi:10.1016/S0945-053X(01)00184-6
- Northfelt, D., Dezube, B., Thommes, J. (1998). Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *Journal of clinical oncology*, 16(7), 2445-2451.
- Nyström, A. M., & Fadeel, B. (2012). Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 16(2), 403-408. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.027
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro.riviere, N., Warheit, D., Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8. doi:10.1186/1743-8977-2-8
- O'Brien, M., Wigler, N., Inbar, M. (2004). Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCL (CAELYX/DOXIL) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology*, 15(3), 440-449. doi: 10.1093/annonc/malh097
- OECD (2009), "Nanotechnology patents", in OECD Science, Technology and Industry Scoreboard 2009, O. P. http://dx.doi.org/10.1787/sti_scoreboar.-2009-27-en.
- Oertli, B., Fan, X., & Wüthrich, R. P. (1998). Characterization of CD44-mediated hyaluronan binding by renal tubular epithelial cells. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 13, 271–278.
- Ossipov, D. A. (2010). Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(6), 681–703. doi:10.1517/17425241003730399

- Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., & Tamarkin, L. (2004). Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Delivery*, *11*(3), 169–83. doi:10.1080/10717540490433895
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *5*, 2067–2076. doi:10.1002/sml.200900466
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *3*, 1941–1949. doi:10.1002/sml.200700378
- Park, J.-W., & Shumaker-Parry, J. S. (2014). Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(5), 1907–21. doi:10.1021/ja4097384
- Pasqui, D., Atrei, A., & Barbucci, R. (2007). A novel strategy to obtain a hyaluronan monolayer on solid substrates. *Biomacromolecules*, *8*(11), 3531–9. doi:10.1021/bm700834d
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., & Dasgupta, A. K. (2007). Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *3*, 111–119. doi:10.1016/j.nano.2007.03.005
- Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., & Aruffo, a. (1993). Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *The Journal of Cell Biology*, *122*(1), 257–64.
- Pecora, B., Berry, J., Pecora, R. (2006). Dynamic light scattering with applications to chemistry,biology and physics. *A wiley-interscience publication*.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, *2*(12), 751–60. doi:10.1038/nnano.2007.387

-
- Pensa, E., Cortés, E., Corthey, G., Carro, P., Vericat, C., Fonticelli, M. H., Benitez, G., Rubert, A., Salvarezza, R. C. (2012). The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model. *Accounts of Chemical Research*, 45(8), 1183–92. doi:10.1021/ar200260p
- Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2, 766–773. doi:10.1002/sml.200500492
- Philip, D. (2009). Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73, 374–381. doi:10.1016/j.saa.2009.02.037
- Pitarresi, G., Craparo, E. F., Palumbo, F. S., Carlisi, B., & Giammona, G. (2007). Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with alpha,beta-polyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules*, 8(6), 1890–8. doi:10.1021/bm070224a
- Plosker, G. L., & Faulds, D. (1993). Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy. *Drugs*, 45, 788–856.
- Polizzi, M. A., Stasko, N. A., & Schoenfisch, M. H. (2007). Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 23, 4938–4943. doi:10.1021/la0633841
- Porter, A. E., Gass, M., Muller, K., Skepper, J. N., Midgley, P. A., & Welland, M. (2007). Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature Nanotechnology*, 2(11), 713–7. doi:10.1038/nnano.2007.347
- Prabaharan, M., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. A., & Gong, S. (2009). Biomaterials Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 30(30), 6065–6075. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.048

- Rama, S., Perala, K., & Kumar, S. (2013). On the Mechanism of Metal Nanoparticle Synthesis in the Brust – Schiffrin Method. *Langmuir*, 29, 9863-9873. doi: 10.1021.la401604q
- Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., & Cvitkovic, E. (2002). Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(3), 227–235.
- Ren, L., Chow, G. (2003). Synthesis of nir-sensitive Au-Au₂S nanocolloids for drug delivery. *Materials science and engineering C*, 23(1-2), 114-116. doi: 10.1046/50928-4931(2)00247-3
- Rixe, O., Ortuzar, W., Alvarez, M., Parker, R., Reed, E., Paull, K., & Fojo, T. (1996). Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochemical Pharmacology*, 52, 1855–1865. doi:10.1016/S0006-2952(97)81490-6
- Schmid, G. (2008). The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters. *Chemical Society Reviews*, 37, 1909–1930. doi:10.1039/b713631p
- Scott, J. E., & Heatley, F. (1999). Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 4850–5. doi: 10.1073/pnas.96.9.4850
- Scott, J. E., Heatley, F., & Hull, W. E. (1984). Secondary structure of hyaluronate in solution. *Biochem.J*, 220, 197–205.
- Serban, M. a, Yang, G., & Prestwich, G. D. (2008). Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative. *Biomaterials*, 29(10), 1388–99. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.006
- Shi, X., Sitharaman, B., Pham, Q. P., Liang, F., Wu, K., Edward Billups, W., Wilson, I., Mikos, A. G. (2007). Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 4078–4090. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.033

-
- Shinde, S. B., Fernandes, C. B., & Patravale, V. B. (2012). Recent trends in in-vitro nanodiagnostics for detection of pathogens. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 159(2), 164–80. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.033
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 21, 10644–10654. doi:10.1021/la0513712
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., Kostarelos, K. (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 3357–3362. doi:10.1073/pnas.0509009103
- Slocik, J. M., Naik, R. R., Stone, M. O., & Wright, D. W. (2005). Viral templates for gold nanoparticle synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 15(7), 749. doi:10.1039/b413074j
- Sonavane, G., Tomoda, K., & Makino, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 66, 274–280. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.004
- Spingler, B., Whittington, D. A., & Lippard, S. J. (2001). 2.4 A crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *Inorganic Chemistry*, 40, 5596–5602. doi: 10.1021/ico10790t
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science (New York, N.Y.)*, 260, 214–216. doi:10.1126/science.8097061
- Tarazona-Vasquez, F., & Balbuena, P. B. (2004). Complexation of the lowest generation poly(amidoamine)-NH₂ dendrimers with metal ions, metal atoms, and Cu(II) hydrates: An ab initio study. *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 15992–16001. doi:10.1021/jp049324q

BIBLIOGRAFÍA

- Taylor, M. R. (2006). REGULATING THE PRODUCTS OF NANOTECHNOLOGY: Does FDA Have the Tools It Needs?. *Woodrow Wilson International Center for Scholars. Project on emerging Nanotechnologies.*
- Tezel, A., Fredrickson, G. H. (2008). The science of hyaluronic acid dermal fillers. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology*, 10, 35–42. doi:10.1080/14764170701774901
- Thomas, R. (2001). A Beginner's guide to ICP-MS. *Spectroscopy tutorial*, 16(4), 38–42.
- Toole, B. P. (1997). Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 242, 35–40. doi:10.1006/scdb.2000.0244
- Toole, B. P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 528–39. doi:10.1038/nrc1391
- Toole, B. P., Wight, T. N., & Tammi, M. I. (2002). Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4593–4596. doi:10.1074/jbc.R100039200
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55 – 75. doi:10.1039/DF9511100055
- Tuval, T., & Gedanken, A. (2007). A microwave-assisted polyol method for the deposition of silver nanoparticles on silica spheres. *Nanotechnology*, 18(25), 255–601. doi:10.1088/0957-4484/18/25/255601
- Ulman, A. (1996). Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, 96, 1533–1554. doi:10.1021/cr9502357
- Vericat, C., Vela, M. E., Salvarezza, R. C. (2005). Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 7, 3258–3268. doi:10.1039/b505903h
- Verwey, E. J. W. (1947). Theory of the stability of lyophobic colloids. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 51, 631–636. doi:10.1038/162315b0

- Vesaratchanon, S., Nikolov, A., & Wasan, D. T. (2007). Sedimentation in nano-colloidal dispersions: effects of collective interactions and particle charge. *Advances in Colloid and Interface Science*, 134-135, 268–278. doi:10.1016/j.cis.2007.04.026
- Villiers, C., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M.-B., & Marche, P. (2010). Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 12(1), 55–60. doi:10.1007/s11051-009-9692-0
- W.Schärtl. (2006). *Light Scattering from polymer solutions and nanoparticles dispersions*. (S. laboratory manuals in polymer Science, Ed.).
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., & Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1211–7. doi:10.1038/nbt1006-1211
- Wang, L.-S., Chuang, M.-C., & Ho, J.-A. A. (2012). Nanotheranostics--a review of recent publications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4679–95. doi:10.2147/IJN.S33065
- Warren, S. C., Jackson, A. C., Cater-Cyker, Z. D., DiSalvo, F. J., & Wiesner, U. (2007). Nanoparticle synthesis via the photochemical polythiol process. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 10072–10073. doi:Doi 10.1021/Ja0733639
- Weigel, P. H. (1997). Hyaluronan Synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 13997–14000. doi:10.1074/jbc.272.22.13997
- Wen, D. Y. (2000). Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. *American Family Physician*, 62(3), 565–570, 572.
- Xie, Y., Aillon, K. L., Cai, S., Christian, J. M., Davies, N. M., Berkland, C. J., & Forrest, M. L. (2010). Pulmonary delivery of cisplatin-hyaluronan conjugates via endotracheal instillation for the treatment of lung cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 392(1-2), 156–63. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.058
- Xiong, J., Zhu, H.-F., Zhao, Y.-J., Lan, Y.-J., Jiang, J.-W., Yang, J.-J., & Zhang, S.-F. (2009). Synthesis and antitumor activity of amino acid ester derivatives containing 5-

BIBLIOGRAFÍA

- fluorouracil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(9), 3142–52. doi:10.3390/molecules14093142
- Xu, C., Wang, B., & Sun, S. (2009). Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ nanoparticles for target-specific platinum delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 131(12), 4216–7. doi:10.1021/ja900790v
- Yeo, Y., Highley, C. B., Bellas, E., Ito, T., Marini, R., Langer, R., & Kohane, D. S. (2006). In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels prevent post-operative abdominal adhesions in a rabbit model. *Biomaterials*, 27, 4698–4705. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.043
- Zhang, G., Yang, Z., Lu, W., Zhang, R., Huang, Q., Tian, M., Li, L., Liang, D., Li, C. (2009). Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials*, 30, 1928–1936. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.038
- Zhang, P., & Sham, T. K. (2003). X-ray studies of the structure and electronic behavior of alkanethiolate-capped gold nanoparticles: the interplay of size and surface effects. *Physical Review Letters*, 90, 245502. doi:10.1103/PhysRevLett.90.245502
- Zhou, W.-M., He, R.-R., Ye, J.-T., Zhang, N., & Liu, D.-Y. (2010). Synthesis and biological evaluation of new 5-fluorouracil-substituted ampelopsin derivatives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(4), 2114–23. doi:10.3390/molecules15042114

Webs:

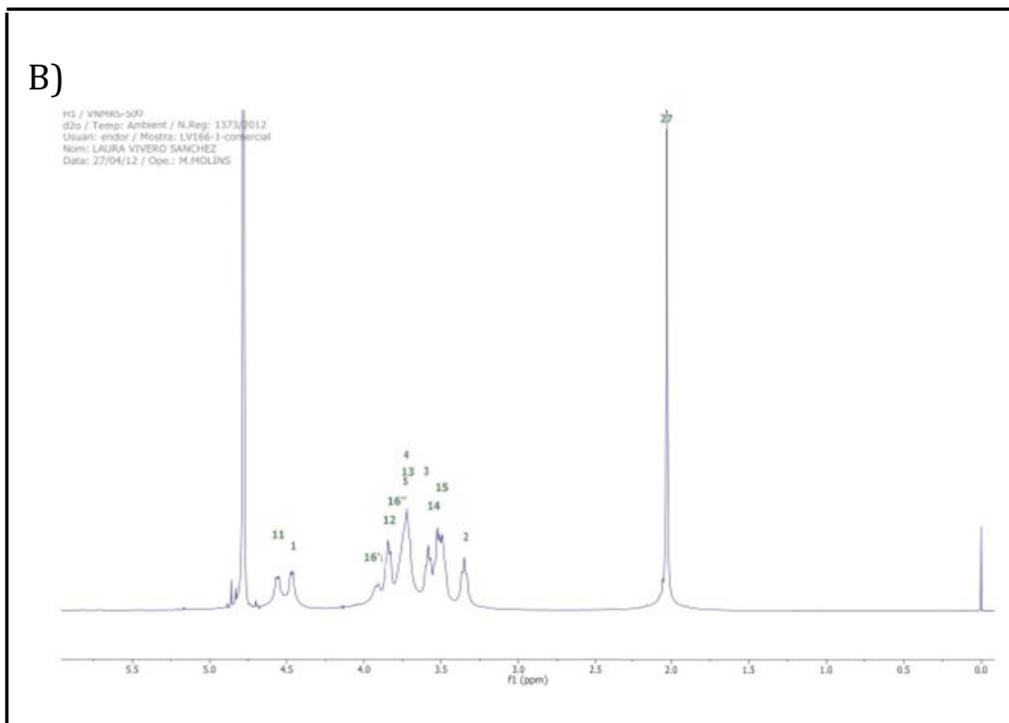
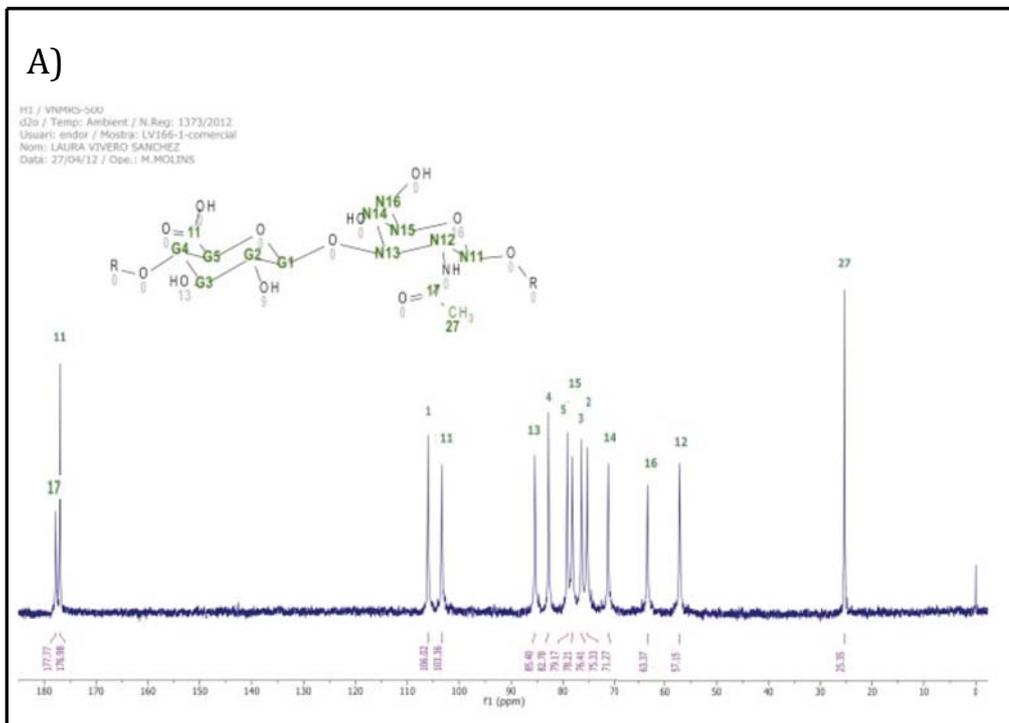
www.epa.org
www.esf.org
www.malvern.com
www.nanopharmaceuticals.org
www.nanotechproject.org

ANEXO

7. ANEXO

7.1. RMN HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa

7.1.1. RMN HA 30-50 kDa



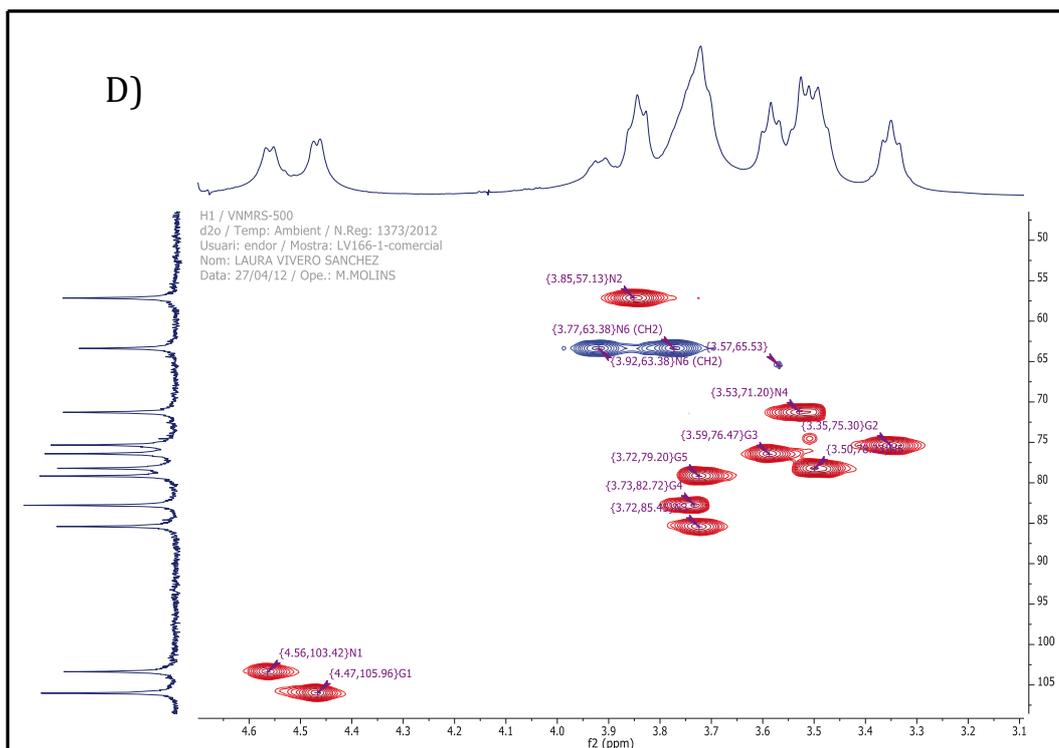
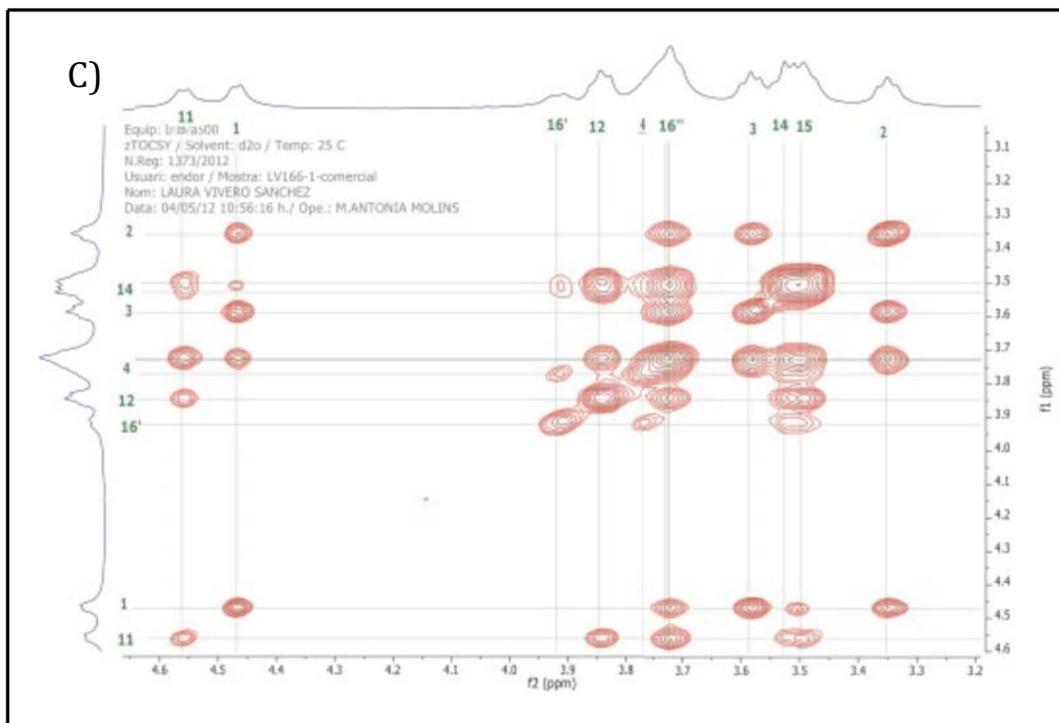
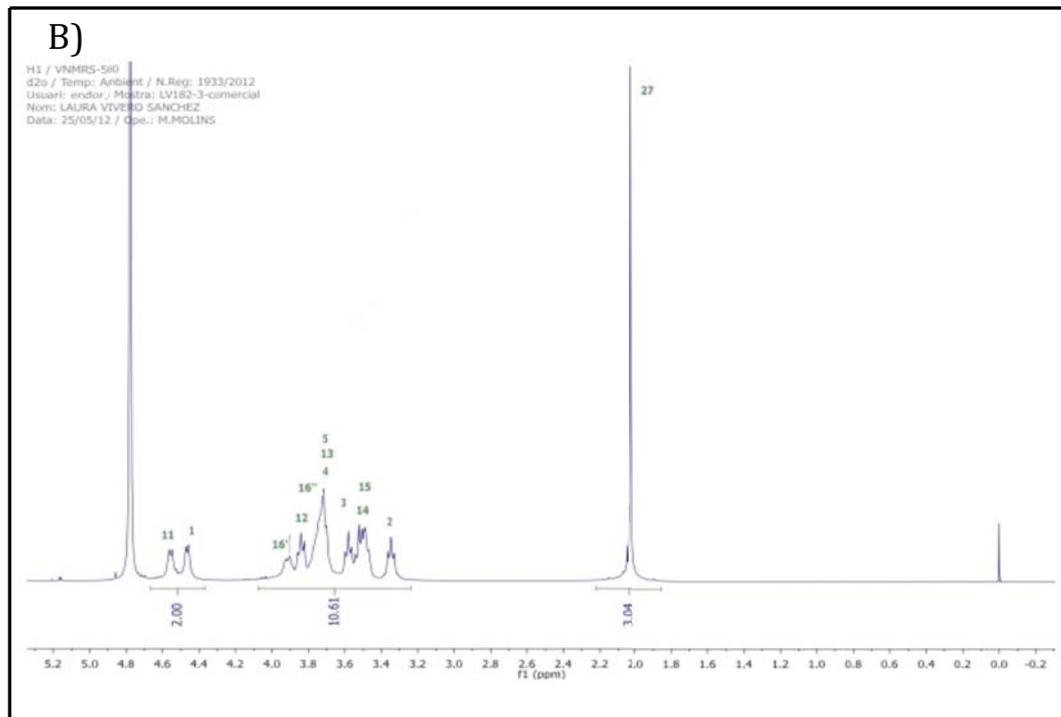
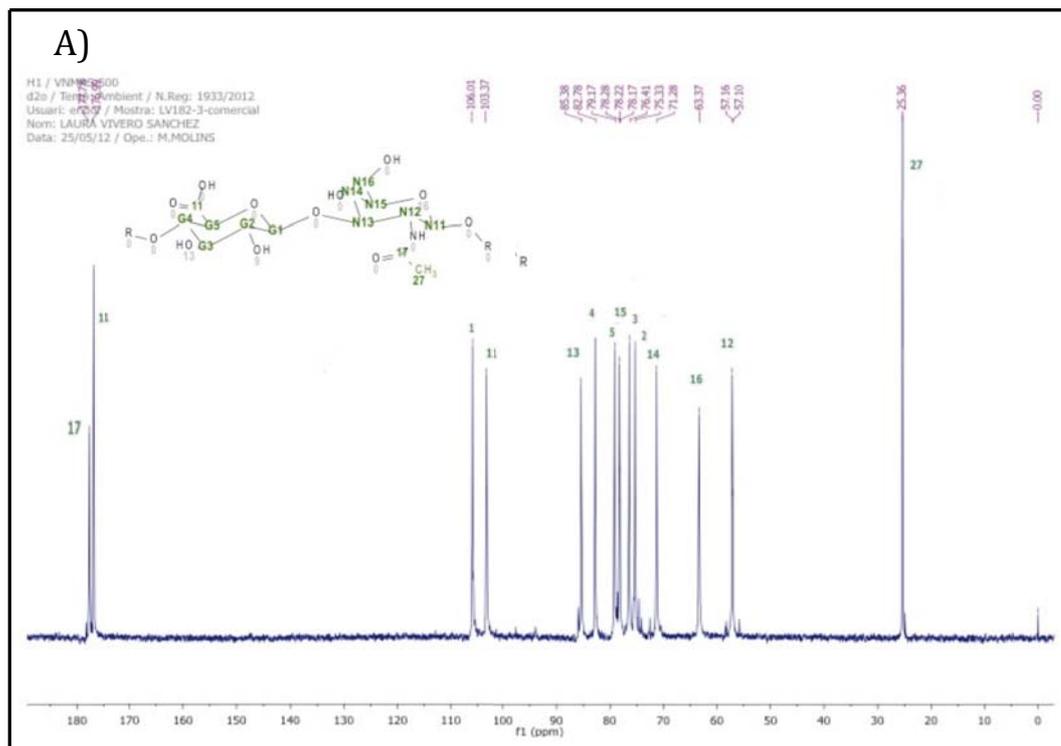


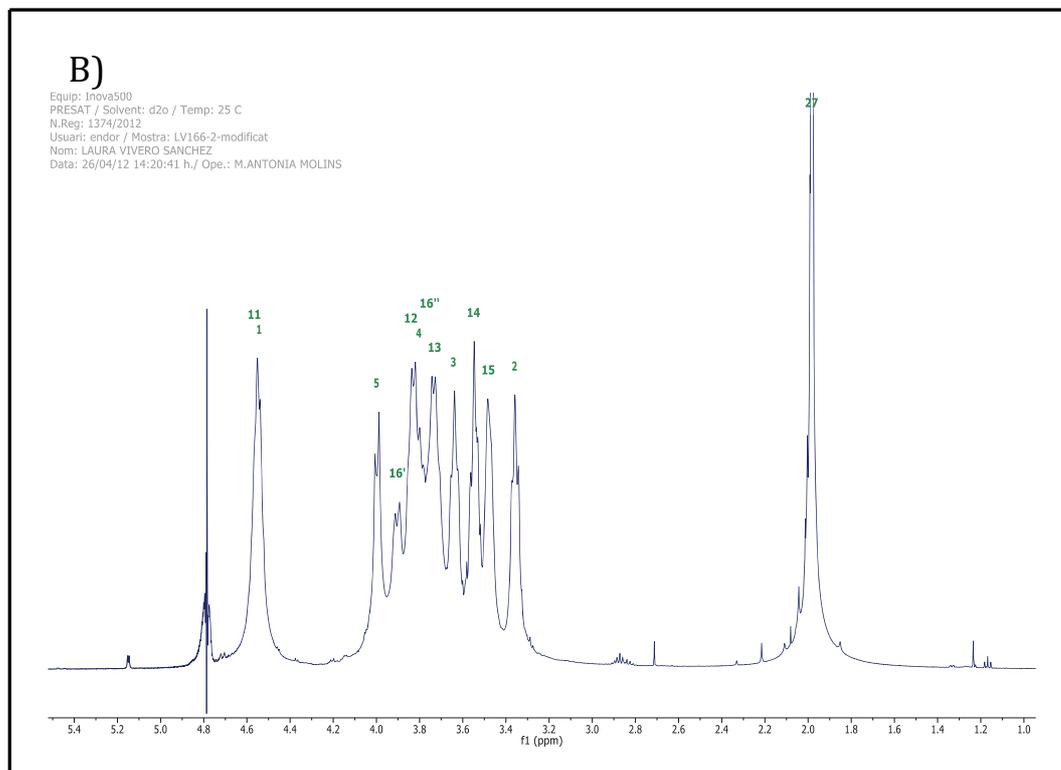
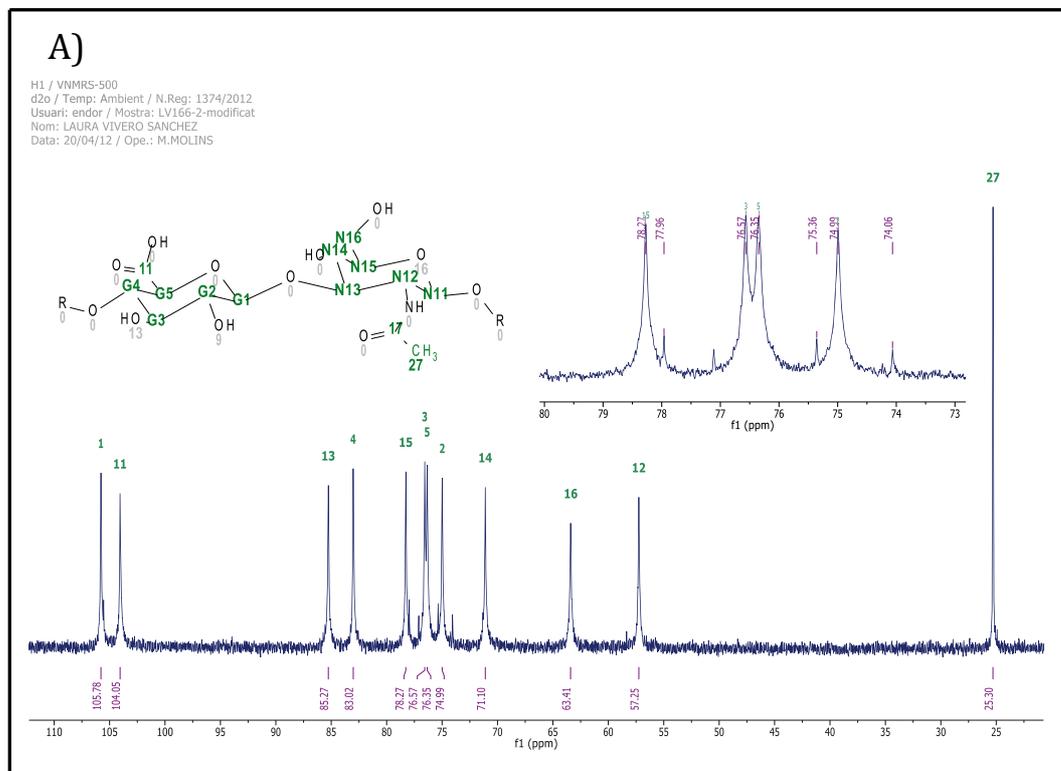
Figura 7.1 Caracterización del HA 30-50 kDa por RMN. A) Espectro de ^{13}C (500 MHz, D_2O); B) de ^1H (500 MHz, D_2O); C) Z-TOCSY (500 MHz, D_2O) y D) HSQC (500 MHz, D_2O)

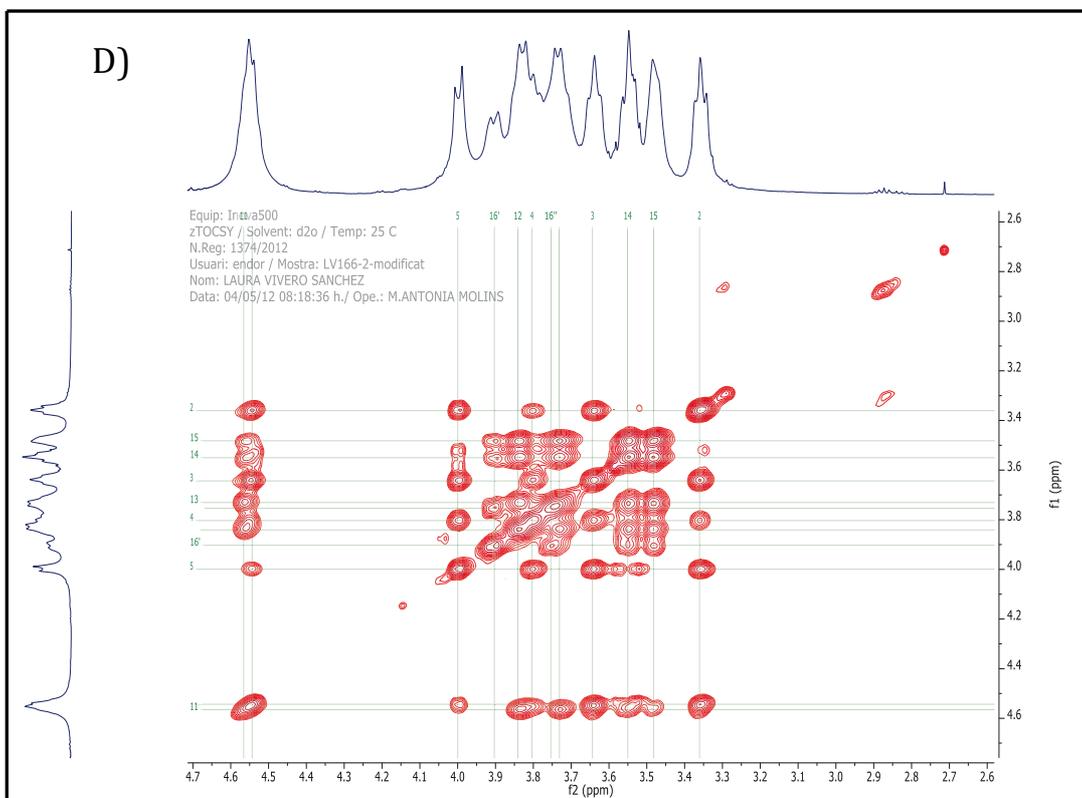
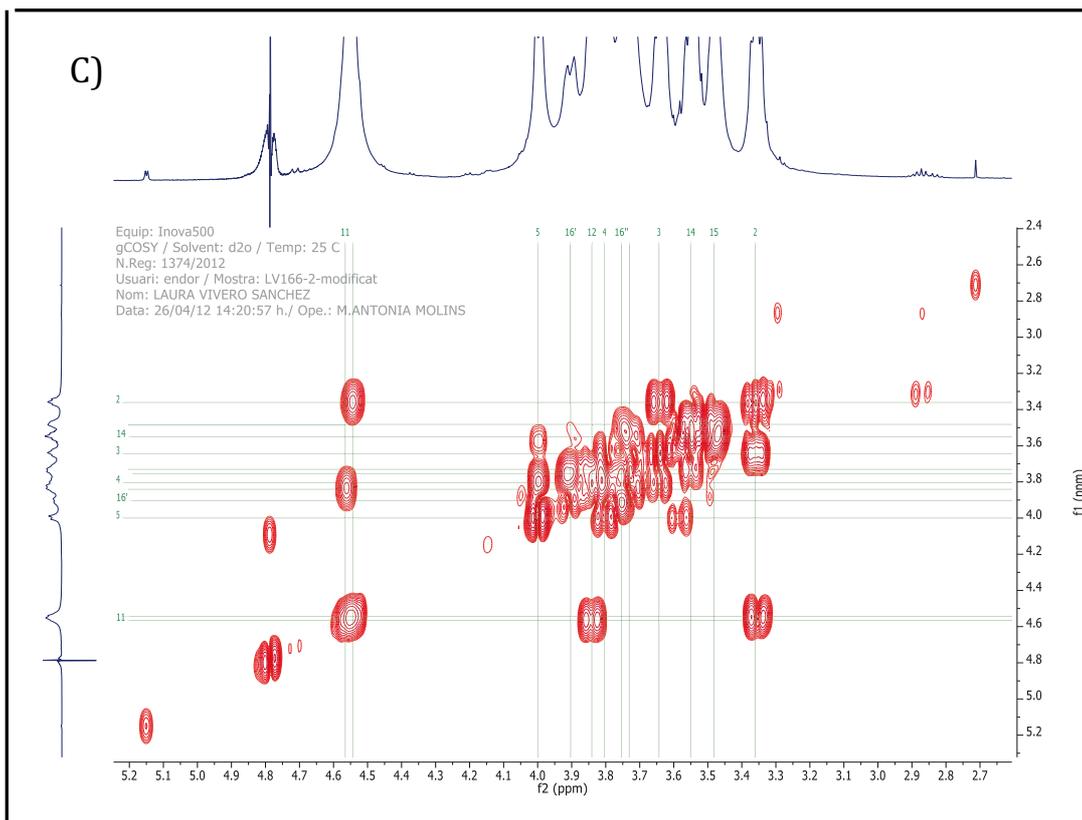
7.1.2. RMN HA 8-15 kDa



7.2. RMN HASH 30-50 kDa y HASH 8-15 kDa

7.2.1. RMN HASH 30-50 kDa





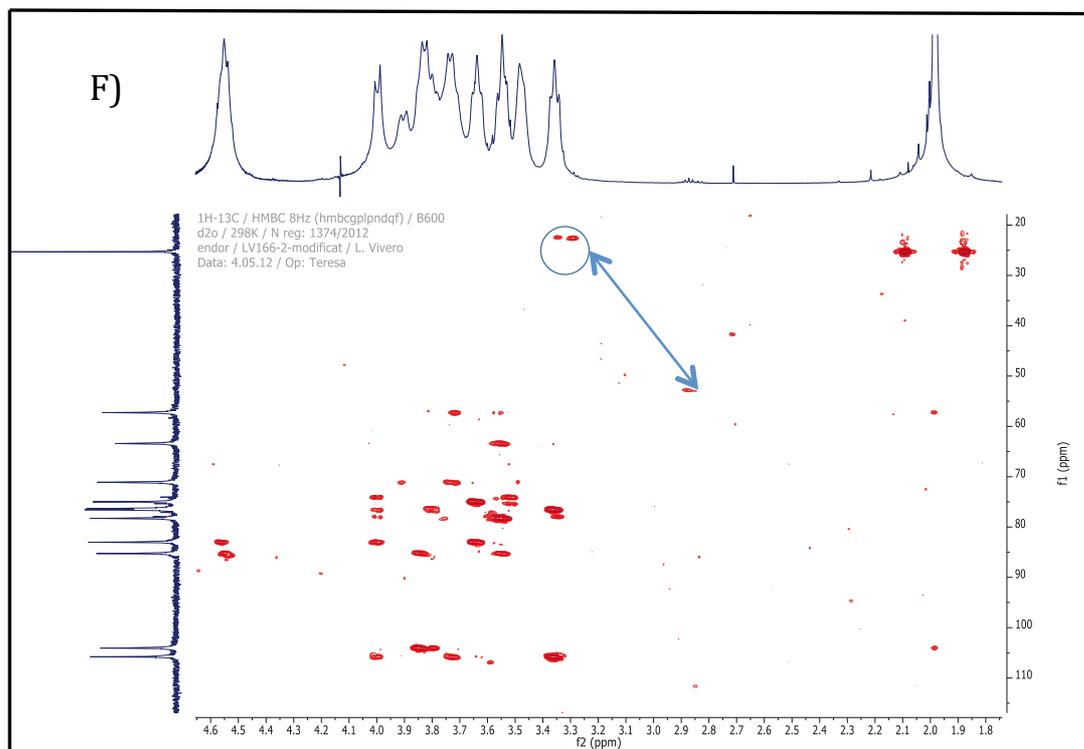
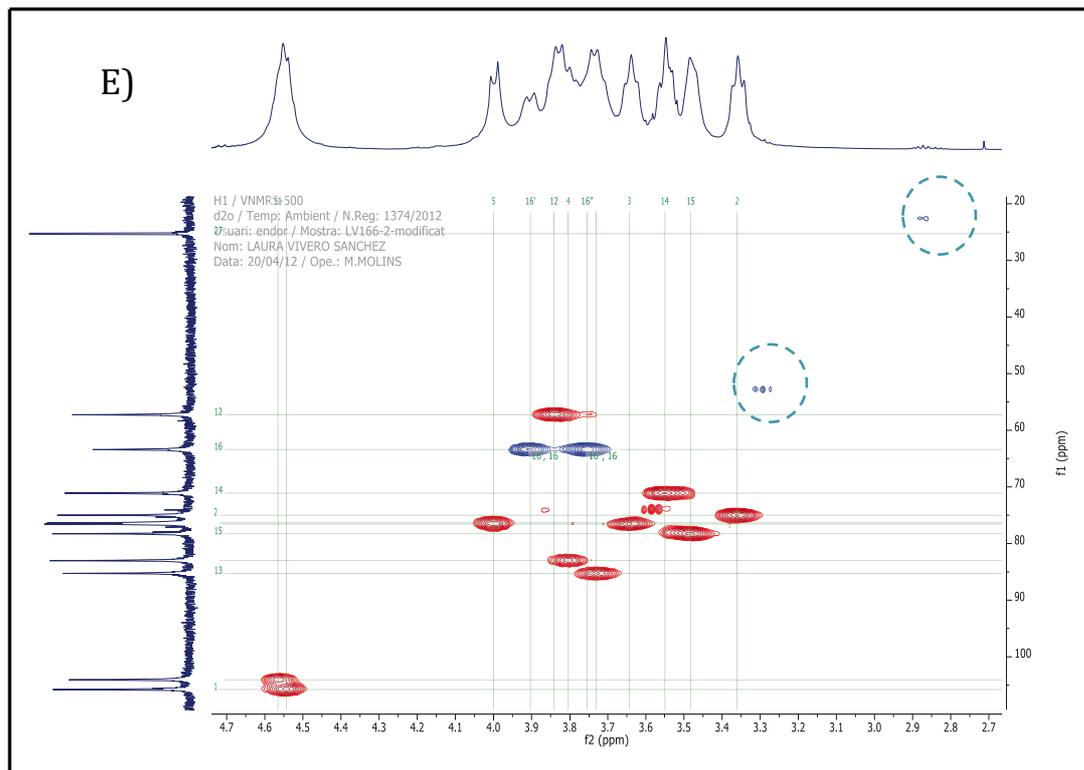


Figura 7.3 Caracterización del HASH 30-50 kDa por RMN. A) Espectro de ^{13}C (500 MHz, D_2O); B) ^1H (500 MHz, D_2O); C) COSY (500 MHz, D_2O); D) Z-TOCSY (500 MHz, D_2O); E) HSQC (500 MHz, D_2O) y F) HMBC (8 Hz, 600 MHz, D_2O).

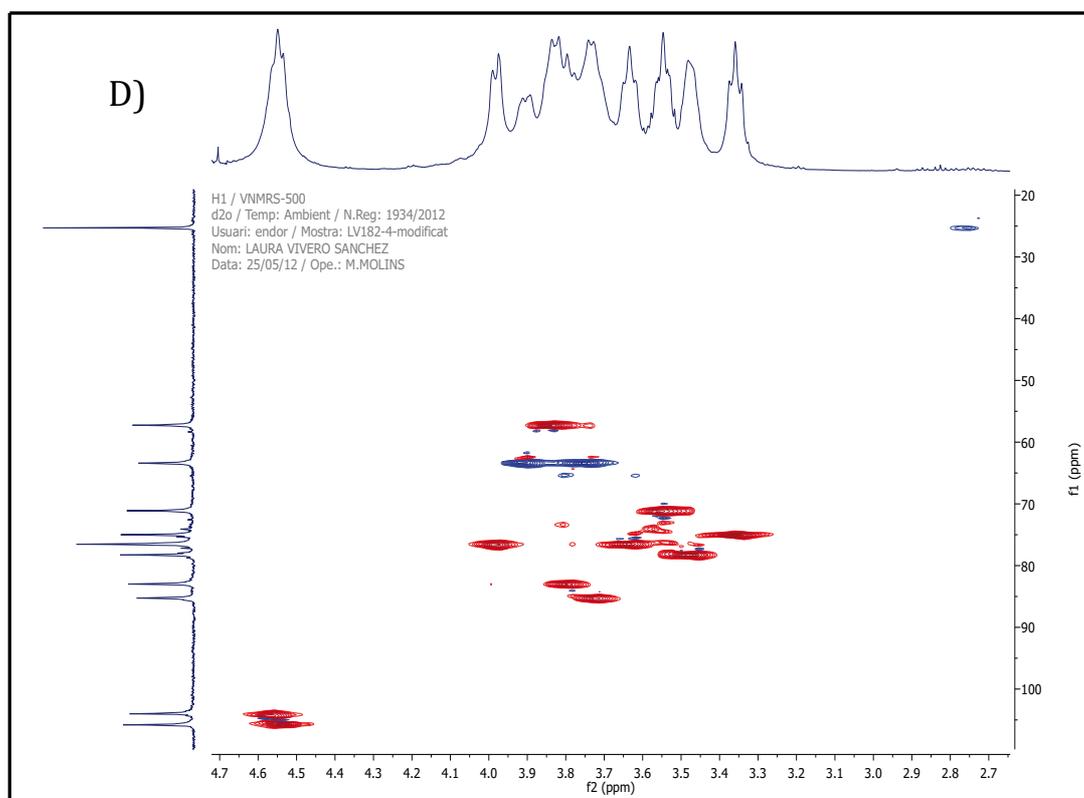
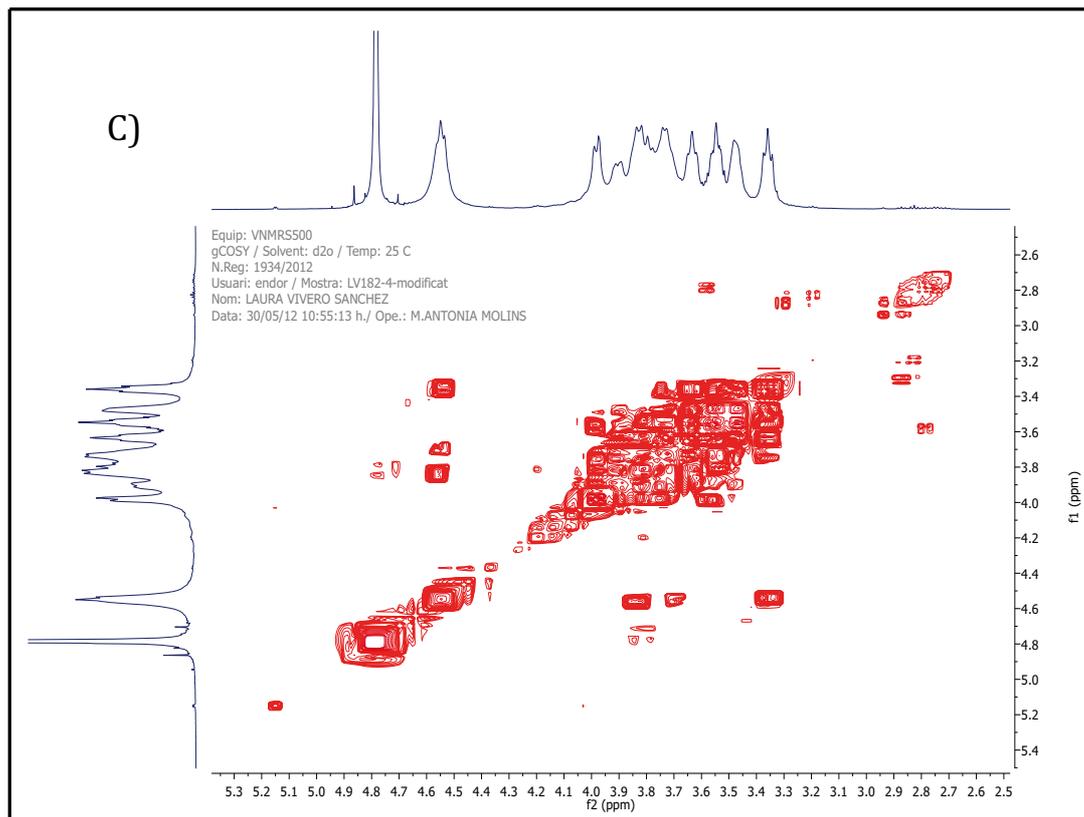


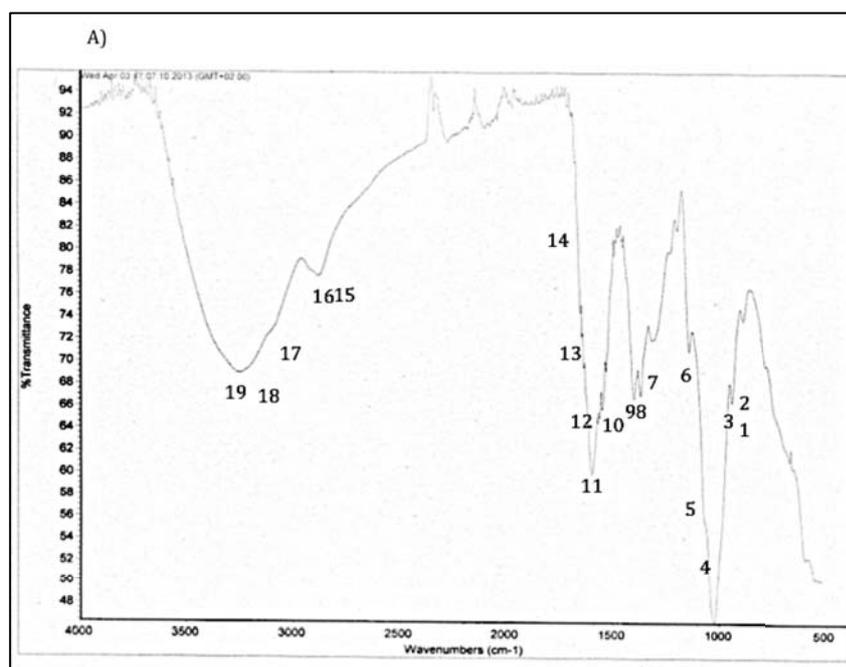
Figura 7.4 Caracterización del HASH 8-15 kDa por RMN. A) El espectro de ^{13}C (500 MHz, D_2O); B) ^1H (500 MHz, D_2O); C) COSY (500 MHz, D_2O) y D) HSQC (500 MHz, D_2O).

7.3. FT-IR HA 30-50 kDa y HA 8-15 kDa

Bandas IR		Longitud de onda (cm ⁻¹)
1	C-O-C estiramiento, O-H deformación y C=O deformación	896
2		945,7
3		999
4	C-O-C, C-O, y C-O-H estiramiento	1038
5		1079,5
6		1155,6
7	CH ₂ , CH ₃ , C-O-H deformación, C-O con C=O combinación	1377,7
8		1406,9
9	NH deformación	1468,7
10		15,63,7
11	Amida	1597,3
12		1637,3
13	C=O carboxil de amida	1654,8
14		1736
15	CH estiramiento	2853,5
16		2925
17	NH con CO combinación	3105
18	NH estiramiento y OH estiramiento	3284
19		2286

Tabla 7.1 Asignación de las bandas FT-IR del HA.

7.3.1. FT-IR HA 30-50 kDa y HASH 30-50 kDa



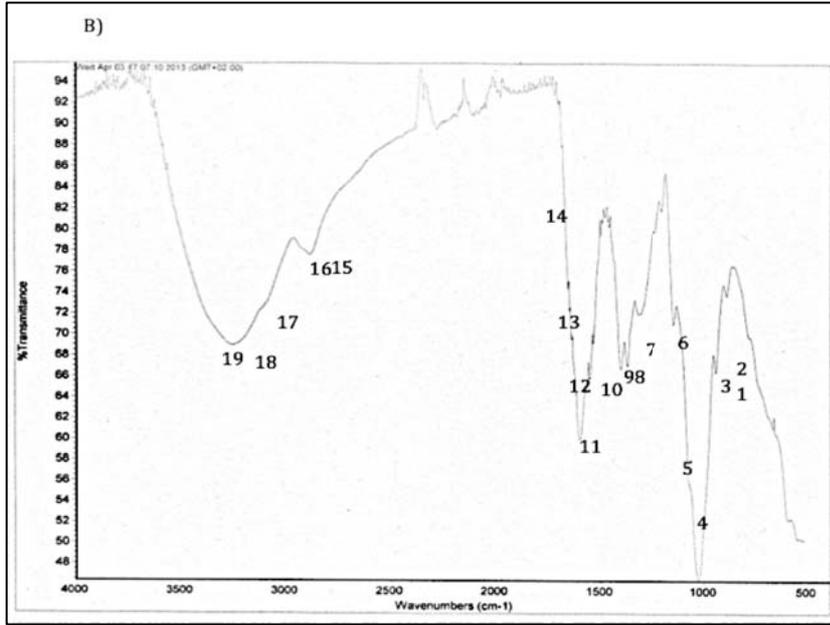
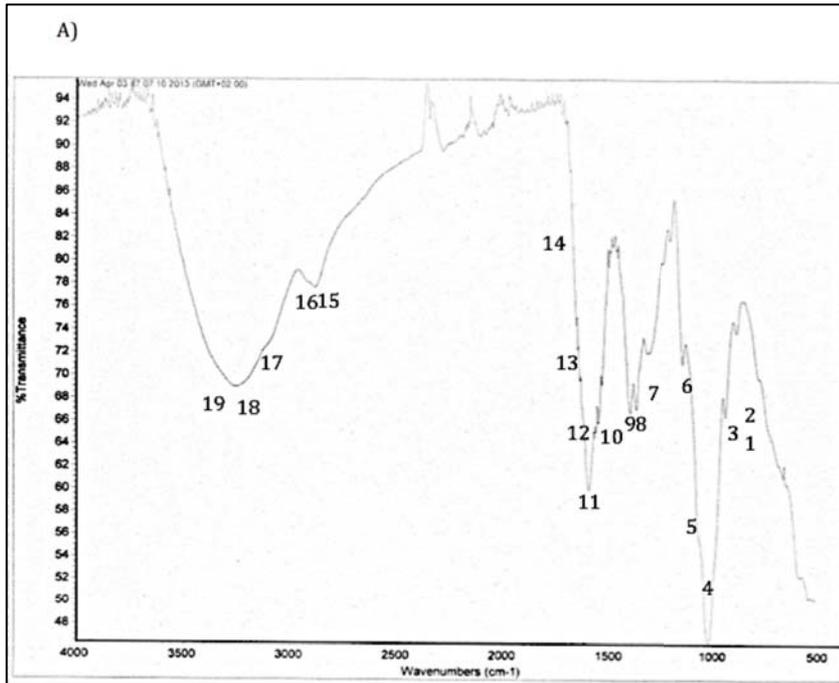


Figura 7.5 Caracterización por FT-IR comparando HA 30-50 kDa y HASH 30-50 kDa. A) Espectro de HA 30-50 kDa. B) Espectro de HASH 30-50 kDa.

7.3.2. FT-IR HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa



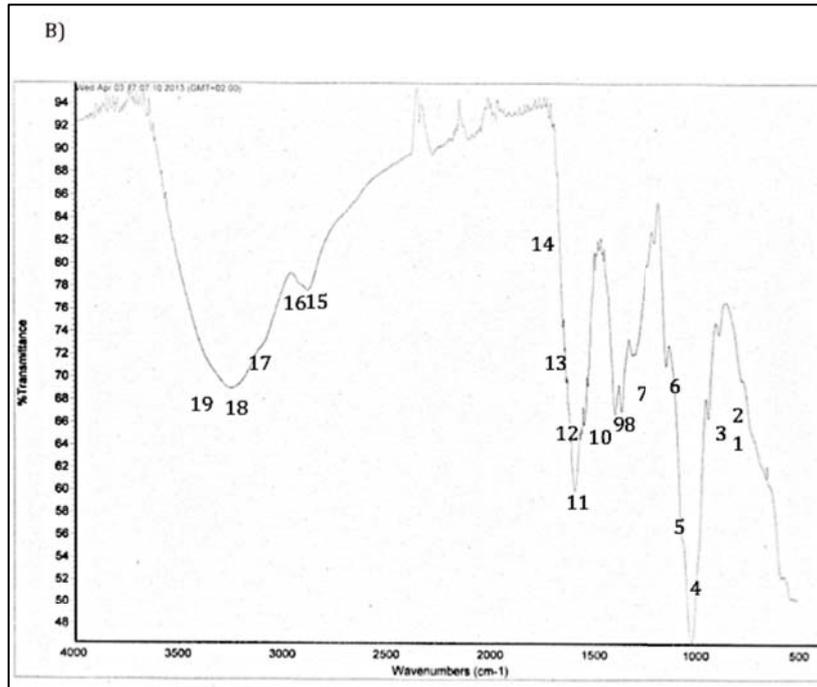


Figura 7.6 Caracterización por FT-IR comparando HA 8-15 kDa y HASH 8-15 kDa. A) Espectro del HA 8-15 kDa. B) Espectro del HASH 8-15 kDa.

7.4. FT-IR EDS1

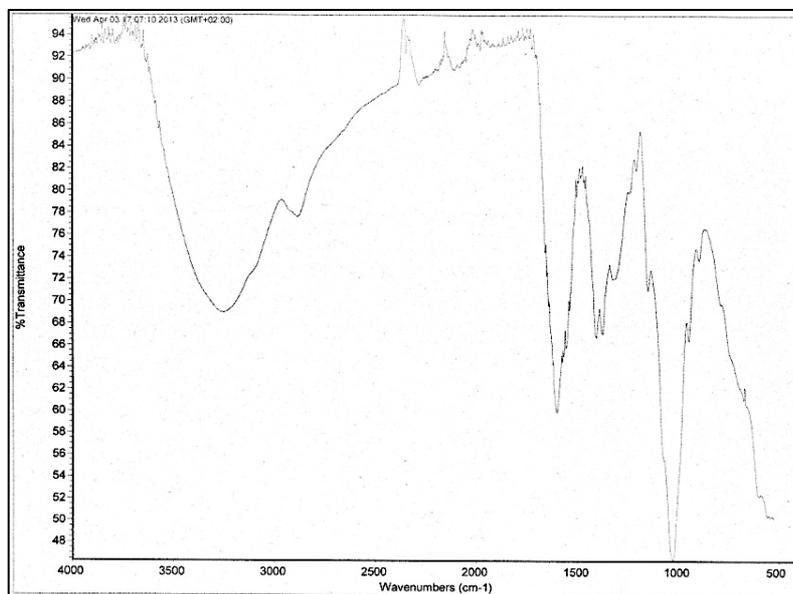


Figura 7.7 Caracterización por FT-IR del EDS1. Espectro de IR del conjugado 12 nm 30-50 kDa.

7.5. TGA EDS1

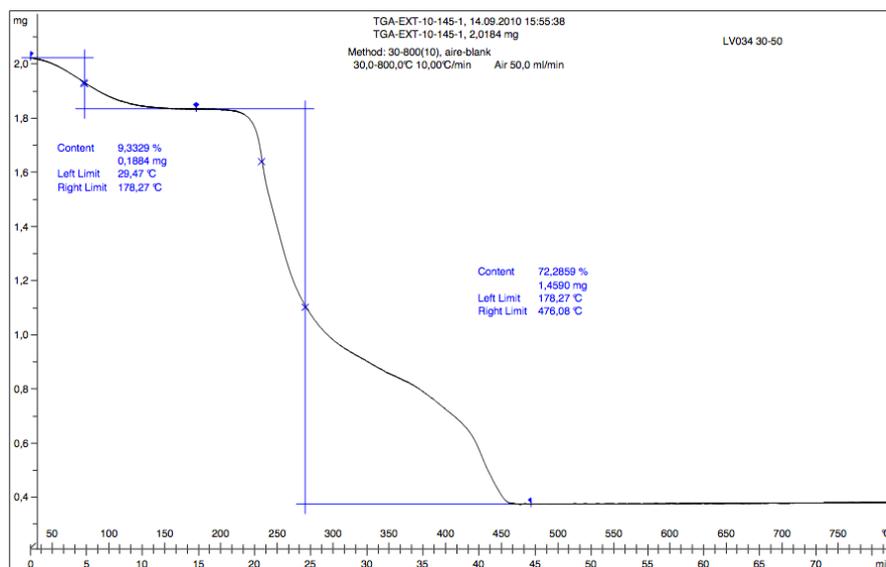


Figura 7.8 Análisis termogravimétrico del candidato EDS1.

7.6. Vía A Cis

7.6.1. Ligando L

7.6.1.1. Espectro ^1H RMN de la carboxilación cistamnia

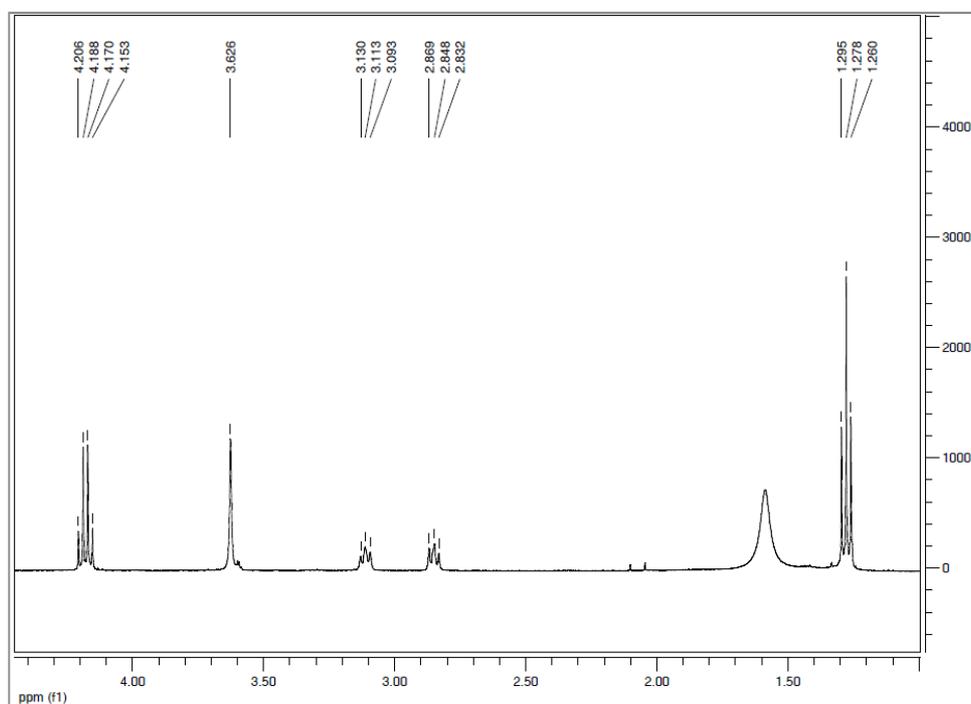


Figura 7.9 Espectro RMN de la carboxilación de la cistamina del ligando L.
 ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz, ppm).

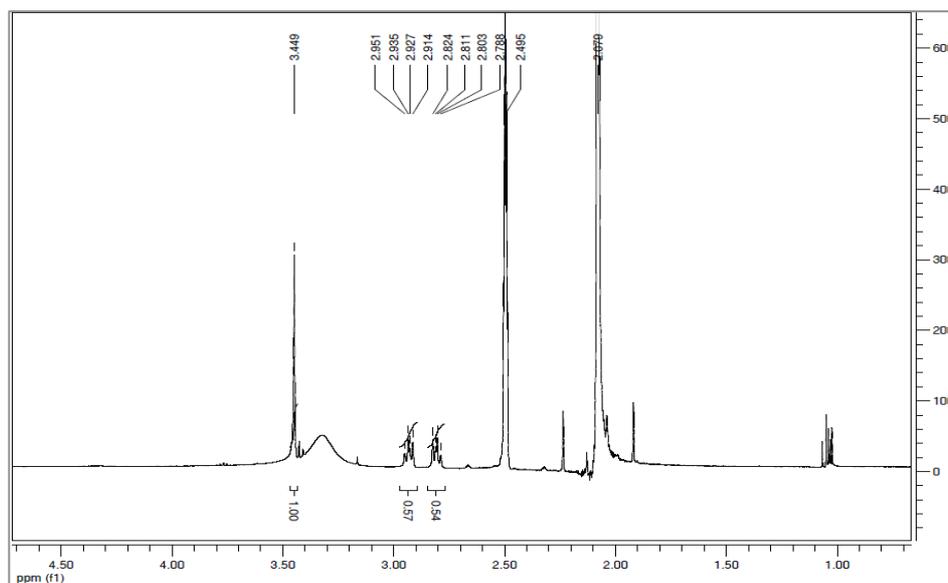
7.6.1.2. Espectro ^1H RMN del ligando L

Figura 7.10 Espectro de RMN de la descarboxilación para obtener el ligando L. ^1H RMN $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz, ppm).

7.7. Vía C.1 Cis

7.7.1. TGA

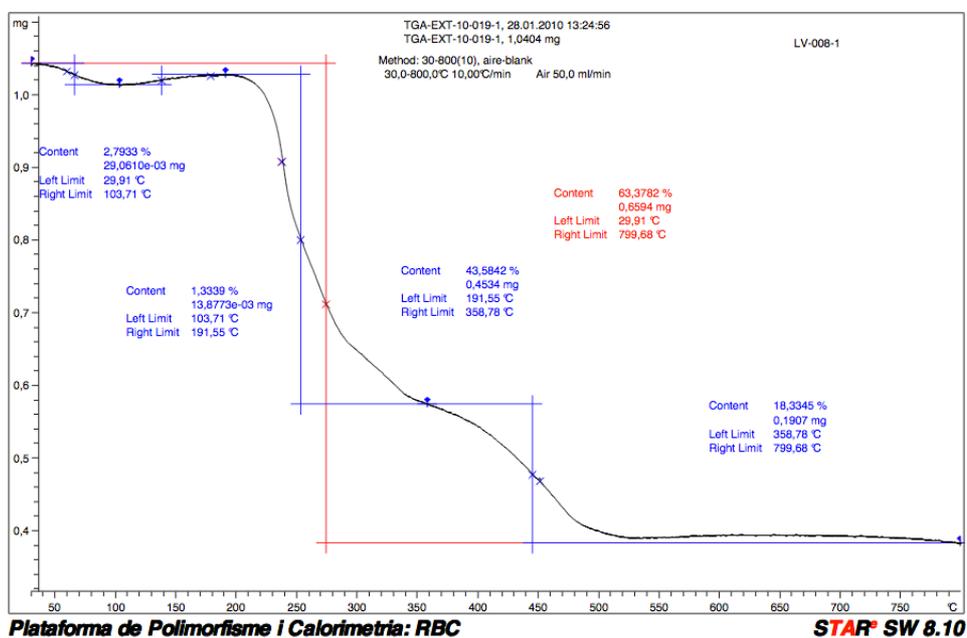


Figura 7.11 Análisis termogravimétrico del producto C.1 Cis.

7.7.2. Espectro ^1H RMN

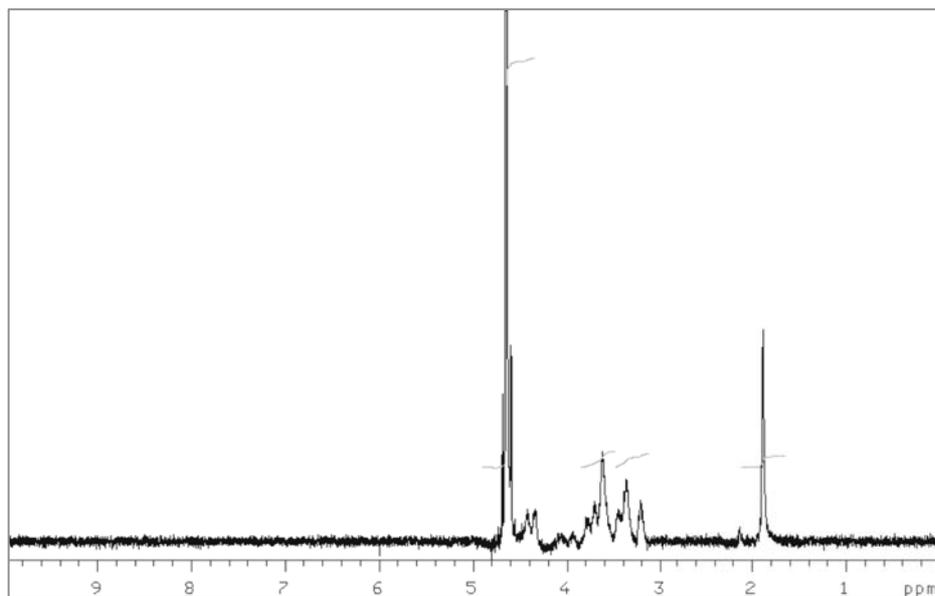


Figura 7.12 Caracterización del C.1 Cis por RMN. El espectro de ^1H (400 MHz, D_2O).

7.8. Vía B 5-Fu

7.8.1. Derivado ácido del 5-Fu

7.8.1.1. Espectro ^1H RMN

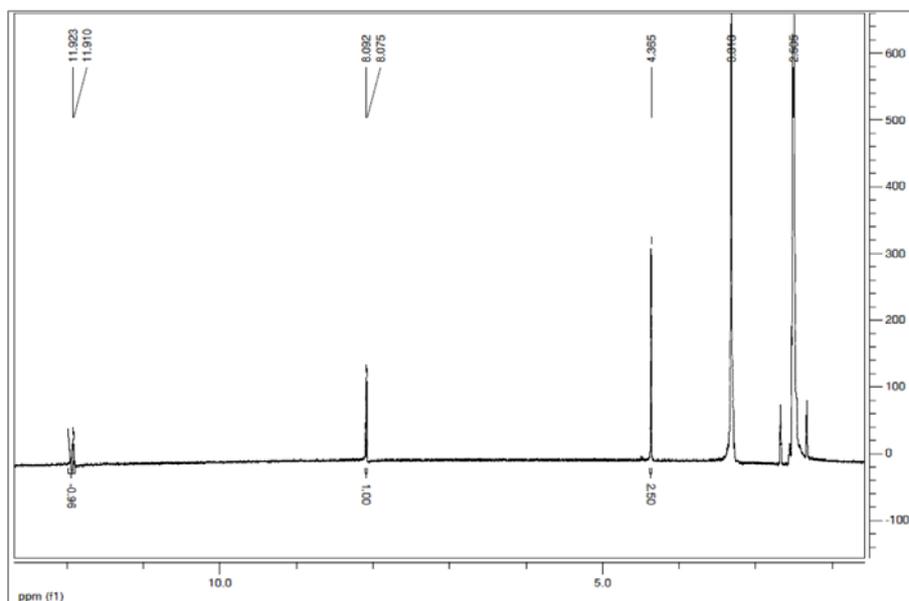


Figura 7.13 Espectro RMN ^1H del ácido derivado de la vía B 5-Fu. ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz, ppm).

7.8.1.2. Espectro ^{19}F RMN

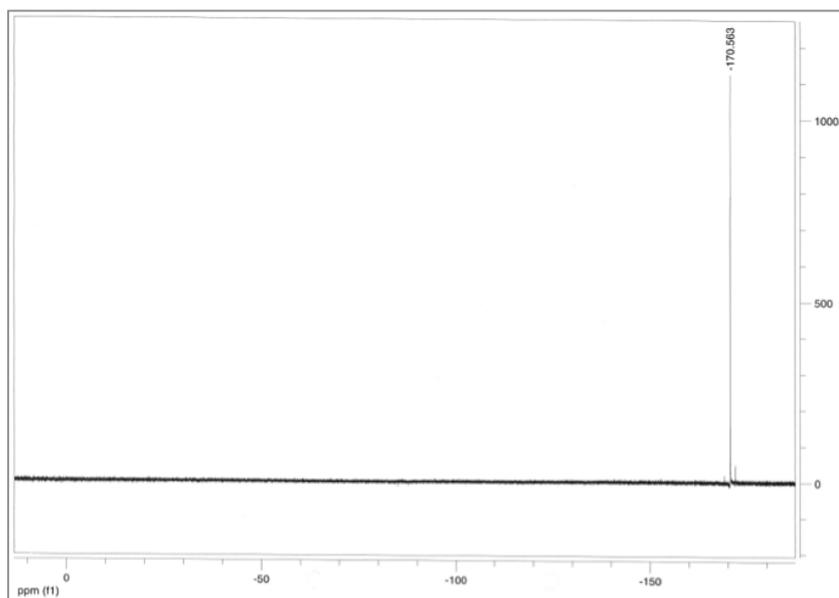


Figura 7.14 Espectro RMN ^{19}F del ácido derivado del 5-Fu. ^{19}F RMN $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz, ppm.

7.8.2. Derivado tiolado del 5-Fu

7.8.2.1. Espectro ^1H RMN

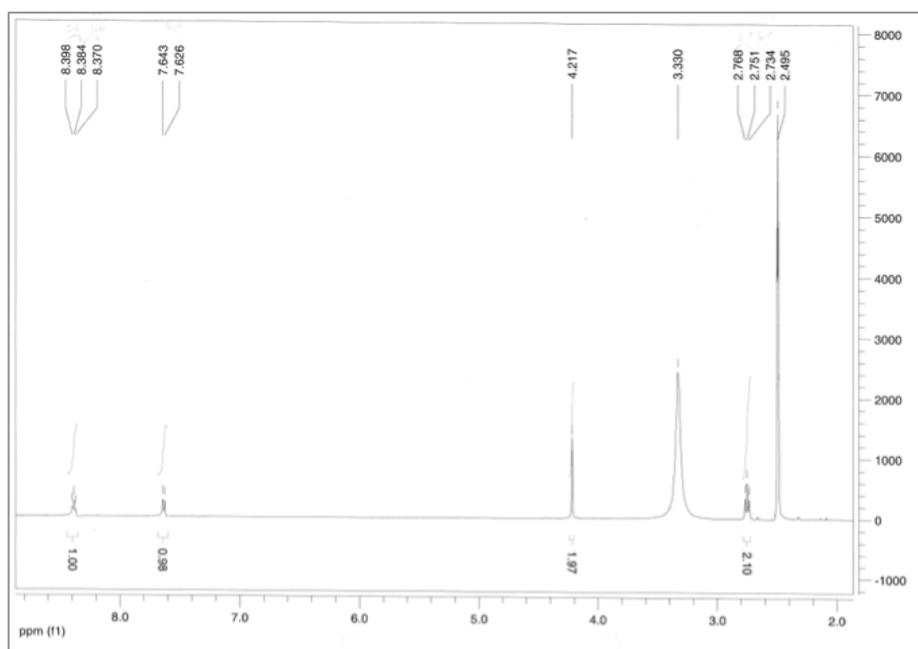


Figura 7.15 Espectro RMN ^1H del derivado tiolado del 5-Fu. ^1H RMN $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz, ppm).

7.8.2.2. Espectro ^{19}F RMN

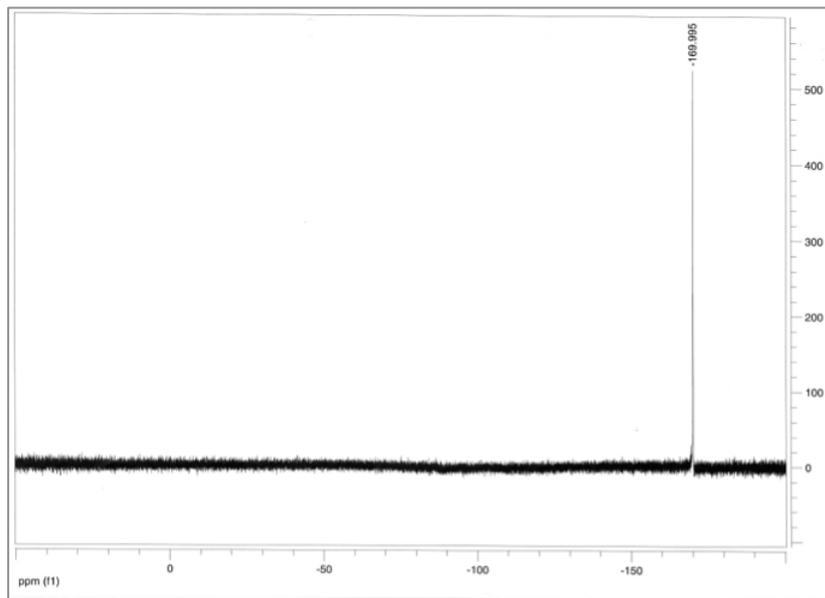


Figura 7.16 Espectro RMN ^1H del derivado tiolado del 5-Fu. ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm).

7.8.2.3. Espectro HPLC-MS

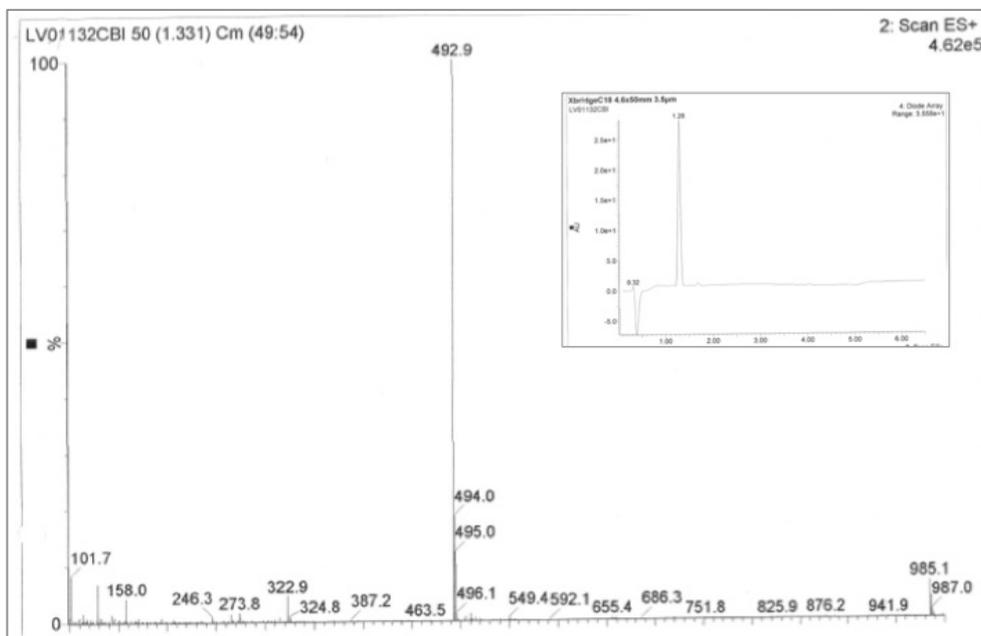


Figura 7.17 Caracterización de la modificación vía B 5-Fu por HPLC-MS. Espectro del detector UV-Vis y espectro de masas.

7.8.3. Espectro ^{19}F RMN de la vía B 5-Fu

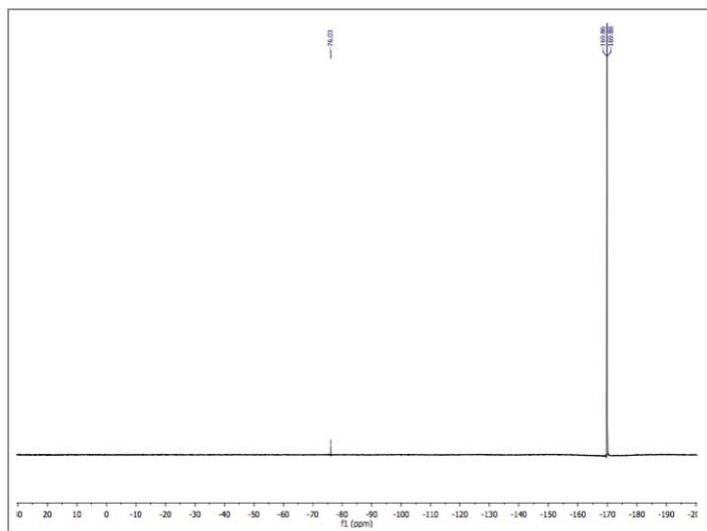


Figura 7.18 Caracterización del conjugado vía B 5-Fu por RMN. Conjugación EDS1-5-Fu. ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm.

7.9. Vía C 5-Fu

7.9.1. Espectro ^{19}F RMN

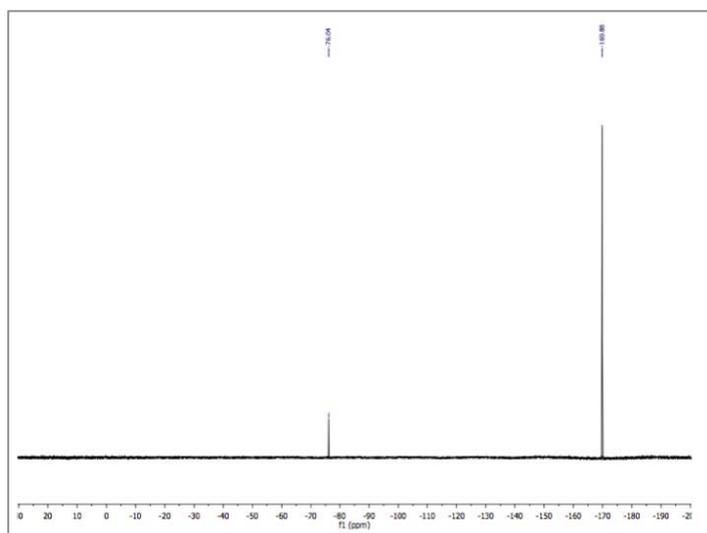


Figura 7.19 Caracterización del conjugado vía C 5-Fu por RMN. ^{19}F RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 400 MHz, ppm).

7.10. 5-Fu comercial

7.10.1. Espectro ^{19}F RMN

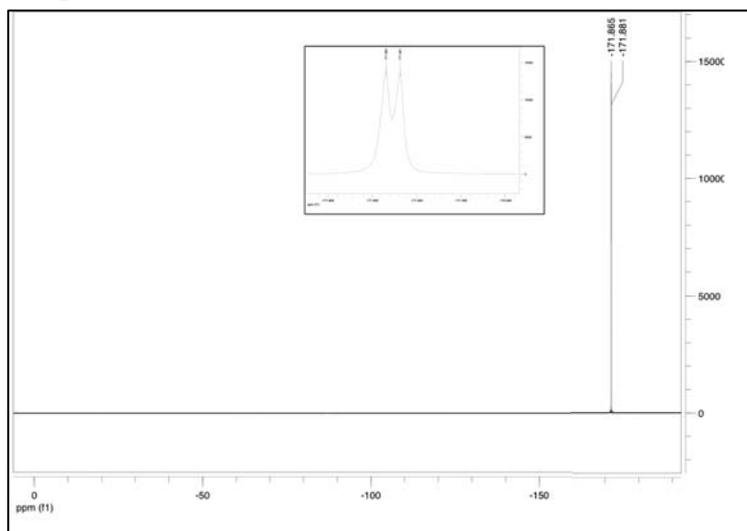


Figura 7.20 Caracterización del 5-Fu por RMN. ^{19}F RMN $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz, ppm).

APÉNDICE

8. APÉNDICE

8.1. Publicaciones

8.1.1. Apéndice 1

In: Nanotechnology
Editor: Nazrul Islam

ISBN: 978-1-63117-561-9
© 2014 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 18

NANOMEDICINE: THE NEW AGE OF THERAPEUTICS

***Luciano Sobrevals¹, Hanna Parkkola¹, Laura Vivero¹,
Rafael Miñana¹ and Judith Sendra^{1,*}***

¹ENDOR Nanotechnologies, Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona, Spain

ABSTRACT

Nanotechnology is a relatively recent field of scientific research. Richard Feynman first propounded the concept in 1959. An official definition of nanotechnology is still a controversial issue and there are many scientific committees hard at work to harmonize the term and obtain universal regulation. There are enormous expectations with regard to the potential for nanotechnology in many different scientific fields. Over the last ten years, a large number of potential applications for nanotechnology have been described, most especially in the fields of biology, biotechnology and medicine. The term nanomedicine is used to describe the medical application of nanotechnology in the diagnosis, prevention and treatment of several diseases. Such applications have led to significant advances in clinical areas such as oncology (nanoncology), neuroscience, cardiovascular disease and many others. Nanomedicine has the potential to improve the efficiency of existing drugs while reducing their side effects, to create new therapeutic systems, to enhance diagnosis to achieve higher levels of detection, to create new scaffolds for tissue regeneration and to create internal surveillance systems in order to avoid the development of disease. With the great potential of nanotechnology it is expected to have significant impact, both on an economic and technological level. However, concerns about possible toxicity and certain ethical issues are delaying the launch of this promising new technology. The purpose of the present review is to highlight new findings in the field of nanomedicine, most especially in the area of oncology, and to describe its major benefits, possible risks and current regulations, as well as to enumerate some of the nanomaterials developed up to now. Additionally we discuss future prospects for the development of certain emerging nanotechnologies and their potential contributions to medicine and market impact will be discussed.

* Correspondence should be addressed to: Judith Sendra, Baldiri Reixac 15, Edifici Hèlix, Parc Científic de Barcelona (08028), Barcelona, Spain; phone: +34 934 020 468; E-mail: judith.sendra@endornanotech.com.

8.1.2. Apéndice 2

Gold Nanoparticle Stability Studies in Physiological Media

Laura Vivero, Hanna Parkkola, Judith Sendra, Joaquín Querol,
Jesús Pablo G. Cambero, Marc Ramis

Abstract

Most biological studies require a physiological medium with high salt concentration. The aim of this study was to investigate the stability of Gold nanoparticles (GNPs) in saline media. We compared non-coated GNPs and Hyaluronan coated GNPs (HA-GNPs) in different saline solutions.

GNP stability study was performed in embryo, daphnia, fish and worm physiological media with different saline concentrations. All GNPs samples were analyzed at different times by UV-VIS, Dynamic Light Scattering (DLS) and TEM in order to examine the stability of the GNPs.

The results demonstrated that HA-GNPs were stable in all saline media while GNPs were not. The UV-VIS showed a maximum peak when GNPs were stable and this peak diminished when GNPs aggregated. DLS technique showed the different size of GNPs. HA-GNPs presented the same size at different times of analysis. GNPs were visualized by TEM which showed that GNPs had an irregular shape but HA-GNPs presented a spherical shape.

This study is an essential step in determining the behavior of gold nanoparticles, and is highly substantial for risk assessment.

8.1.3. Apéndice 3

Gold Nanoparticles and Cell Viability Evaluation

Hanna Parkkola, Laura Vivero, Marc Ramis, Joaquin Querol, Judith Sendra

Abstract

Nanotechnology is a rapidly developing field of biomedical research. Due to their size, nanoparticles (NPs) possess physicochemical characteristics (particle size and distribution, agglomeration state, shape, crystal structure, chemical composition, surface area, surface chemistry, surface charge and porosity) that can affect their biological activity compared to the bulk substances. These characteristics are not necessarily routinely considered in toxicity screening tests.

Our laboratory has used several cell viability assays to evaluate biocompatibility of hyaluronic acid-coated gold nanoparticles (HAGNPs). Mitochondrial metabolism and lysosomal membrane integrity measuring experiments showed differing results. We discovered that NPs can react with the components of some of these tests and interfere with colorimetric assays. We also found that N-acetylglucosaminidase activity measuring test was the most suitable for GNP toxicity assessment.

We want to emphasize suitability evaluation when choosing *in vitro* techniques for NP toxicity assessment. Standardizing toxicological assays for nano-sized compounds is highly substantial for achieving reproducible results.

Use of engineered nanomaterials also raises ethical, social and regulatory issues that have to be considered in order to understand and minimize the risks of their effects on environment and public health. For instance questions of social justice, access to health care and the use of nanotechnology for physical enhancement become increasingly important.

8.2. Posters

8.2.1. Apéndice 4



**NANO
TECH
NOLOGIES**

METALLIC NANOPARTICLES AND CYTOTOXICITY ASSESSMENT

Hanna Parkkola, Laura Vivero, Mireia Vega, Marc Ramis, Joaquin Querol, Judith Sendra
 Endor Nanotechnologies, Parc Científic de Barcelona, Baldiri i Reixac 15, 08028 Barcelona, Spain
 Contact: hanna.parkkola@endornanotech.com, judith.sendra@endornanotech.com




1. INTRODUCTION

Engineered nanoparticles (NP) are derived from many substances and constitute numerous forms. Concurrently with the rapidly developing nanomedical research, grows the need for understanding the effects of NPs for human health and environment. The physicochemical characteristics of NPs are not routinely considered in toxicity screening tests and various nanomaterials have been reported to interfere with different cytotoxicity assays.

2. MATERIALS & METHODS

We used three different cell viability assays to evaluate biocompatibility of gold and silver nanospheres (NS) and gold nanorods (NR). Human dermal fibroblasts (HDFs) were treated with hyaluronic acid (HA) coated gold and silver nanospheres, and polyethyleneglycol (PEG) or cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) coated nanorods for 24 hours. HA- & PEG-coating were attached to protect NPs and to render them more inert in biological environments, CTAB was needed in the production process of NRs. After 24 h of treatment, mitochondrial metabolism was assessed with MTT & WST-1 assays and lysosomal membrane integrity with Neutral red (NRed). Experiments were performed with 10-16 parallel repeats and repeated independently 3-4 times.

3. RESULTS

Three different assays (MTT, NRed & WST-1) showed differing results in the evaluation of nanoparticle cytotoxicity. Both gold & silver NSs seemed to interfere with MTT & NRed assays. MTT assay showed higher toxicity than the other two assays, which wasn't detected visually by microscope, but gave also false-positive results (Fig.1A, 2A). No toxicity was detected with NRed assay, but cell viability appeared higher than in control (Fig. 1B, 2B). WST-1 assay gave the most reliable results; cell viability wasn't higher with treatment than in control; silver NSs didn't show toxicity with lower concentrations than 125 ppm and gold NSs didn't show toxicity (Fig. 1C, 2C). WST-1 assay was also used to assess gold NR toxicity and the results were consistent with expectations; with CTAB coating NRs showed very high toxicity (Fig. 3A) and with PEG coating only with high concentrations (Fig. 3B). No notable interference was detected.

4. CONCLUSIONS

Metallic nanoparticles can react with the components of colorimetric toxicity assays. This could be due to adsorption of the dye to residual NPs. NPs can attach cultured cells and e.g. thiol formation is a possible way of interaction between NPs and assay components. The absorption peaks of NPs can be very close to the wavelengths which cytotoxicity assays use for quantification of absorbance and this could cause interference in the measurements; cell viability may seem much higher than it actually is. In general there is a lack of nanotoxicity information and therefore correlations between experiments are difficult to make. We want to point out the importance of *in vitro*-technique suitability for different NPs. Standardizing toxicological assays for nanotechnology is highly substantial for achieving reproducible results.

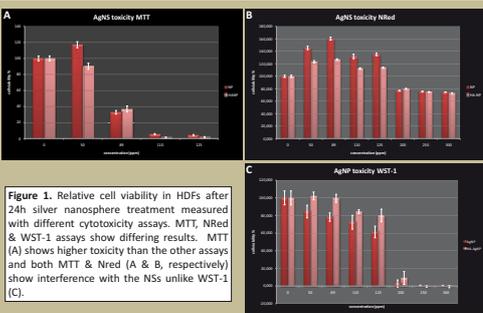


Figure 1. Relative cell viability in HDFs after 24h silver nanosphere treatment measured with different cytotoxicity assays. MTT, NRed & WST-1 assays show differing results. MTT (A) shows higher toxicity than the other assays and both MTT & Nred (A & B, respectively) show interference with the NSs unlike WST-1 (C).

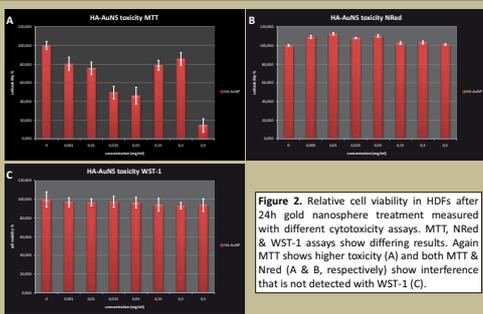


Figure 2. Relative cell viability in HDFs after 24h gold nanosphere treatment measured with different cytotoxicity assays. MTT, NRed & WST-1 assays show differing results. Again MTT shows higher toxicity (A) and both MTT & Nred (A & B, respectively) show interference that is not detected with WST-1 (C).

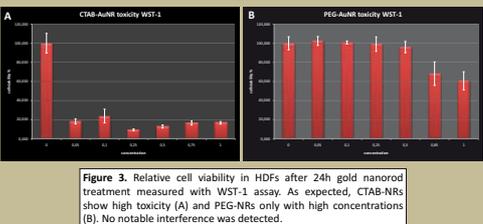


Figure 3. Relative cell viability in HDFs after 24h gold nanorod treatment measured with WST-1 assay. As expected, CTAB-NRs show high toxicity (A) and PEG-NRs only with high concentrations (B). No notable interference was detected.

REFERENCES

- Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Jan 15;234(2):222-35.
- Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 Jun;72(2):370-7.
- Stone V, Johnston H, Schins RP. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(7):613-26.

8.3. Patentes

8.3.1. Apéndice 5

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
 (19) World Intellectual Property Organization
 International Bureau

(43) International Publication Date
 5 July 2012 (05.07.2012)




(10) International Publication Number
WO 2012/089768 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
 PCT/EP2011/074150

(22) International Filing Date:
 28 December 2011 (28.12.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
 P201031971 28 December 2010 (28.12.2010) ES

(71) Applicant (for all designated States except US): **ENDOR NANOTECHNOLOGIES, S.L.** [ES/ES]; Edificio Helix - c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES).

(72) Inventors; and
 (75) Inventors/Applicants (for US only): **VIVERO SANCHEZ, Laura** [ES/ES]; Edificio Helix, c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES). **SENDRA CUADAL, Judith** [ES/ES]; Edificio Helix, c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES). **PARKKOLA, Hanna** [FI/ES]; Edificio Helix, c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES). **QUEROL SASTRE, Joaquín** [ES/ES]; Edificio Helix, c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES). **RAMIS CASTELLTORT, Marc** [ES/ES]; Edificio Helix, c/ Baldiri Reixac, 15, E-08028 Barcelona (ES).

(74) Agent: **CARPINTERO LOPEZ, Francisco**; Herrero & Asociados, S.L., Alcalá, 35, E-280014 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
 — with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SYSTEM FOR THE RELEASE OF A THERAPEUTIC AGENT, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING IT, THE PREPARATION AND MEDICAL USE THEREOF

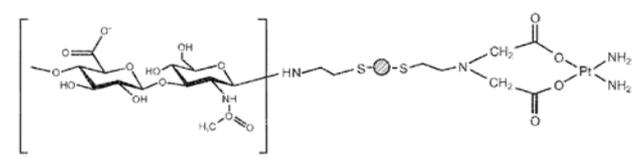


FIG. 1

(57) Abstract: The present invention describes a new system for the selective and controlled release of a therapeutic agent comprising: (i) a carrier comprising: a) a metal nanoparticle and b) a hydrophilic HA coating bound to the metal nanoparticle through at least a first ligand, and (ii) at least one therapeutic agent bound to the nanoparticle, to the HA or encapsulated in the HA coating. The invention also describes pharmaceutical compositions containing the system for release, their use in the treatment of diseases such as cancer and a method for obtaining them.



WO 2012/089768 A1

