

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y
BIOINORGÁNICA



TESIS DOCTORAL

**Nanotransportadores basados en sílice
mesoporosa para tratamiento antitumoral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eduardo Guisasola Cal

DIRECTORES

Alejandro Baeza García
Daniel Arcos Navarrete

Madrid, 2017



Nanotransportadores basados en sílice Mesoporosa para Tratamiento Antitumoral

**Eduardo Guisasola Cal
Madrid 2016**



**Memoria para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica**

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica
Facultad de Farmacia



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral

Memoria presentada por

Eduardo Guisasola Cal

Directores

Alejandro Baeza García

Daniel Arcos Navarrete

Para optar al grado de

Doctor por la universidad Complutense de Madrid

Madrid 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

Dr. Alejandro Baeza García con DNI 02644576J como Director de la Tesis Doctoral

Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral

realizada en el **Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica** por el doctorando **Eduardo Guisasola Cal**, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa

En Madrid, a 6 de septiembre de 2016

EL DIRECTOR DE TESIS

Fdo.: **Alejandro Baeza García**



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

Dr. Daniel Arcos Navarrete con DNI 02896614V como Director de la Tesis Doctoral

Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral

realizada en el **Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica** por el doctorando **Eduardo Guisasola Cal**, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa

En Madrid, a 6 de septiembre de 2016

EL DIRECTOR DE TESIS

Fdo.: **Daniel Arcos Navarrete**

Agradecimientos

El presente trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda, apoyo, ánimo e interés de muchas personas a las que me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento. Ellas son las que han hecho posible esta tesis doctoral.

Quiero agradecer especialmente a la Profesora María Vallet Regí haberme ofrecido la oportunidad de trabajar con ella y su grupo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio. Gracias Marita por aportarme esa fuerza y tesón, claves para llevar a cabo una investigación que ha resultado ser tan exigente como apasionante, y que seguro me ayudará de ahora en adelante.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Alejandro Baeza García y el Dr. Daniel Arcos Navarrete, a los que quiero agradecer su apoyo, su empeño y desempeño durante estos años. Gracias por creer en mí, por vuestra confianza y consejos que me acompañarán sin duda para siempre. También agradecer a Edu Ruiz y María del Mar Sanz Lluh que me ayudaron en los primeros pasos de esta aventura.

Deseo expresar mi agradecimiento al Campus de Excelencia Internacional de Moncloa por la concesión de la beca PICATA, y a su equipo por todo el apoyo y resolución que han demostrado. También al Centro de Investigación Biomédica en Red en el área temática de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) por su apoyo económico para la realización de mi estancia. Mi gratitud al Dr. Jesús Martínez de la Fuente, a María Moros y demás compañeros por abrirme las puertas de su laboratorio y su gran acogida durante mi estancia en Zaragoza. Agradezco también a los Centros de Apoyo a la Investigación que han hecho posible esta tesis doctoral, y especialmente al Centro de Microscopía Electrónica y al ISOM, que me han permitido contar con unas instalaciones y personal al alcance de muy pocos.

Gracias al Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, a la Facultad de Farmacia y a la Universidad Complutense de Madrid, donde no he podido sentirme mejor acogido. Aquí he podido contar con gente excepcional y sentirme en casa. Personas como Juan Carlos, director del departamento, que siempre ha mirado por nosotros y regalado divertidas sonrisas maliciosas. O como Pili y Jose, que siempre tienen un hombro, una sonrisa, una gracia, he incluso un gruñido en el que apoyarte. Sin olvidarme de Ana, Juan, Vicky, Jesús, Miguel, Blanca, y demás profesores del departamento, que tanto me habéis ayudado y hecho del día a día una experiencia inolvidable.

Durante este tiempo he tenido la suerte de conocer a gente excepcional a quien agradecer su apoyo incondicional. Empezando por mis queridos, afamados y nunca bien ponderados compañeros de despacho. Primero llegó Marina, que sin termostato y con un martilleo de pájaro carpintero, consigue contagiarme de su energía y alegría. Sin apenas ruido llegó Gonzalo, y ahora sin su compañía dentro y fuera del laboratorio ya no puedo imaginarme esta fenomenal etapa de mi vida. También a Ángel, que como no teníamos suficiente con compartir amistad, carrera, amigos y piso, decidimos que trabajar juntos era la mejor idea, y fue aún mejor. A Fer, con el que siempre he podido contar y tantas veces el mundo arreglar. A los que todavía batalláis en el duro camino de realizar una tesis quiero daros las gracias y muchos ánimos para el viaje: Juan Luis (un fenómeno en lo divino y lo humano), Nati

■ Agradecimientos

(adorabilidad infinita y contagiosa), Rocío (no te rías que te atrancas), Miguel (genio y figura de pura cepa) y Sandra (¿Hola?). Son muchas las personas que han pasado por farmacia a dejarme su granito de arena y a los que agradecer, tanto los que siguen como los que ya se fueron: DaniLo (biólogo sin fronteras), Marina T. (τι κόνεις), Chico (cuidado con el café), Sergio (Ondiñas veñen), Juliane, Shruti, Giulia, Giammarco, Rafa, Rebeca, Patri y alguno más que quizás he podido dejarme en el tintero.

Nunca dejaré de agradecerles a mi familia y amigos el esfuerzo que ha sido aguantarme tantos años sin apenas rechistar.

Gracias a Silvia, Passi, Sara y Paz, científicos locos que conocí durante la carrera todavía me acompañan, incansables en su apoyo siempre. A mi gente del erasmus, Teemu, Rob, Natalia, Luis, Lucía, Laura, María, Joana, Andrés, Dani, Nacho, Paco, Candice y muchos más, con los que pude compartir una etapa única en la vida. Aprender y disfrutar de vosotros y con vosotros es lo que lo hizo único. A Pajares, al que conocí a la semana de nacer y desde entonces nada ha sido capaz de separarnos. A Hernán, que al tener los pies en la tierra y la mirada en el cielo ha conseguido sacar lo mejor de mí. También a Jorge, que por mucho tiempo sin vernos que pase, siempre me ha recordado lo genial que es la pasión por lo que uno hace. A todo el G-III, tanto con los que he tenido el honor de compartir jefatura, como los que me habéis hecho crecer y dejado veros crecer, gracias por dejarme ser de vuestra misma sangre. Vuestra amistad y apoyo incondicionales son dos piernas con las que subir a cualquier cima (guiño, patada, guiño).

Por último quiero agradecer a toda mi familia el grandísimo apoyo que siempre me han brindado. En especial a mi madre, mi padre, mi hermana, mi prima María, Marisol y Guille, sin los que no sería yo, a los que les debo todo. Y a ti Marta. Porque con tu mano en la mía, recorreremos el camino. Se hará gracias a ti. Pues tú eres la única para mí.

Gracias a todos de corazón.

Glosario de abreviaturas

ACF	Administración controlada de fármacos
MSNs	Nanopartículas mesoporosas de sílice, del inglés <i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
CMA	Campo magnético alterno
MMSNs	Nanopartículas magnéticas de sílice mesoporosa, del inglés <i>Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
NIPAM	<i>N</i> -isopropilacrilamida, del inglés <i>N-isopropylacrylamide</i>
NHMA	<i>N</i> -hidroximetilenacrilamida, del inglés <i>N-(hydroxymethyl)acrylamide</i>
MBA	<i>N,N</i> -metilenbisacrilamida, del inglés <i>N,N-methylenbisacrylamide</i>
MPS	3-(Trimetoxisilil)propil metacrilato, del inglés <i>3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate</i>
PEI	Polietilenimina, <i>polyethylenimine</i> en inglés
VSM	Magnetometría de muestra vibrante, del inglés <i>Vibrating Sample Magnetometer</i>
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, del inglés <i>Fourier Transform Infra Red Spectroscopy</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>
IAA	Ácido 3-indolacético, del inglés <i>3-indoleacetic acid</i>
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés <i>Horseradish peroxydase</i>
DLS	Dispersión de luz dinámica, del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i>
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector de tiempo de vuelo, del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
HPLC	Cromatografía de alta eficacia en fase líquida, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
PDA	Polidopamina, del inglés <i>Polydopamine</i>
STEM	Microscopía electrónica de transmisión modo barrido, del inglés <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>
SPION	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, del inglés <i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>
XRD	Difracción de rayos X, del inglés <i>X-Ray Driffraction</i>
MFS	Sistema fagocítico mononuclear, del inglés <i>mononuclear fagocitic system</i>
MRI	Resonancia magnética nuclear de imagen, del inglés <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
EPR effect	Efecto de permeabilidad y retención aumentada, del inglés <i>enhanced permeability and retention effect</i> .
ADEPT	Terapia enzima-profármaco dirigida por anticuerpos, del inglés <i>Antibody directed enzyme-prodrug therapy</i>
GDEPT	Terapia enzima-profármaco dirigida genéticamente, del inglés <i>Gene directed enzyme-prodrug therapy</i>
OA	Ácido oleico, del inglés <i>oleic acid</i>

Glosario de abreviaturas

APS	Persulfato amónico, del inglés <i>amonium persulfate</i>
STI	Inhibidor de tripsina de soja tipo II-S, del inglés <i>Soyabean trypsin inhibitor type II-S</i>
¹ H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón, del inglés <i>Nuclear magnetic resonance</i>
AzPTMS	3-azidopropiltrimetoxisilano
CIPTMS	3-cloropropiltrimetoxisilano
SA-(NHS) ₂	Éster de bis (<i>N</i> -hidroxisuccinimida) del ácido subérico
bisCat-Im	bis-catecol imina
ⁱ PrOH	Isopropanol
APTES	3-Aminopropiltriethoxisilano, del inglés <i>3-(Aminopropyl)triethoxysilane</i>
C ₁₆ TAB, CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, del inglés <i>hexadecyl trimethylammonium bromide</i>
DOX	Doxorrubicina
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X, del inglés <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
EPR	Permeabilidad mejorada y retención, en inglés <i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FA	Ácido fólico, del inglés <i>Folic Acid</i>
FA-R	Receptor de ácido fólico, del inglés <i>Folic Acid Receptor</i>
HR-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, del inglés <i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
SN2	Sustitución nucleófila bimolecular
STEM	Microscopía electrónica de Barrido para Transmisión, del inglés <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>
TEOS	Tetraetilortosilicato
TMOS	Tetrametilortosilicato
TGA	Análisis termo gravimétrico, del inglés <i>Thermogravimetric analysis</i>
GSH	Glutación, del inglés <i>Glutathione</i>
GPC	Cromatografía de permeabilidad en gel, del inglés <i>Gel permeation chromatography</i>

*A Nicolás Eduardo y toda su familia. Por todo y
para siempre. Os dedico esta tesis. ||*

Índice

Resumen: Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral	3
Summary: Mesoporous silica based nanocarriers for cancer treatment...7	7
I.Introducción General.....	13
I.1. Nanotecnología y Nanomedicina.....	13
I.1.1. Nanotecnología	15
I.1.1.1. Fundamentos.....	15
I.1.1.2. Obtención de nanomateriales.....	15
I.1.2. Nanomedicina	16
I.1.2.1. Descripción e impacto	16
I.1.2.2. Fundamentos de la nanomedicina aplicada al cáncer	17
I.1.2.3. Nanotransportadores para la administración de fármacos	21
I.2. Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs)	25
I.2.1. Síntesis de MSNs	26
I.2.2. Funcionalización de MSNs.....	28
I.2.3. Estabilidad coloidal de las MSNs	30
I.2.4. MSNs en administración controlada de fármacos	31
I.3. Nanotransportadores estímulo-respuesta	33
I.3.1. Sistemas de liberación de fármacos mediante estímulo magnético	35
I.4. Generación in situ de agentes citotóxicos.....	39
I.5. Obtención de nanocápsulas de polidopamina	41
II.Resultados y Discusión	47
II.1. Síntesis de MMSNs estímulo-respuesta para ACF mediante compuertas poliméricas termosensibles	49
II.1.1. Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro	49
II.1.2. Inclusión de SPION en la matriz de nanopartículas de sílice mesoporosa .	51
II.1.3. Recubrimiento de MMSNs con polímeros termosensibles.....	53
II.1.4. Artículo 1. “Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles”	69
II.1.5. Artículo 2. “Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect”	81

II.1.6. Artículo 3. “Design of thermoresponsive polymeric gates with opposite controlled release behaviors”	95
II.2. Síntesis de nanotransportadores híbridos MSN-cápsula enzimática para la generación de citotóxicos <i>in situ</i>	107
II.2.1. Síntesis de cápsulas poliméricas de HRP sensibles a pH ácido	108
II.2.2. Estrategias de anclaje de HRPc a la superficie de las MSNs.....	110
II.2.3. Síntesis y anclaje de cápsulas enzimáticas no degradables	111
II.2.4. Artículo 4. “Hybrid Enzyme-Polymeric Capsules/Mesoporous Silica Nanodevice for In Situ Cytotoxic Agent Generation”	117
II.3. Síntesis de cápsulas de polidomamina como nanotransportadores para ACF	133
II.3.1. Artículo 5. “Green Synthesis of Polydopamine-Like Nanocapsules via Water-triggered removal of a Sacrificial Mesoporous Silica Template”	139
III. Conclusiones.....	167
Anexo A. Técnicas de caracterización	169
A.1. Caracterización estructural	169
A.2. Caracterización magnética	172
A.3. Caracterización fisicoquímica	173
A.4. Ensayos celulares.....	176
IV. Bibliografía	179

Resumen: Nanotransportadores basados en sílice mesoporosa para tratamiento antitumoral

Ésta tesis doctoral se centra en el diseño, síntesis y caracterización de nanosistemas para el tratamiento del cáncer basados en la utilización de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs). La quimioterapia tradicional carece de selectividad hacia las masas tumorales, por lo que los fármacos anticancerígenos causan graves efectos secundarios en los pacientes. Además, la alta toxicidad de estos fármacos limita la dosis y merma la eficacia de los tratamientos. La aplicación de nanomateriales en oncología puede mejorar la acción de los agentes de quimioterapia tradicionales en términos de biodisponibilidad, especificidad y seguridad, gracias a su tamaño nanométrico. El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido desarrollar nuevos dispositivos para la administración controlada de fármacos (ACF) que mitiguen los efectos adversos de las terapias sistémicas con citotóxicos. Para ello es necesario liberar la carga antitumoral de manera muy localizada. Esto se consigue mediante la acumulación de los nanotransportadores en la zona tumoral. De esta manera se alcanzan altas concentraciones de fármaco solo en el tejido diana, lo que resulta en una menor toxicidad para el paciente y por tanto una disminución en los efectos secundarios de la terapia. Las MSNs muestran excelentes propiedades para transportar fármacos antitumorales debido a su alta área superficial y volumen de poro, actuando así como reservorio de citotóxicos hasta la acumulación de las MSNs en el tejido diana. En esta tesis doctoral, se han estudiado diferentes aproximaciones para la ACF como son: la liberación asistida por campos magnéticos alternos, la generación de agentes citotóxicos *in situ* y la obtención de nanocápsulas de polidopamina; esta última utilizando nanopartículas mesoporosas de sílice como plantilla.

Para la obtención de dispositivos de liberación de fármacos sensibles a campos magnéticos alternos (CMA), se encapsularon nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ en matrices mesoporosas de sílice obteniendo nanopartículas magnéticas de sílice mesoporosa (MMSNs). Para retener fármacos en el interior de la matriz de sílice, las MMSNs se recubrieron con diferentes co-polímeros termosensibles formados mediante combinaciones de los monómeros *N*-isopropilacrilamida, *N*-hidroximetilacrilamida, *N,N*-metilbisacrilamida y polietilenimina (NIPAM, NHMA, MBA, PEI). Estos polímeros sintetizados experimentan una transición lineal-globular a temperaturas entre los 37 °C y los 42 °C. El cambio conformacional de la capa polimérica puede controlar el proceso de liberación de las especies alojadas en el interior de la sílice, permitiendo o impidiendo su liberación. El campo magnético alterno fue escogido como estímulo para liberar la carga citotóxica ya que es altamente penetrante en los tejidos, no es invasivo y es capaz de inducir un calentamiento en ciertas nanopartículas magnéticas. Este calentamiento induce un cambio conformacional en la capa polimérica instalada en la superficie, liberando la carga citotóxica alojada en el interior de los nanotransportadores.

En una primera aproximación la cobertura polimérica se diseñó con un doble propósito; por un lado actuar como barrera de difusión sensible a la temperatura capaz de retener la carga de moléculas pequeñas atrapadas en el interior de la red porosa de sílice, y por el otro conferir la capacidad de retener proteínas en su capa polimérica a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Mediante técnicas de caracterización como la magnetometría de muestra vibrante (VSM), porosimetría de absorción de nitrógeno, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia infrarroja de transformada de

Fourier (FTIR) entre otras, se determinó que estos nanotransportadores contenían un 47 % en peso de material magnético, un tamaño en torno a 60 nm y una cobertura polimérica en superficie, lo que junto a la alta porosidad y superficie características de MSNs, los hace apropiados como sistemas de ACF. Se observó que el sistema era capaz de liberar dos especies de naturaleza muy diversa (moléculas pequeñas y proteínas) en respuesta al campo magnético. Sin embargo, dada la naturaleza compleja del recubrimiento polimérico no fue posible controlar la temperatura de transición de forma precisa, lo que compromete su potencial aplicación en medicina.

Con la finalidad de obtener una temperatura de transición precisa, se sintetizó una batería de co-polímeros lineales con diferentes proporciones de NIPAM/NHMA donde se concluyó que la relación 90:10 de NIPAM/NHMA establecía la temperatura de transición en los 42 - 43 °C. Mediante espectroscopia de fluorescencia se comprobó la temperatura de transición del polímero por la liberación de moléculas modelo desde el interior de la matriz porosa a diferentes temperaturas. Además, se analizaron los parámetros de aplicación del campo magnético alterno a diferentes frecuencias y amplitudes de campo con el equipo de hipertermia magnética DM100 system (nanoScale Biomagnetics) con el fin de encontrar las condiciones óptimas para un calentamiento eficaz. Con el objeto de demostrar que este nanotransportador es capaz de liberar su carga sin la necesidad de aumentar la temperatura global de la muestra (el llamado “efecto de puntos calientes” o *hot spot effect*), se realizaron experimentos de liberación manteniendo la temperatura global de la muestra a 37 °C durante la aplicación de un campo magnético alterno. Los resultados confirmaron que éste nanodispositivo produce suficiente temperatura local para producir la transición del polímero y la liberación de la carga sin la necesidad de aumentar la temperatura global del medio en el que se encuentra. Este hecho implica que el nanotransportador posee la capacidad de funcionar a pesar de la rápida disipación de calor que se produce en tejidos vivos por medio del torrente sanguíneo, demostrando por tanto su aplicabilidad.

El proceso de liberación mediante calentamiento inducido por CMA puede activarse o inhibirse en función de la densidad de recubrimiento de polímero en la superficie de las nanopartículas. La inserción de monómeros entrecruzantes resultó clave para liberar la carga al alcanzar una temperatura por encima de la temperatura de transición. En contraposición, se observó que con una estructura polimérica lineal y de menor densidad el perfil de liberación era el opuesto, reteniendo la carga en el interior de los poros cuando el dispositivo se encuentra por encima de la temperatura de transición de la corteza polimérica.

El uso de recubrimientos poliméricos que actúen como barreras de difusión no asegura la retención total de las especies alojadas en el interior de la matriz porosa. Es habitual que un pequeño porcentaje de las mismas (entre un 10-20%) se libere de forma prematura antes de alcanzar el tejido diana. Este hecho puede plantear problemas de toxicidad sistémica en el caso del transporte de moléculas altamente citotóxicas. El segundo objetivo de esta tesis doctoral abordó por tanto, la fabricación de nanodispositivos capaces de generar in situ las especies citotóxicas en lugar de transportarlas en su forma activa. Para evitar estos riesgos asociados a la liberación prematura de agentes antitumorales, es posible utilizar terapias mediante la administración de profármacos. Los profármacos son especies inocuas para el organismo las cuales son transformadas en agentes terapéuticos mediante enzimas o condiciones específicas. Por tanto, se diseñó un nanotransportador capaz de retener un profármaco en la matriz de sílice, liberándolo de forma sostenida y que incorporaba en su

superficie externa la enzima encargada de su activación. De esta forma, una vez internalizado el nanotransportador en la célula tumoral, la liberación sostenida del profármaco y su posterior activación por parte de la enzima generaría suficientes compuestos citotóxicos en el espacio confinado intracelular para causar la destrucción de la célula.

En esta tesis doctoral se ha empleado el profármaco ácido 3-indolacético (IAA) y la enzima exógena peroxidasa de rábano (HRP). Para evitar la degradación de la enzima, se recubrió la HRP con una cápsula polimérica permeable que permite su acción catalítica. Ésta cápsula protege la HRP frente a agentes agresivos externos, tales como agentes oxidantes, cambios bruscos de pH o proteasas, que podrían desnaturalizarla. El proceso de encapsulación se realizó mediante la introducción previa de grupos polimerizables en la HRP (grupos acroílo) y posterior polimerización radicalica empleando diferentes composiciones de monómeros de tipo acrilamida y metacrilato. La enzima encapsulada se caracterizó por medio de dispersión de luz dinámica (DLS), potencial ζ y espectroscopia de masas (MALDI-TOF). Por otra parte, las MSNs se obtuvieron con grupos amino en la superficie para una doble función; retener el ácido 3-indolacético en su interior mediante interacciones electrostáticas, y servir de grupos de anclaje de las cápsulas de HRP. La liberación de la carga de profármaco se siguió mediante cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC). Finalmente, la eficacia antitumoral del dispositivo completo MSN-HRPc fue evaluada frente a dos tipos de líneas celulares humanas, neuroblastoma (NB1691-luc) y leucemia (NALM6), demostrando la capacidad antitumoral del nanodispositivo.

Como tercer objetivo de esta tesis doctoral, se planteó la fabricación de cápsulas poliméricas mediante el uso de MSNs como plantilla para encapsular agentes antitumorales. Si bien la utilización de MSNs plantea ventajas como el control del proceso de liberación de fármacos o la elevada robustez química de la sílice, también presenta inconvenientes. Como consecuencia de su elevada rigidez, las MSNs experimentan una escasa penetración en los tejidos tumorales y una mayor tasa de eliminación por parte del sistema inmune. Sin embargo, los nanotransportadores de naturaleza “blanda” o “flexible” como liposomas, polímeros en forma de nanopartículas o cápsulas, dificultan la fagocitosis al modificar su forma durante el proceso de absorción. Para la fabricación de cápsulas poliméricas, uno de los métodos más usados implica la utilización de nanopartículas de sílice como plantilla. En este proceso, el núcleo de sílice se recubre de una capa polimérica, seguido de la eliminación de la sílice para dar lugar a las cápsulas flexibles.

Dentro de los polímeros utilizados para la formación de cápsulas, la polidopamina (PDA) presenta propiedades muy interesantes debido a su biocompatibilidad y facilidad de funcionalización. La PDA es capaz de depositarse en casi cualquier tipo de superficie, permite el anclaje de biomoléculas y presenta una alta biocompatibilidad. Para la preparación de cápsulas de PDA, se emplearon MSNs como plantilla para llevar a cabo el recubrimiento polimérico sobre su superficie. El proceso de eliminación de la sílice se realizó siguiendo una nueva ruta, simple, directa y limpia. La ausencia de compuestos químicos agresivos en el proceso de disolución de la sílice hizo posible la encapsulación simultánea de doxorubicina y nanopartículas Fe_3O_4 en el interior de las nanocápsulas y su aplicación como sistema de liberación controlada de fármacos. Esto supone una ventaja sobre otras rutas anteriores basadas en el uso de nanopartículas de sílice, las cuales requieren agentes agresivos como HF para la disolución de SiO_2 . La ruta desarrollada en este trabajo, implica el uso de MSNs como soporte para la polimerización de dopamina en superficie y posterior eliminación de la sílice

mediante la simple dispersión en agua. Se llevaron a cabo estudios de liberación por fluorescencia de doxorubicina a diferentes pHs, y viabilidad celular mediante citometría de flujo. La caracterización se llevó a cabo mediante técnicas como microscopía de fluorescencia y TEM en modo barrido (STEM) para la realización de líneas de escaneado y mapeo elemental por rayos X, entre las ya mencionadas anteriormente (porosimetría, DLS, FTIR, etc.).

Las conclusiones más relevantes extraídas del trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral se detallan a continuación:

1) En esta tesis doctoral se ha conseguido desarrollar diferentes nanotransportadores mediante aproximaciones como el uso de campos magnéticos alternos como disparador de la liberación, la generación *in situ* de las especies citotóxicas mediante profármacos, y la encapsulación de agentes terapéuticos en nanotransportadores de naturaleza blanda. Estos nanotransportadores son capaces de liberar o generar una carga citotóxica, demostrando su potencial aplicación administración controlada de fármacos.

2) Se demostró la capacidad de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ presentes en el interior de la matriz de sílice para elevar la temperatura local y provocar la transición hidrofílico/hidrofóbico del polímero termosensible a la temperatura escogida.

3) Los perfiles de liberación de la carga desde el interior de las MMSNs están controlados por la naturaleza y densidad de la cobertura polimérica formada. La fabricación de recubrimientos poliméricos termosensibles más densos (entrecruzados) permiten la liberación de la carga cuando se alcanzan temperaturas por encima de la LCST del polímero. Sin embargo, con recubrimientos de menor densidad (polímeros lineales) se obtiene el comportamiento contrario.

4) Se fabricó un nuevo nanodispositivo capaz de transportar un profármaco inocuo y la enzima responsable de su conversión en compuestos citotóxicos. Este nanotransportador es internalizado por las células tumorales y una vez allí, genera suficiente cantidad de especies citotóxicas para destruir las células cancerosas.

5) Se desarrolló una nueva aproximación sintética para la formación de cápsulas de PDA mediante el uso de MSNs como plantilla. La eliminación de la sílice puede llevarse a cabo mediante su dispersión en agua gracias a las especies formadas en el proceso de polimerización de la dopamina. La capacidad de alojar doxorubicina y nanopartículas de Fe_3O_4 en el interior de la carcasa polimérica de PDA fue comprobada, así como su capacidad de liberación del fármaco controlada por pH.

Summary: Mesoporous silica based nanocarriers for cancer treatment

This dissertation focuses on the design, synthesis and characterization of nanosystems for the cancer treatment based on the use of mesoporous silica nanoparticles (MSNs). Traditional chemotherapy has no selectivity toward tumor masses, therefore the administered anticancer drugs cause serious side effects in patients. In addition, the high toxicity of these drugs restricts the dosage and diminishes the effectiveness of the treatments. Application of nanomaterials in oncology can enhance the action of traditional chemotherapy agents in terms of bioavailability, specificity and security, thanks to their nanometer size. The aim of this thesis was to develop new drug delivery systems (DDS) that mitigate the adverse effects of systemic cytotoxic therapies. In order to accomplish this goal, it is necessary to release the antitumoral payload in a controlled manner. This is achieved through the accumulation of the nanocarriers in the tumor area. In this way, high concentrations of drugs are released only in the target tissue, which results in a lower toxicity to the patient and therefore a decrease in side effects of the therapy. The MSNs show excellent properties for transporting antitumor drugs due to their high surface area and pore volume, thus acting as a reservoir of cytotoxic compounds until the accumulation of the MSNs in the target tissue. In this thesis, different approaches to DDS have been studied: drug release assisted by alternating magnetic fields, the *in-situ* generation of cytotoxic agents and polidopamine nanocapsules formation; the latter using mesoporous silica nanoparticles as a template.

The magnetic sensitive DDS were obtained by the encapsulation of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ / Fe_3O_4 nanoparticles in mesoporous silica matrices, termed as magnetic mesoporous silica nanoparticles (MMSNs). To retain drugs inside the silica matrix, the MMSNs were coated with different thermosensitive copolymers, formed by combinations of monomers *N*-isopropylacrilamide and *N*-hydroxymethylacrilamide, *N,N*-methylenebisacrylamide and polyethylenimine (NIPAM/NHMA/MBA/PEI). These polymers undergo a lineal-to-globular transition between 37 ° C and 42 ° C. The conformational change of the polymer layer can control the release process of the housed species in the interior of the silica matrix, allowing or preventing its release. The alternating magnetic field was chosen as stimulus to release the cytotoxic payload since it is highly penetrating in tissues, not invasive and capable of inducing local warming by certain magnetic nanoparticles. The temperature increase induces a conformational change in the polymer coating, allowing the releasing of cytotoxic compounds hosted inside the nanocarriers.

As a first approach, polymer coating was designed with a dual purpose. On the one hand to act as thermosensitive diffusion barrier capable of retaining small molecule cargo inside the porous silica network, on the other to confer it the ability to retain proteins through electrostatic interactions and hydrogen bonding. With characterization techniques such as vibrating sample magnetometer (VSM), , transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) among others, it was determined that these nanocarriers contain a 47% wt of magnetic material, 60 nm size and a polymer surface coating. The nitrogen absorption porosimetry measurements show good textural parameters for these nanocarriers, which makes them suitable systems for drug delivery applications. This nanosystem was able to release two different species (small molecules and proteins) in

response to an alternating magnetic field. However, given the complex nature of polymeric coating, the accurate control of the polymer's transition temperature was not possible, compromising its potential application in medicine.

In order to obtain a precise transition temperature of the co-polymer coating, an array of linear copolymers with different proportions of NIPAM/NHMA was synthesized. It was concluded that the NIPAM/NHMA 90:10 ratio sets the transition temperature in the 42 - 43 ° C range. The transition temperature of polymer was measured by fluorescein release from within the porous matrix at different temperatures by fluorescence spectroscopy. In addition, the alternating magnetic field parameters were analyzed, using different frequencies and magnetic field amplitudes with a DM100 magnetic hyperthermia system (nanoScale Biomagnetics) in order to find optimal conditions for efficient heating. To demonstrate that this nanocarrier is capable of releasing its cargo without the need to increase the global temperature of the sample (the so-called hot spot effect), fluorescein release experiments were carried out by keeping the global temperature of the sample at 37 ° C during the alternating magnetic field application. The results confirmed that this nanodevice produces enough local temperature to produce the polymer transition and subsequent release of the cargo without the need to increase the global temperature of the medium. This means that the nanocarrier has the ability to overcome the rapid heat dissipation that occurs in living tissues through the bloodstream, thus demonstrating its applicability.

During the study of the polymer coating conditions for MMSNs, a relationship between the coating density and the cargo release profile was observed. The inclusion of crosslinking monomers in the polymer structure results in a release profile where the payload was released at temperatures above the transition temperature of the polymer shell. In contrast, a linear polymeric structure with lower density shows the opposite release profile, holding the load inside the pores when the device is above the transition temperature of the polymeric coating.

The use of polymeric coatings as a diffusion barrier does not ensure the total retention of the species housed in the interior of the porous matrix. Normally, a small percentage of the payload (between 10-20%) suffers a premature release before reaching the target tissue. This fact may cause systemic toxicity when highly cytotoxic agents are delivered to the cancer cells. Therefore, the second objective of this thesis was to build a nanodevice capable of generating cytotoxic agents *in-situ* rather than carrying them in its active form. To avoid these risks associated with the premature release of antitumoral drugs, it is possible to use prodrugs therapies. The prodrugs are harmless species for the body which are transformed in therapeutic agents using by means of specific enzymes or conditions. Therefore a novel nanocarrier was designed to retain a prodrug in the silica matrix and the enzyme responsible for its activation on the external surface. In this way, the nanocarrier is internalized in the tumor cell, where the sustained release of the prodrug and its rear activation by the enzyme, would generate enough cytotoxic compounds in the intracellular confined space causing the destruction of the tumor cell.

In this thesis the prodrug 3-indoleacetic acid (IAA) and the exogenous enzyme horseradish peroxidase (HRP) were employed for the *in situ* generation of cytotoxic agents. To avoid degradation of the enzyme, the HRP was coated with a permeable polymer capsule that allows its catalytic function. This capsule protects the HRP facing aggressive external agents, such as oxidizing agents, sharp changes of pH or proteases that could denature the enzyme. Prior to the encapsulation process, polymerizable groups (acryl groups) were introduced in

the HRP structure. The polymeric coating was carried out by radical polymerization using different compositions of acrylamide and acrylic monomers. Encapsulated enzyme was characterized by dynamic light scattering (DLS), ζ potential and MALDI-TOF mass spectroscopy. On the other hand, the MSNs were obtained with amino groups on the surface for a double purpose; to retain the 3-indoleacetic acid in its interior through electrostatic interactions, and to serve as anchoring groups for HRP capsules. The prodrug release from the silica matrix was followed by high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, the antitumor efficiency of the full device MSN-HRPc was evaluated against two types of human cell lines, neuroblastoma (NB1691-luc), leukemia (NALM6), demonstrating the anti-tumour efficacy of this nanocarrier.

The third objective outlined in this dissertation was the manufacture of polymeric capsules using MSNs as a template for anti-tumour agent encapsulation. Although the use of MSNs poses advantages such as the control of the release process of the drugs or the high chemical robustness of silica, it also has drawbacks. As a result of their high rigidity, the MSNs show a low penetration in tumoral tissues and a high rate of clearance by the immune system. However, "soft" or "flexible" nanocarriers such as liposomes or polymeric nanocarriers, hinder the cell phagocytosis by means of shape change during the absorption process. In the manufacture of polymeric capsules, one of the most used methods involves the use of silica nanoparticles as template. In this process, the silica core is coated with a polymer layer, followed by the elimination of the silica to obtain flexible capsules.

Amongst the polymers used for capsule formation, the polidopamine (PDA) shows very interesting properties. PDA presents a high biocompatibility and is able to settle in almost any type of surface, which allows the anchoring of biomolecules. In order to prepare PDA capsules, MSNs were used as a template to carry out the polymer coating on its surface. The process of silica elimination was carried out following a new, simple, direct and clean route. The absence of aggressive chemicals in the silica dissolution process allows the simultaneous encapsulation of doxorubicin and Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and its application as DDS. This is an advantage over other synthetic routes using silica nanoparticles, which require aggressive agents such as HF for the dissolution of SiO_2 . The route developed in this work, involves the use of MSNs as a support for the polymerization of dopamine on the nanoparticle surface and the subsequent removal of silica simply by its dispersion in water. Doxorubicin release studies were conducted by fluorescence at different pH. Cell viability was performed by flow cytometry. The characterization was carried out through fluorescence microscopy and TEM for the acquisition line scan profiles and elemental mapping, among other techniques mentioned previously (porosimetry, DLS, FTIR, etc.).

In summary, in this thesis different nanocarriers have been designed and tested for their application as DDS. The general conclusions stemming from this work are described below.

- 1) In this dissertation nanotransporters have been developed through different approaches such as the use of alternating magnetic field to promote the cargo release, *in situ* generation of cytotoxic agents mediated by prodrugs, and encapsulation of therapeutic agents in soft nature nanocapsules. These nanocarriers are capable of releasing or generate cytotoxic agents, demonstrating its potential application as a drug delivery systems.

2) The ability of the MMSNs to reach a high enough local temperature under an alternating magnetic field to cause polymer coating transition at the chosen temperature was demonstrated. This fact can be explained by the so-called *hot spot effect* where the presence of a heating source in the device accomplishes high temperatures at the nanoscale but no global heating is observed.

3) The release profiles of the cargo from within the MMSNs are controlled by the polymer coating nature and density formed. Dense thermosensitive polymer coatings (crosslinked) allow the release of the payload at temperatures above the LCST of the polymer. However, with lower density coatings (linear polymers) the opposite release behavior is observed.

4) A novel nanodevice able to transport a harmless prodrug and the enzyme responsible for converting it to cytotoxic compounds was developed. This nanocarrier is internalized by tumor cells, where the prodrug activation through the enzyme generates enough cytotoxic agents to destroy cancer cells.

5) The development of a new synthetic approach to the formation of PDA capsules using MSNs as a template was achieved. The silica template removal is performed simply by dispersion in water, due to the species formed in the dopamine polymerization process. The encapsulation of doxorubicin and Fe_3O_4 nanoparticles inside PDA nanocapsules was verified, as well as the pH controlled drug release.

Capítulo

I

Introducción General

El auténtico viaje no consiste en ver nuevos paisajes,
si no en tener una mirada nueva.

Marcel Proust

I. Introducción General

I.1. Nanotecnología y Nanomedicina

Desde sus inicios, la humanidad ha tratado de encontrar sustancias con las que conseguir aliviar y curar las enfermedades. Al principio esto era posible sólo por medio del consumo y tratamiento rudimentario de plantas medicinales y otras sustancias naturales. Si bien no se conocían las razones por las cuales estas plantas eran capaces de mitigar las dolencias, su uso estaba basado en la experiencia.

Los primeros años del siglo XIX marcaron un punto de inflexión en el conocimiento de campos como la química y la física, posibilitando el desarrollo de nuevas técnicas que permitían la separación, aislamiento y caracterización de ciertas sustancias activas de las plantas medicinales. En la primera mitad del siglo XX se realizaron trascendentales avances como la descripción de la estructura atómica mediante la mecánica cuántica, la difracción de rayos X, la explicación del movimiento browniano o el efecto fotoeléctrico entre muchos otros. Las aplicaciones derivadas de estas teorías fueron clave en el desarrollo de la nanotecnología. Técnicas y dispositivos que surgieron de teorías para describir el mundo atómico, como el microscopio de efecto túnel (*Scanning Tunneling Microscope*, STM), microscopio de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope*, AFM), la difracción de rayos X (DRX) o el microscopio electrónico de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), proporcionaron las “lentes” con las que vemos ese mundo y las “pinzas” con las que poder manejarlo. Gracias a ello, los descubrimientos de nuevos materiales (fulerenos¹, nanopartículas², grafeno³, etc.) se fueron sucediendo, así como las aplicaciones de los mismos en multitud de campos diferentes como óptica, medicina, construcción, cosmética o industria alimentaria.⁴

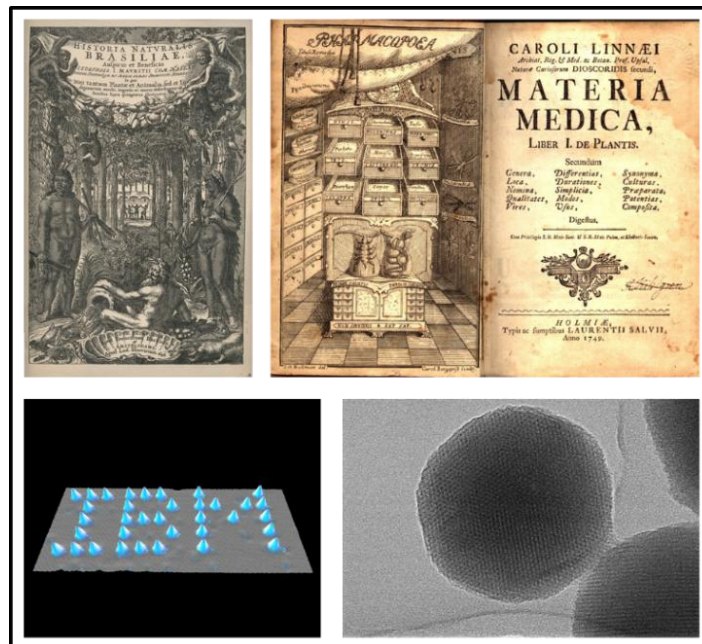


Figura I.1. Portada de un ejemplar de *Historia Naturalis* (Plinio el Viejo) y *Materia Medica* (Dioscórides) (arriba). Logo de IBM escrito con átomos de xenón mediante AFM y micrografía TEM de nanopartículas mesoporosas de sílice (abajo).

El impacto de la nanotecnología en la sociedad y la economía del siglo XXI es cada vez mayor y se cree que podría llegar a ser la próxima revolución industrial. El interés suscitado por esta tecnología se refleja en la financiación de proyectos por parte de gobiernos y empresas. La inversión mundial ha crecido sustancialmente desde los 1.200 millones de euros en el año 2000 hasta los 8.000 millones de euros en los que se estimó la inversión global hasta 2012 sólo en iniciativas gubernamentales. La contribución por iniciativa privada en programas de investigación y desarrollo (I+D) en nanotecnología hasta este mismo año fue entorno a 10.000 millones de euros. Otro de los factores que reflejan el interés que suscita este campo es el crecimiento del número de publicaciones en revistas científicas indexadas, de 18.000 a 80.000 entre los años 2000 a 2010, así como el número de patentes registradas que aumentó de 1.200 a 20.000 en el mismo periodo.⁵ Se estima que en 2015 la inversión en nanotecnología podría haber sido cercana a los 2.400 millones de euros según *Científica Public Limited Company*.

La nanomedicina, que se define como la aplicación de la nanotecnología a la medicina, se centra en el desarrollo de nuevas herramientas, aún más potentes, que permitan la detección, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer o el cáncer entre otras.^{6,7} En la década de 1960 se describió por primera vez el uso de la nanotecnología en medicina con la encapsulación de fármacos dentro de liposomas para la aplicación en administración controlada de fármacos.⁸ Desde el desarrollo de los primeros sistemas de ACF en 1976, se han descrito multitud de nuevos nanosistemas de diferente naturaleza para su aplicación en medicina.⁹ Entre ellos cabe destacar nanotransportadores inorgánicos como nanopartículas de sílice o metálicas;¹⁰⁻¹⁵ orgánicos como polimersomas, nanopartículas poliméricas o hidrogeles;¹⁶⁻¹⁸ y materiales híbridos,¹⁹⁻²² además de los liposomas ya mencionados. El catálogo de productos basados en nanotecnología aprobados por la *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) recoge 67 nanodispositivos para medicina y 33 nanoterapéuticos comercializados hasta 2014, donde 43 de ellos se pueden clasificar como nanofármacos. Un total de 25 dispositivos y 122 agentes terapéuticos se encuentran en desarrollo, a los que se atribuyen 789 estudios clínicos en marcha.²³

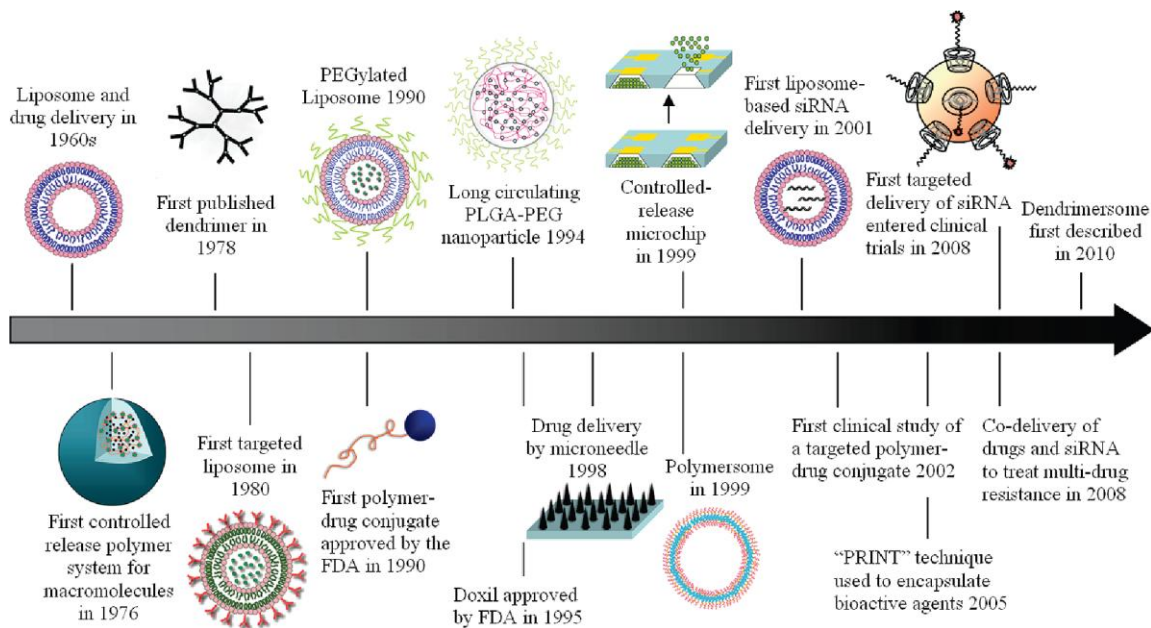


Figura I.2. Cronología de dispositivos basados en nanotecnología para administración controlada de fármacos. Reproducido con permiso de ⁹.

I.1.1. Nanotecnología

I.1.1.1. Fundamentos

La nanotecnología abarca la producción y aplicación de sistemas químicos, físicos y biológicos, y opera desde la escala atómica o molecular hasta dimensiones micrométricas, así como su integración en estructuras mayores.²⁴ Un nanómetro supone la mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), lo que está aproximadamente diez veces por encima de la longitud de un enlace simple C-C o en la misma escala que el grosor de una doble hélice de ADN (2.2 - 2.6 nm).²⁵ Comúnmente el término se delimita a dispositivos que tengan al menos una de sus dimensiones en una escala de entre 0.1-100 nm, aunque esta denominación cambia dependiendo de la aplicación y el autor. Según la primera agencia estatal americana de investigación en nanotecnología, la *US National Nanotechnology Initiative* (NNI): “la nanotecnología se interesa por los materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas significativamente mejoradas, así como los fenómenos y procesos debidos a su escala nanométrica”.²⁶ La reducción en las magnitudes se suele relacionar con las nuevas, diferentes y ventajosas propiedades que poseen estos nanomateriales respecto a los mismos materiales masivos. Así pues, si un material tridimensional tiene una sola dimensión en la nanoescala se puede denominar como *pozo cuántico*. Las estructuras con dos de sus dimensiones en la escala nanométrica se denominan como *cables cuánticos* y aquellas que poseen las tres dimensiones en la escala nanométrica se consideran como *puntos cuánticos*. El término *cuántico* se le concede a estos tres tipos de nanomateriales porque sus principales propiedades emanan directamente de la naturaleza mecano-cuántica de los procesos que tienen lugar en esta escala.

I.1.1.2. Obtención de nanomateriales

Las dos aproximaciones existentes en la producción de nanomateriales no distan de las tradicionales en la fabricación de dispositivos macroscópicos. Utilizando medios físicos o químicos para moldear y/o esculpir el dispositivo deseado partiendo de una pieza mayor haremos uso de la aproximación “de arriba abajo” (*top-down*, en inglés). Esta estrategia es poderosa pero muy exigente, debido a la necesidad de usar técnicas con precisiones nanométricas para la fabricación de los dispositivos en la nanoescala. Esta aproximación es la más empleada en la industria de semiconductores para la fabricación de transistores mediante nanolitografía. Generalizando, ésta técnica es capaz de hacer grabados mediante radiación UV o láser, o bien imprimir patrones de apenas unos nanómetros de anchura de diferentes materiales sobre una lámina fina de otro material mediante el uso de puntas de AFM (*Dip-Pen Nanolithography*, DPN). Una limitación en este tipo de técnicas es que el tamaño de los dispositivos que se pueden construir depende fundamentalmente de la longitud de onda que se aplica al material.²⁷

Por el contrario, partiendo de piezas que se ensamblan entre ellas para constituir un dispositivo mayor estaremos usando la aproximación “de abajo arriba” (*bottom-up*, en inglés). Este es el método usado por la naturaleza para ensamblar pequeñas unidades estructurales como nucleótidos, aminoácidos o lípidos entre muchos otros, con un control estructural sobresaliente construyendo así nanomateriales con formas, propiedades y funciones muy definidas. Para ello, la naturaleza se sirve de las fuerzas que rigen en la nanoescala como los

enlaces de hidrógeno, los apilamientos π - π , interacciones electrostáticas o hidrofílicas/hidrofóbicas ampliamente estudiadas por la química supramolecular. Por lo general se usa la aproximación *top down* para crear materiales nanoestructurados en dos dimensiones para más tarde construir en la tercera dimensión mediante la técnica *bottom up*. Esto puede ser especialmente útil en el diseño de dispositivos electrónicos, optoelectrónicos o en aplicaciones para la detección de sustancias.²⁷

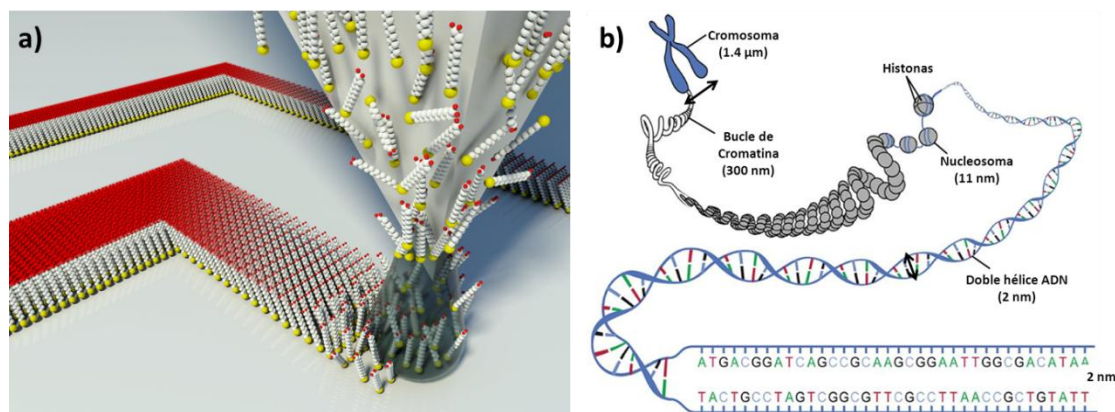


Figura 1.3. Representación de la técnica DPN donde las moléculas de alcanotiol son depositadas desde la punta de AFM a una superficie de oro a través del menisco de agua (a). Estructura y niveles de empaquetamiento del ADN (b).

I.1.2. Nanomedicina

I.1.2.1. Descripción e impacto

Nanomedicina se ha definido como la aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de sistemas biológicos,^{28,29} por tanto, entierra sus raíces en múltiples disciplinas como la química, la física, la biología o la medicina clínica. Se entiende como nanomedicina la aplicación de los fármacos tradicionales con una formulación basada en dispositivos de tamaño nanométrico, a los que también se suelen llamar nanotransportadores, nanoterapéuticos o nanofármacos. El interés suscitado por la aplicación de nanomateriales en medicina es debido a sus potenciales aplicaciones en imagen, dispositivos médicos, diagnóstico, terapia y la suma de estas dos últimas, la teranóstica.³⁰⁻³⁴ El campo de investigación dominante dentro de la nanomedicina es el de la ACF, el cual contribuye con un 76% de publicaciones científicas, seguido por el diagnóstico *in vitro* con un 11% de contribución según la compañía *BCC Research*.³⁵ En 2012 Europa lideraba con un 36 % el número de publicaciones, seguido de EEUU con el 32 % y Asia con el 18 %. En cuanto a aplicaciones patentadas en los diferentes campos de la nanomedicina, EEUU registra el 53 %, Europa el 25 % y Asia el 12 %.³⁶ El cáncer es una de las patologías más investigadas para su tratamiento con nanotecnología, llegando a suponer un 34% de publicaciones dentro de la investigación en ACF, según resultados extraídos de *Web of Science*[®]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha atribuido 8.2 millones de muertes al cáncer en 2012, lo que constituye el 13% de todas las muertes en ese año, y se espera que la incidencia del cáncer crezca hasta los 22 millones en las próximas dos décadas.³⁷

Actualmente, el número de productos de nanomedicina aprobados para su utilización o en diferentes etapas de estudios clínicos depende fuertemente de la clasificación a la que se

sometan.³⁸ La controversia en torno a esta clasificación sumada a las carencias que existen en el conocimiento respecto a la seguridad, los efectos a largo plazo de los nanomateriales y la ausencia de estándares y protocolos hace muy difícil la construcción de un marco regulatorio específico para éstos nuevos medicamentos, lo que retrasa la aceptación por parte de los entes públicos y por tanto su comercialización.³⁹ Estas dificultades son inherentes a un campo tan pluridisciplinar como es la nanomedicina. La estandarización de ensayos y la creación de protocolos específicos para nanomedicamentos son necesarios para la creación de una clasificación inequívoca de los mismos, que permita derribar ciertas trabas en su evaluación clínica y posterior comercialización.^{40,41} Por ejemplo, la FDA estadounidense colabora con el *Nanotechnology Characterization Laboratory* (NCL) para establecer una regulación efectiva en base a una caracterización exhaustiva de los productos basados en nanotecnología. La Unión Europea (UE) planea la creación de la *European Technology Platform on Nanomedicine* (ETPN) para este mismo fin dentro del proyecto *Horizon 2020*.⁴²

1.1.2.2. Fundamentos de la nanomedicina aplicada al cáncer

El cáncer es una enfermedad que afecta cada vez a un mayor número de pacientes en todo el mundo. Como ejemplo, las estimaciones de impacto del cáncer en EEUU para 2016 revelan que más de 1.6 millones de personas desarrollarían algún tipo de cáncer, donde el 35 % de ellas no logrará sobrevivir a la enfermedad.⁴³ La quimioterapia actual presenta varios problemas asociados a su toxicidad inespecífica, la cual se manifiesta en efectos secundarios indeseados como vómitos, inmunodeficiencia, anemia, pérdida de cabello o disfunciones en el proceso digestivo. Esta toxicidad supone un riesgo para la vida del paciente y limita la dosis que puede ser administrada.^{44,45} Otro de los problemas asociados a estos tratamientos es la posibilidad de que los tejidos tumorales desarrollen resistencia a los fármacos, como ocurre a menudo con tumores recurrentes.^{46,47}

Los desafíos en nanomedicina contra el cáncer se centran en el desarrollo de nanofármacos más eficaces para mejorar las terapias actuales. El potencial de la nanomedicina reside en la versatilidad de las funcionalidades que los nanotransportadores pueden incorporar. Esto permite diseñar transportadores capaces de aumentar la especificidad hacia tejidos tumorales y vencer los mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a los fármacos por parte del tumor.⁴⁸ Una localización efectiva de los nanotransportadores en tejidos tumorales supondría una menor toxicidad sistémica y por tanto una reducción de los efectos secundarios en los pacientes sin comprometer la efectividad terapéutica. El tamaño, la morfología, la composición y la superficie pueden ser moduladas para mejorar la circulación, la distribución, la especificidad y la absorción celular.⁴⁹⁻⁵¹ Por tanto, la nanomedicina supone una oportunidad de mejorar los tratamientos actuales, siendo su estudio y desarrollo cada vez mayor, como refleja el incremento de la inversión y número de publicaciones científicas en este área citados anteriormente.

Los nanotransportadores poseen propiedades únicas que les permiten trabajar en la misma escala que las moléculas constituyentes de los seres vivos. Su alta relación superficie/volumen dota a estos dispositivos una alta reactividad en superficie, por lo que es posible funcionalizarlos con distintas biomoléculas para aprovechar sus funciones en la localización específica de células y/o tejidos.⁵² Las propiedades físicas (resonancia plasmónica, superparamagnetismo, etc.) de algunos de estos sistemas los hacen muy interesantes para el diagnóstico de cáncer, utilizando técnicas como la microscopía de fluorescencia, la tomografía

por emisión de positrones o la resonancia magnética nuclear de imagen (MRI).⁵³ La encapsulación de fármacos dentro de estos sistemas evita problemas relacionados con la solubilidad y estabilidad de los fármacos *in vivo*, incrementando su estabilidad, extendiendo el tiempo de circulación de los citotóxicos y permitiendo una liberación controlada de los mismos.⁵⁴⁻⁵⁸ Por lo tanto los nanotransportadores son capaces de modular los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de los fármacos consiguiendo aumentar su eficacia terapéutica.^{37,59}

En 1986 Maeda y Matsumura revolucionaron el campo de la nanomedicina en oncología al descubrir que ciertas proteínas se acumulaban por sí mismas preferentemente en tejidos tumorales. Estos estudios realizados en ratas pusieron de manifiesto que la retención en los tumores es debido principalmente a su tamaño nanométrico.⁶⁰ Esta vectorización pasiva se dio a conocer como “efecto de permeabilidad y retención aumentada” (*EPR effect*). Este efecto de extravasación de macromoléculas o nanodispositivos a través de los vasos sanguíneos tumorales se produce debido a varios factores que caracterizan la singular vasculatura de los tumores sólidos.⁶¹ El rápido crecimiento de los tumores hace necesario un gran aporte de nutrientes, por lo que generan mayor cantidad de vasos sanguíneos que los tejidos sanos. La rapidez en el crecimiento provoca además que la vasculatura formada sea defectuosa, provocando la acumulación por parte de los nanosistemas en el tumor. Otro de los elementos que participa en el *EPR effect* es la secreción de factores específicos de permeabilidad vascular por parte de las células tumorales (como la óxido nítrico sintasa o inhibidores de la bradiquinina). Estos factores aumentan la permeabilidad del endotelio, creando mayores espacios intersticiales entre las células de los vasos sanguíneos del tumor que permiten la filtración de macromoléculas a las masas cancerosas.^{62,63} La arquitectura deficiente del aparato circulatorio de los tumores impide el drenaje por parte de los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que también favorece la acumulación de nanosistemas en el tumor frente a tejidos sanos.⁶⁴

La penetración de las nanopartículas hacia las fenestraciones de los vasos sanguíneos tumorales esta retardada por impedimentos estéricos, hidrodinámicos y electrostáticos. Dependiendo del tipo de tumor se pueden modular las características de los nanotransportadores (tamaño, carga superficial o hidrofobicidad) para favorecer la retención pasiva en estos tejidos.⁶⁵ Respecto al tamaño, los estudios de Matsumura y Maeda mostraron que un nanotransportador debe tener un peso molecular mayor a 40 kDa para acumularse de forma efectiva en un tumor sólido, aunque debe aunar otras características para valerse del *EPR effect*. Los nanotransportadores más pequeños se acumulan más rápido y uniformemente en los tumores, lo que los hace más efectivos contra los tejidos cancerosos que aquellos más grandes. Cabe destacar que las partículas menores de 11 nm son eliminadas a mayor velocidad por el drenaje renal y hepatobiliar que las partículas más grandes, las cuales son eliminadas de forma más eficiente por el sistema fagocítico mononuclear (MFS, antes llamado sistema retículo-endotelial) en multitud de tejidos.⁶⁶ Por lo tanto la elección de los nanotransportadores está condicionada por el tipo de tumor y debe poseer un balance entre una alta penetración tumoral, una baja toxicidad en tejidos sanos y su eliminación por el MFS. La morfología de los nanotransportadores también interviene en su vectorización pasiva. Está descrito que nanopartículas con forma de cilindros o de disco pueden acumularse más rápidamente y en mayor medida que las esferas del mismo tamaño. Este hecho puede ser debido a que la dimensión más pequeña de la nanopartícula confiere la capacidad de atravesar más fácilmente las fibras de los tejidos, lo que aumenta la penetración del dispositivo en el tumor.⁶⁷

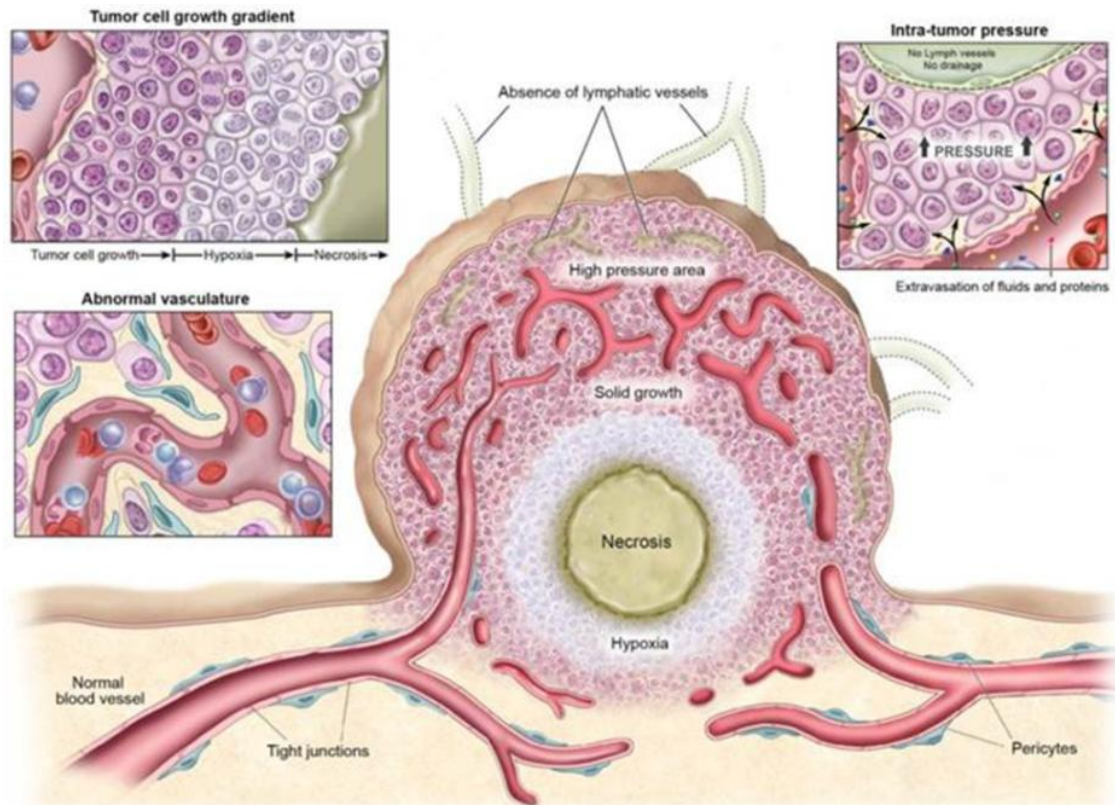


Figura I.4. Características fisiológicas de tumores sólidos que suponen barreras para la administración controlada de fármacos, especialmente aquellos de bajo peso molecular sin vectorización.⁶⁸

Otro de los parámetros clave que aumentan la retención en los tumores es la carga superficial de los transportadores. Por tanto, es necesario encontrar una carga superficial adecuada para aumentar la vida media del transportador en el torrente sanguíneo así como su interacción con las células tumorales.⁶⁹ Los transportadores con superficies catiónicas tienen mayor penetración en las células del endotelio que los dispositivos neutros o aniónicos, como resultado de la atracción electrostática entre la superficie catiónica del transportador y la carga negativa del glicocáliz epitelial. Sin embargo, la menor interacción electrostática del glicocáliz con los nanodispositivos con carga negativa o neutra facilita una distribución más efectiva en el tejido tumoral que aquellos con carga superficial positiva. Es por esto que la carga ideal para obtener la máxima acumulación de los nanotransportadores varía dependiendo del tipo de tumor y las vías de acceso al mismo. Así mismo existen estudios que apuntan a que un cierto carácter hidrofóbico en la superficie puede aumentar la constante de asociación celular de entre 10 a 100 veces más.⁷⁰

El *EPR effect* está bien documentado en cuanto a modelos tumorales en animales pequeños. Sin embargo, los estudios clínicos realizados no arrojan suficiente luz en este tema y por ello, algunos estudios afirman que la acumulación en pacientes humanos es muy heterogénea e ineficaz. Son muchas las barreras que un nanodispositivo debe superar para llegar desde su inyección hasta la zona de terapia deseada. La primera barrera se encuentra en el torrente sanguíneo, con la formación de una corona de proteínas en torno al nanotransportador (opsonización). Las opsoninas están encargadas de marcar a los patógenos para su eliminación por los fagocitos, por lo que al recubrir los nanodispositivos puede dar lugar a su eliminación por parte del MFS.^{71,72}

Otra de las barreras que encuentran los nanotransportadores es la extravasación del sistema sanguíneo al entorno tumoral a través de las fenestraciones presentes en las paredes del endotelio. El veloz crecimiento de las células tumorales (hiperplasia) reduce el espacio intercelular, lo que provoca un incremento en la densidad de la matriz extracelular formada por componentes entrecruzados como el colágeno, la fibrolectina y los glicosaminoglicanos. Ésta alta presión intersticial junto a la barrera endotelial de los tejidos tumorales reduce la perfusión y el flujo sanguíneo, lo que la limita permeabilidad y difusión intratumoral de fármacos y nanotransportadores.⁷³

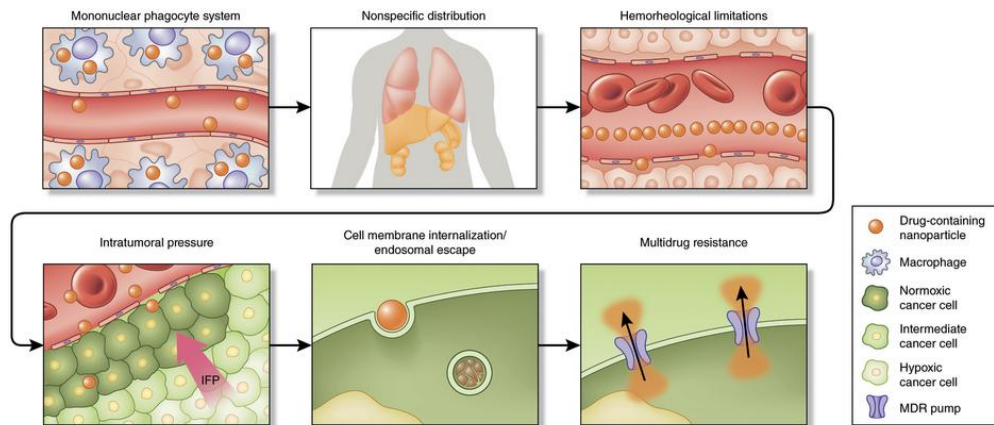


Figura I.5. Esquema general de las barreras biológicas que deben superar los nanotransportadores una vez en el torrente sanguíneo. Reproducido con permiso de ⁷¹.

A todo esto hay que sumar que sólo el 20 % de los vasos sanguíneos en tumores sólidos es capaz de llevar la sangre hasta el tejido debido a la alta presión en el interior del tumor, lo que dificulta alcanzar una distribución homogénea en el tumor hasta las zonas más internas donde no existe transporte por difusión. Una vez el dispositivo alcance la pared de las células tumorales se ha de producir la internalización celular. La diversidad fenotípica de las células cancerosas dentro del mismo tejido tumoral puede llevar a una internalización heterogénea y por ende a la reducción de la eficacia del nanodispositivo. Por último, los mecanismos de internalización encierran a los nanotransportadores en los endosomas para proceder a su degradación o la transcitosis, por lo que el dispositivo ha de escapar del endosoma y verter el contenido citotóxico en el lugar de acción dentro de la célula.⁴⁴

Para aumentar la retención de nanodispositivos en los tejidos tumorales existe otra aproximación llamada vectorización activa, la cual aprovecha el reconocimiento molecular entre receptores y ligandos o antígenos y anticuerpos.⁷⁴ La funcionalización de nanotransportadores con estas moléculas de guiado logra el reconocimiento de las mismas por parte de ciertos receptores celulares sobre-expresados en el endotelio tumoral o en la membrana de células tumorales y por tanto la acumulación preferente en este tipo de tejidos.^{75,76} Una vez acumulados en el tejido tumoral objetivo, los nanotransportadores pueden liberar su carga citotóxica de manera localizada eliminando la posible toxicidad de los agentes quimioterapéuticos en tejidos sanos y evitando así efectos secundarios graves.^{77,78}

La acumulación en el tumor mediante vectorización activa también depende del entorno del tejido canceroso. Los microambientes tumorales pueden ser desmoplásticos (ricos en matriz extracelular) o "celulares" (ricos en células tumorales) lo que condiciona las características de cada tumor.⁷⁹ Los nanofármacos vectorizados pueden unirse de manera específica o inespecífica

a los componentes de ambos tipos de tumor, acumulándose en la periferia del tejido canceroso y saturando los puntos de unión, retardando así su entrada al interior de los tumores. Esta *binding-site-barrier* varía en función del tumor, así como las características del tumor desde la periferia al interior. Entre los receptores de internalización más estudiados se encuentran: los receptores de transferrina, una proteína implicada en la homeostasis del hierro y la regulación del crecimiento celular;⁸⁰ los receptores de folato cuya isoforma α se sobreexpresa en el 40 % de los cánceres humanos;⁸¹ las glicoproteínas de membrana como las lectinas⁸² o receptores de factores de crecimiento epidérmico los cuales están íntimamente ligados a los procesos de crecimiento y progresión tumoral (angiogénesis, proliferación, invasión y metástasis).⁸³

El optimismo que despierta la terapia con nanosistemas aplicados al cáncer es debido tanto a la vectorización activa como al *EPR effect*. Los esfuerzos en investigación han hecho posible diseñar nuevas estrategias para superar las barreras que impone el cuerpo humano y aumentar la capacidad de acumulación mediante la vectorización. Estas aproximaciones se focalizan, por ejemplo, en el control de la opsonización mediante la modificación de la carga y e hidrofobicidad de la superficie del transportador,^{84,85} el desarrollo de vectores activos secuenciales⁸⁶, la acción de enzimas proteolíticas que degraden la matriz extracelular para aumentar la penetración en el tumor,⁸⁷ o la migración de células madre como vectores,⁸⁸ entre otros. También es posible elevar la extravasación a los tejidos tumorales mediante, por ejemplo, la inducción de hipertensión con angiotensina II o la aplicación de hipertermia para el aumentar el efecto de retención y permeabilidad antes mencionado.⁸⁹

1.1.2.3. Nanotransportadores para la administración de fármacos

Los sistemas de liberación controlada se empezaron a desarrollar en la década de 1960 cuando se descubrió que pequeñas moléculas lipofílicas podían difundir al exterior desde una pieza de gel de silicona.⁹⁰ De esta manera se comprobó que ciertos materiales podían controlar la liberación de agentes biológicos activos y fármacos durante días e incluso meses, lo que potenció la investigación en este tipo de sistemas culminando en dispositivos como Norplant, un anticonceptivo implantable que liberaba levonorgestrel durante 5 años.^{91,92} En las décadas posteriores los sistemas de liberación sostenida evolucionaron hacia el uso de diferentes tipos de materiales como hidrogeles⁹³, microesferas⁹⁴ o polímeros hidrofóbicos que ya permitían la liberación controlada de macromoléculas.⁹⁵ Después de la incorporación de los nanomateriales en medicina, el campo de investigación en administración de fármacos ha crecido de forma importante, lo que se refleja en las más de 8000 publicaciones en revistas científicas en el año 2015 recogidas en la *Web Of Science*[®] dentro del campo de la ciencia de materiales.

Las tecnologías desarrolladas para el control de la liberación de fármacos están basadas en matrices y reservorios que pueden modular la liberación de los principios activos en su interior.⁹⁶ Los procesos de desorción y difusión de las moléculas terapéuticas desde una matriz sólida a través de una red de poros tortuosa, la erosión o degradación por medio del disolvente o agentes biológicos, o el intercambio de fármacos con la matriz del dispositivo por hidratación, rigen la liberación de los principios activos incluidos en el sistema.⁹⁷⁻⁹⁹

Los nanotransportadores clasificados en función de su composición y propiedades da lugar a tres clases o tipos: orgánicos, inorgánicos e híbridos. Los mecanismos de liberación controlada de fármacos dependen de las características físicas y químicas de cada nanotransportador y su interacción con el medio. Por ejemplo, el comportamiento de los dispositivos poliméricos se basa en propiedades como: hidrofilia/hidrofobia, fuerzas

electrostáticas, energías de hidratación o enlaces químicos y/o grupos funcionales con funciones específicas.¹⁰⁰ Sin embargo, en transportadores inorgánicos, son sus propiedades intrínsecas como la resonancia plasmónica de superficie, la fluorescencia o sus características electroquímicas las que resultan interesantes en aplicaciones biomédicas.¹⁰¹ Los transportadores inorgánicos habitualmente requieren de funcionalidades orgánicas para dotarlos de características como mayor estabilidad en medios biológicos, capacidad de carga de fármacos o vectorización activa entre otros, lo que los convierte en materiales híbridos.^{102–104}

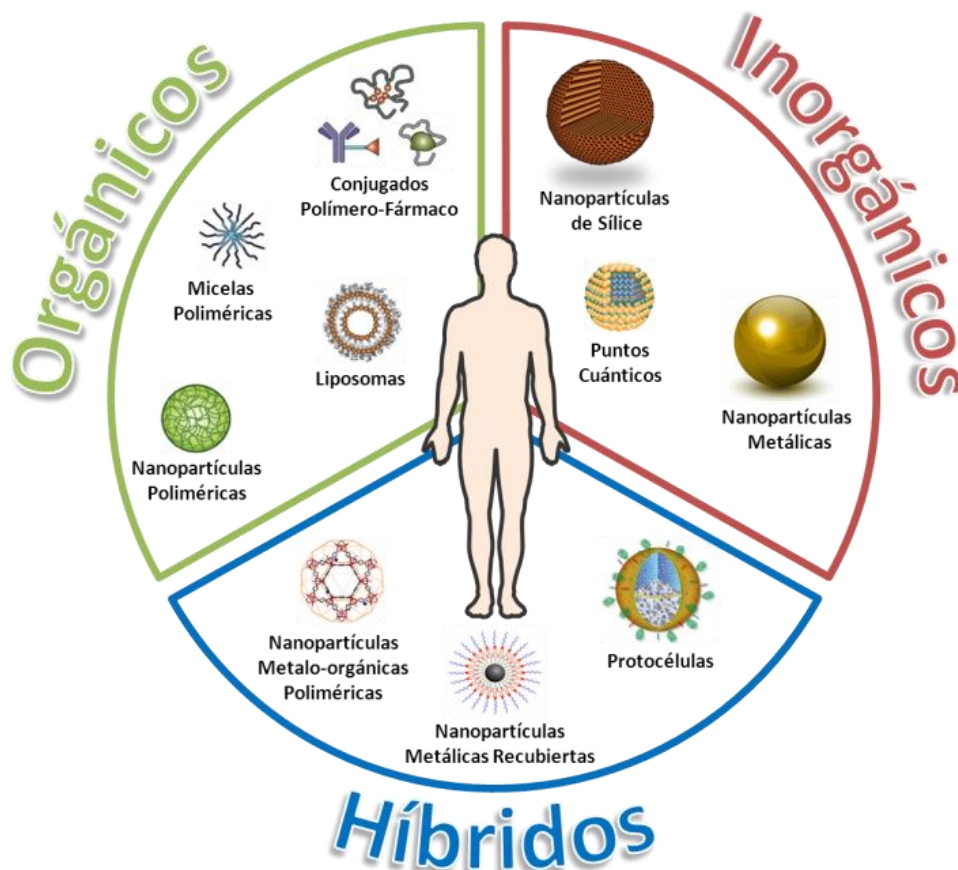


Figura I.6. Clasificación de nanotransportadores en función de su naturaleza.

Los nanotransportadores orgánicos comprenden un gran abanico de compuestos naturales o sintéticos diseñados para la ACF. El control de los procesos de auto-ensamblado y conjugación permite la fabricación de multitud de estructuras capaces de guiar, encapsular o retener agentes antitumorales. Varios de estos tipos de nanotransportadores ya han sido aprobados para uso clínico y forman parte de la primera generación de nanomedicamentos que se usan habitualmente en clínica como Doxil[®] o DaunoXome[®], los cuales están formulados con liposomas que encapsulan potentes antitumorales como doxorubicina o daunorubicina.¹⁰⁵ Otra aproximación es el uso de fármacos conjugados covalentemente a macromoléculas como polímeros, proteínas o anticuerpos para aumentar la selectividad hacia células tumorales objetivo. Algunos de ellos como Adcetris[®] o Kadcyra[®] ya han sido aprobados para su uso clínico en terapia antitumoral.¹⁰⁶ Otros nanotransportadores prometedores son aquellos basados en polímeros sintéticos, los cuales presentan una excelente versatilidad en composición química, tamaño, biodegradabilidad, morfología y facilidad de funcionalización de la superficie. El elevado control sobre el diseño de la estructura de estos polímeros permite la creación de multitud de

matrices poliméricas capaces de retener y encapsular fármacos, como micelas, nanopartículas o polimersomas. Actualmente algunas de estas formulaciones se encuentran en estudios en fase clínica I, como Nanoplatin® que es capaz de reducir los efectos secundarios de la administración sistémica de su compuesto activo, el cisplatino.¹⁰⁷

Los nanotransportadores de origen inorgánico presentan algunas ventajas frente a los orgánicos debido a su alta estabilidad mecánica, química y térmica bajo condiciones biológicas, a lo que se suma su biocompatibilidad.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Este tipo de transportadores están basados en su mayoría en nanopartículas metálicas, de sílice policondensada, y óxidos de metales cuyas propiedades se pueden modular en función de su tamaño y forma, por lo que resultan muy atractivas en biomedicina. Por ejemplo la formulación AuroLase¹¹¹, la cual se encuentra en estudios clínicos en fase I, utiliza la resonancia plasmónica de superficie de nanopartículas de oro para conseguir la ablación fototérmica de tejidos tumorales. Otra de las propiedades ampliamente estudiadas es el superparamagnetismo de las nanopartículas magnéticas, las cuales son capaces de generar calor en presencia de un campo magnético alterno. Esto posibilita la aplicación de hipertermia localizada una vez las nanopartículas magnéticas se encuentran acumuladas en una masa tumoral.¹¹²⁻¹¹⁶ Ésta tecnología ya está disponible con el nombre de NanoTherm®.¹¹⁷ Las nanopartículas magnéticas también tienen aplicaciones en liberación controlada de fármacos. Mediante el recubrimiento de estas nanopartículas con matrices capaces de retener fármacos, se obtienen dispositivos híbridos que pueden liberar agentes citotóxicos en el tejido tumoral al aplicar un campo magnético alterno. Una de las matrices más estudiadas para el transporte de fármacos son las nanopartículas de sílice mesoporosa, debido a su fácil funcionalización y su alta área superficial, que permite atrapar casi cualquier tipo de fármaco de tamaño adecuado.¹¹⁸⁻¹²⁰ Estos materiales mesoporosos de sílice se tratarán más en profundidad en el siguiente apartado dado que supone la parte central de esta tesis doctoral.

I.2. Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs)

Los materiales de sílice mesoporosa fueron descubiertos en 1992 por la compañía Mobil Corporation.¹²¹ Su obtención se lleva a cabo mediante síntesis hidrotermal en presencia de agentes directores de estructura (ADE) de carácter anfífilico, que forman una plantilla orgánica sobre la que un precursor de sílice (normalmente tetraetil ortosilicato TEOS o tetrametil ortosilicato TMOS) constituirá la fase inorgánica del material mediante reacciones de hidrólisis y policondensación. A continuación, el ADE es retirado por extracción o calcinación obteniendo así materiales porosos. Este tipo de materiales presentan distribuciones estrechas de tamaño de poro (entre 2 - 30 nm), una estructura porosa modulable, una elevada área superficial (hasta 1500 cm²/g) y volúmenes de poro altos (≈ 1 cm³/g).^{57,122} Además, su elevada densidad de grupos silanol (Si-OH) en superficie, permite modificar fácilmente sus propiedades.¹²³⁻¹²⁶ Estas características estructurales hacen a estos materiales muy útiles en aplicaciones como catálisis,¹²⁷⁻¹³⁰ separación,¹³¹⁻¹³³ o adsorción de metales pesados.¹³⁴⁻¹³⁶ En el campo de la nanomedicina suscitan mucho interés para su aplicación en la administración controlada de fármacos,¹³⁷⁻¹⁴² marcadores celulares,^{143,144} transfección génica,¹⁴⁵⁻¹⁴⁹ inmovilización de macromoléculas bioactivas,¹⁵⁰⁻¹⁵³ o regeneración de tejido óseo.¹⁵⁴⁻¹⁶¹

Entre los ejemplos más representativos se encuentran los denominados MCM-41, MCM-48 y MCM-50. Estos materiales presentan diámetros de poro de 2-10 nm, modulables mediante la adición de agentes de hinchamiento para obtener tamaños de poro mayores. La pared de poro está formada por una red de sílice amorfa, por lo que la diferencia fundamental entre los distintos MCMs se encuentra en el ordenamiento de su estructura porosa. De este modo, los materiales MCM-41, MCM-48 y MCM-50 presentan estructuras hexagonales (grupo espacial p6mm), cúbica bicontinua (grupo espacial Ia $\bar{3}$ d) y laminar (grupo espacial p2) respectivamente.¹⁶² El control morfológico de estos materiales ha sido ampliamente estudiado y permite obtener algunos de estos materiales en forma de nanopartículas, lo que ha llevado a las MSNs a ser uno de los materiales más estudiados en nanomedicina.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Desde un punto de vista químico, la composición y estructura de la matriz inorgánica de las MSNs dota de mayor estabilidad frente a disolventes orgánicos o enzimas que otros sistemas "blandos", como liposomas o nanopartículas poliméricas que son más susceptibles a la degradación.¹⁶⁷

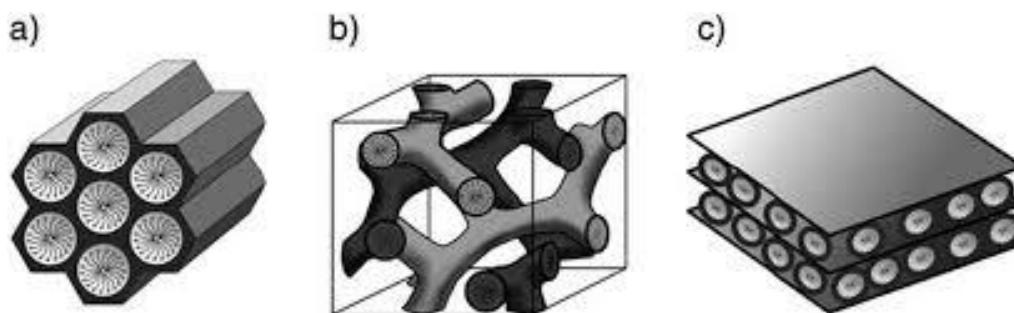


Fig. I.7. Estructuras de materiales mesoporosos de sílice de tipo MCM-41 (a), MCM-48 (b) y MCM-50 (c). Reproducido con permiso de ¹⁶⁸.

I.2.1. Síntesis de MSNs

El método de preparación comúnmente utilizado para la obtención de MSNs se basa en modificaciones sobre el método descrito por Stöber en 1968 para sintetizar nanopartículas sólidas de sílice monodispersas.¹⁶⁹ En este método, la hidrólisis de tetraalquilsilicatos en una mezcla H₂O/EtOH y amoníaco como catalizador, da lugar primero a la precipitación de núcleos de sílice (etapa de nucleación) y después al crecimiento gradual mediante la incorporación de más grupos hidrolizados SiO₄⁴⁻ (etapa de crecimiento) hasta el tamaño final de las nanopartículas. El control de la morfología y el tamaño de las nanopartículas vienen dados por la cantidad de precursor de sílice añadido en la síntesis, y las repulsiones electrostáticas entre nanopartículas, que hacen que estas adquieran forma esférica para minimizar su energía superficial.

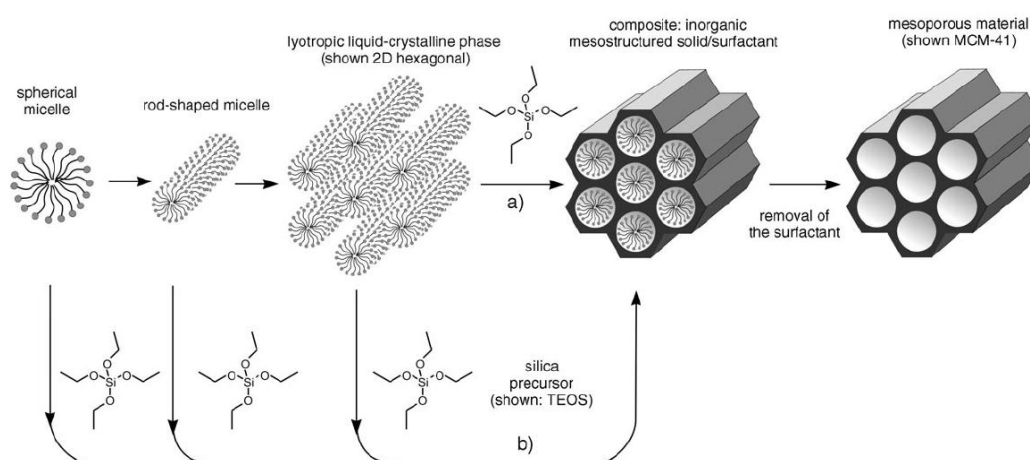


Figura I.8. Mecanismo propuesto para la formación de materiales mesoporosos de tipo MCM-41. Reproducido con permiso de ¹⁶⁸.

Las modificaciones del método de Stöber consisten en el uso de agentes directores de estructura (surfactantes o polímeros anfifílicos) para la formación de una mesofase (o cristal líquido) que actúa como plantilla, seguido de la policondensación del precursor de sílice sobre la región polar de los componentes autoensamblados que formará las paredes de sílice de estos materiales.¹⁷⁰ Los parámetros que controlan tanto la cinética de la reacción sol-gel como las interacciones sílice-surfactante y su autoensamblado, son la velocidad de condensación de la sílice, la concentración del surfactante, la temperatura y el pH del medio de reacción, lo que permite la obtención de morfologías esféricas y pseudo-esféricas (bastones, judías) y diferentes tamaños de partícula, estructuras y tamaños de poro. La inclusión de compuestos orgánicos con dos grupos trietoxisilano del tipo (R'O)₃Si-R-Si(OR')₃ permite la incorporación de funcionalidades orgánicas en el interior de las paredes formadas por una red de enlaces siloxano (Si-O-Si) sin comprometer la reactividad de los grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie.¹⁶⁸

Según la propuesta de Huo *et al.*^{171,172}, existen diferentes rutas sintéticas en función del pH del medio de síntesis y la carga del surfactante (catiónico o aniónico) determinando así las interacciones que pueden tener lugar entre la parte inorgánica (I) y la cabeza polar del surfactante (S). Las especies de sílice que existen por debajo de su punto isoeléctrico (PI = 2) tienen densidad de carga positiva (I⁺), por lo tanto tendrán interacciones electrostáticas

favorables con surfactantes aniónicos (S^-). Para la utilización de surfactantes catiónicos (S^+) en estas condiciones es necesaria la asistencia de un mediador con carga negativa (X^- , haluros normalmente). Éstas rutas de síntesis por debajo del PI de la sílice son denominadas S^-I^+ y $S^+X^-I^+$ respectivamente. Existen otras dos rutas sintéticas en condiciones más alcalinas. Por encima de $pH = 7$, las especies de sílice tienen carga negativa (I^-) e interaccionan electrostáticamente de manera directa con surfactantes catiónicos (S^+), mientras que la síntesis con surfactantes aniónicos (S^-) requiere de un mediador con carga positiva (X^+). Estas aproximaciones sintéticas se denominan rutas S^+I^- y $S^-X^+I^-$. Entre $pH = 2 - 7$ las especies de sílice son neutras (I^0), lo que da lugar a otros dos mecanismos de asociación denominados rutas S^0I^0 y $S^0(XI)^0$. En ambos casos las interacciones se producen por enlaces de hidrógeno, bien entre surfactantes neutros (S^0) y especies neutras de sílice (ruta S^0I^0), o bien con pares iónicos neutros de sílice con mediadores (XI)⁰ (ruta $S^0(XI)^0$). Por lo tanto, para la obtención de MSNs mediante hidrólisis básica los ADE más usados son los surfactantes catiónicos del tipo alquilamonio como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($C_{16}TAB$ por sus siglas en inglés).

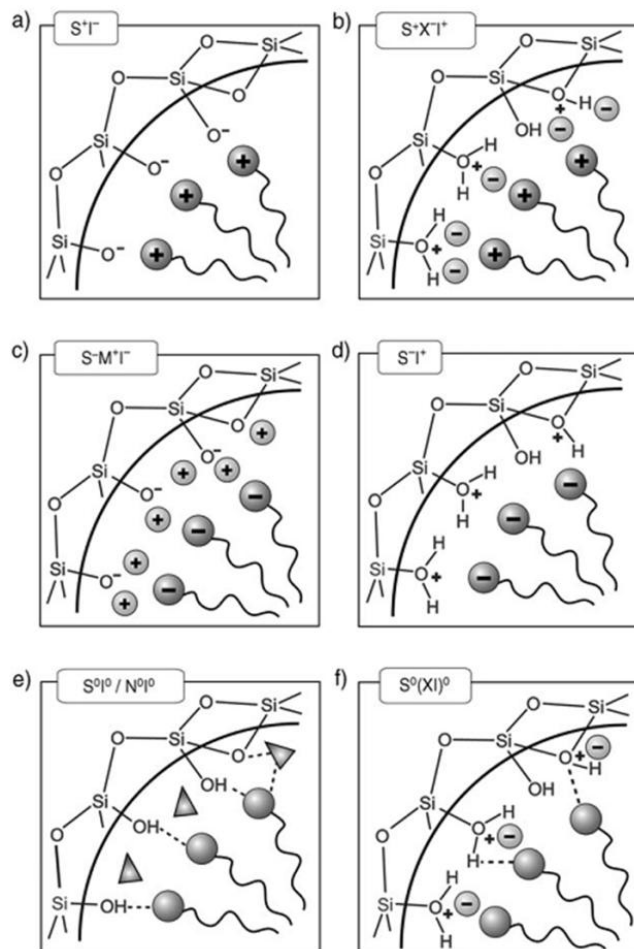


Figura 1.9. Interacciones entre las especies inorgánicas y los surfactantes de las posibles rutas sintéticas en medios ácido, básico y neutro. Reproducido con permiso de ¹⁶⁸.

El tamaño de poro de las MSNs es controlable variando la longitud de la cadena alquílica del surfactante pero el diámetro de poro obtenido por este método está limitado entre 1.8 nm y 2.5 nm. Por ello se han desarrollado métodos de expansión mediante el uso de agentes de hinchamiento como *N,N*-dimetilhexadecilamina y 1,3,5-trimetilbenceno o

co-polímeros tri-bloque no iónicos (Pluronic P65, P123 y F127). Como resultado, se obtienen partículas con estructuras porosas cúbicas 3D, hexagonales 2D, de tipo espuma o de agujero de gusano con un rango de tamaños de poro entre 5 y 30 nm, capaces de adsorber macromoléculas en su interior como proteínas, ADN o ARN.¹⁷³

Para alojar fármacos en el interior de la matriz de sílice es necesario eliminar el agente director de estructura sin afectar a la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Los métodos más usados para la eliminación del surfactante son la calcinación a alta temperatura y la extracción por intercambio iónico. El calcinado puede dar lugar a la agregación irreversible de las nanopartículas, dado que pueden formarse enlaces siloxano (Si-O-Si) entre ellas por deshidratación. También es posible usar un método de extracción del surfactante a altas temperaturas por “calcinación en fase líquida” con disolventes de alto punto de ebullición que mantiene las propiedades de las MSNs aunque experimentan un descenso en grupos silanol debido a la alta policondensación inducida por el tratamiento, lo que puede reducir su reactividad.¹⁷⁴ El método usado en esta tesis doctoral fue el de extracción del surfactante por intercambio iónico.¹²¹ En este tipo de extracción, el surfactante catiónico CTAB se intercambia por grupos amonio mediante una disolución de NH_4NO_3 en EtOH (95 %) a reflujo. Este proceso permite conservar los grupos funcionales orgánicos unidos a la superficie de las MMSNs intactos, además de conservar la estabilidad coloidal de las nanopartículas después del tratamiento.

1.2.2. Funcionalización de MSNs

La funcionalización de materiales consiste en la modificación química de la superficie. En MSNs se aprovecha la reactividad de los grupos Si-OH en superficie para llevar a cabo la condensación de compuestos orgánicos alcoxisililados, e incluso permite la diferenciación de funcionalidades dentro y fuera de los poros. Este decorado de la superficie puede no solo ayudar a mejorar la estabilidad coloidal sino también a obtener los grupos funcionales deseados en superficie para el anclaje de multitud de funciones específicas para su aplicación posterior en nanomedicina.¹⁷⁵ Las dos aproximaciones más usadas para la obtención de este tipo de materiales híbridos son: 1) la condensación en superficie de organosilanos (R-Si(OR)_3) una vez obtenidas las MSNs (post-síntesis) y 2) La condensación simultánea del precursor de sílice y el alcoxisilano funcionalizante (co-condensación).

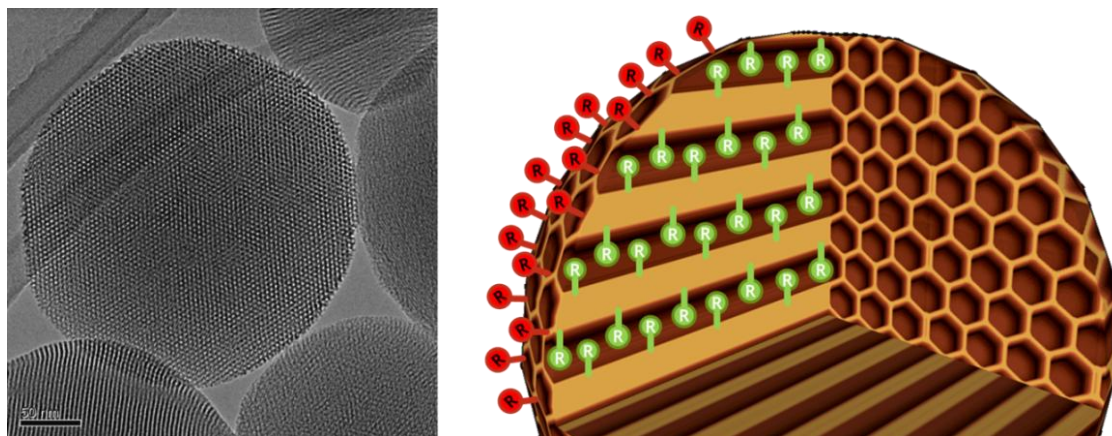


Figura I.10. Micrografía TEM (izquierda) y esquema de la estructura y funcionalización diferenciada (derecha) de nanopartículas de tipo MCM-41.

I.2.2.1. Funcionalización post-síntesis

Este proceso es llevado a cabo mediante la reacción de organosilanos de tipo trialcoxisilano ($R-Si(OR)_3$) o menos frecuentemente utilizando clorosilanos ($ClSiR_3$) o silanos $HN(SiR_3)_3$, con los grupos silanol ($Si-OH$) libres de la superficie de las MSNs ya formadas. La principal ventaja del método post-síntesis es que la funcionalización con grupos orgánicos no altera la mesoestructura ni la morfología de las nanopartículas y se pueden obtener multitud de grupos orgánicos en superficie simplemente variando el residuo (R) del organosilano. Si este método se aplica antes de la extracción del surfactante, este bloquea la entrada de los organosilanos en las paredes interiores de los poros y por lo tanto la funcionalización se produce tan solo en la superficie exterior de las nanopartículas. De esta manera, se crean dos superficies con reactividades diferentes en el material, una en las paredes interiores y otra en la superficie exterior, lo que les confiere mayor versatilidad.

Cabe destacar que la condensación por este método conlleva una reducción en la porosidad del material (dependiente del tamaño del agente de funcionalización) en comparación con la sílice sin funcionalizar. Si los organosilanos reaccionan preferentemente en la entrada de los poros al inicio del proceso, la difusión de otras moléculas hacia el interior podría ser impedida y provocar una distribución no homogénea de los grupos orgánicos e incluso la oclusión total de los canales. La funcionalización del interior de los poros es de gran utilidad en la liberación de fármacos dado que permite modular la liberación de la carga al aumentar o reducir la interacción de los fármacos con la superficie de la matriz.

I.2.2.2. Funcionalización por co-condensación

El método alternativo para la síntesis de MSNs con grupos orgánicos requiere la condensación simultánea de una mezcla del precursor de sílice tetralcoxisilano (TEOS o TMOS) con trialcoxiorganosilanos ($R-Si(OR)_3$) en presencia del surfactante y el catalizador (ácido o básico). De esta forma los residuos orgánicos quedarán anclados covalentemente a las paredes internas y externas del material. Gracias a que las funcionalidades orgánicas forman parte de la superficie de la matriz de sílice, la oclusión de los poros no puede tener lugar, además de obtener una distribución de los grupos funcionales más homogénea a lo largo de las paredes del material.

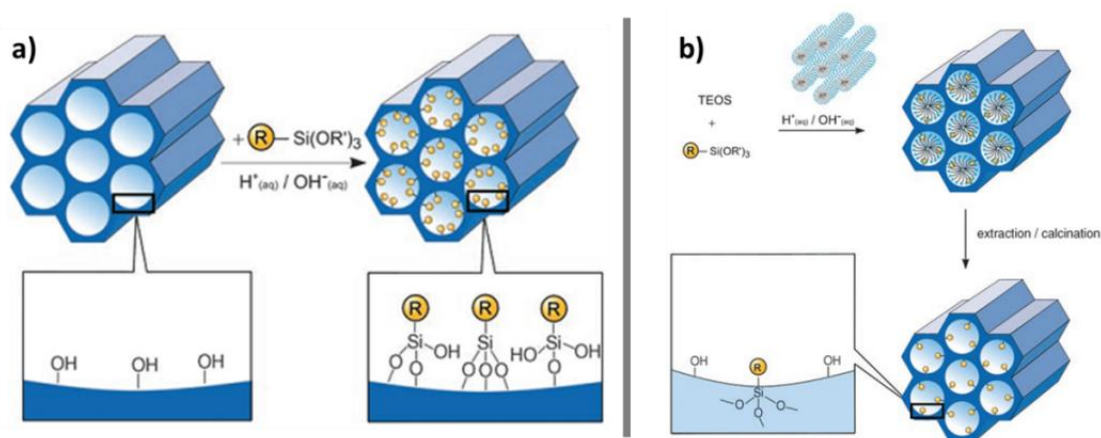


Figura I.11. Rutas de funcionalización de MSNs con organosilanos terminales tipo $R-Si(OR)_3$ (R = grupo orgánico funcional). Funcionalización post-síntesis (a) y funcionalización por co-condensación (b). Reproducido con permiso de ¹⁶⁸.

Una modificación de éste método consiste en añadir el agente funcionalizante una vez llevada a cabo la policondensación del TEOS (co-condensación retardada). Esto permite la decoración de la superficie de las nanopartículas manteniendo el interior de los poros con grupos silanol.

Una de las desventajas de esta ruta de síntesis es que el orden de la mesoestructura disminuye a medida que se incrementa la cantidad de agente funcionalizante, llegando a generar productos totalmente desordenados e incluso morfologías no deseadas. Por ello, la cantidad de R-Si(OR)₃ no suele exceder el 40 % mol. Debido a las diferentes velocidades de hidrólisis y condensación de precursores y organosilanos, es posible observar que la cantidad de estos últimos en la estructura porosa final es menor que la que correspondería a la concentración inicial. Esto se atribuye a que el aumento en la concentración del agente funcionalizante favorece las reacciones de homocondensación, no pudiendo asegurar la homogénea distribución de estos grupos en las paredes de la matriz. La extracción por intercambio iónico es la más adecuada para este tipo de síntesis ya que la calcinación llevaría a la eliminación tanto del agente director de estructura como de los grupos orgánicos anclados a las paredes de la matriz de sílice.

1.2.3. Estabilidad coloidal de las MSNs

Un aspecto crucial en el diseño de nanopartículas para su aplicación en medicina es el control de su estabilidad coloidal. Las MSNs deben mostrar una buena dispersión en disoluciones acuosas para conseguir la mínima agregación posible y reducir las uniones inespecíficas con biomoléculas o sustratos. Existen dos métodos para ajustar las propiedades de la superficie de las MSNs; la unión covalente con los grupos silanol de las nanopartículas, o bien la adsorción en la superficie de las MSNs de polímeros u otros agentes por interacciones electrostáticas o de Van der Waals.^{170,176} La adsorción de agentes estabilizantes en la superficie de las MSNs puede verse comprometida en medios biológicos, debido que los componentes presentes en este tipo de sueros podrían desplazar el recubrimiento si presentan una mayor afinidad por la superficie de las nanopartículas que el propio agente estabilizador. La unión covalente a la superficie con compuestos orgánicos alcoxisililados (R-Si(OR)₃) es el método más usado ya que su unión es más fuerte frente a la degradación, y reduce el número de silanoles en superficie y por tanto la agregación irreversible ya comentada en apartados anteriores.

Algunos de los grupos funcionales más usados para modificar la superficie y conferir estabilidad a las nanopartículas, son los grupos amina, carboxilato, fosfonato, e incluso la incorporación simultánea de estos grupos.¹⁷⁷ La estabilidad viene determinada mediante la repulsión electrostática entre las superficies de las nanopartículas, que puede prevenir o inducir la agregación. Un problema que presenta este tipo de funcionalizaciones es su dependencia del pH, el cual puede variar la carga electrostática superficial e inducir la agregación al disminuir la repulsión entre partículas. Algunos autores establecen valores de potencial límite entre los cuales la estabilidad de las partículas no está garantizada, comúnmente entre los 30 mV y -30 mV.¹⁷⁸

El uso de MSNs en aplicaciones biomédicas implica que las nanopartículas entren en contacto con medios serológicos.¹⁷⁹ El agente de funcionalización más estudiado para lograr estabilidad en este tipo de medios es el poli(etilenglicol) (PEG), ya que su carácter neutro, hidrofílico y flexible reduce la adhesión de las opsoninas presentes en el plasma sanguíneo,

haciéndolo “invisible” a los fagocitos.^{178,180} Wang y colaboradores describieron la modificación de la superficie de las MSNs con un derivado de PEG unido a un fosfolípido para aumentar la estabilidad de las partículas, observando un tamaño constante (200 nm) durante 24 h en PBS además de una reducida adsorción inespecífica de proteínas sobre las nanopartículas.¹⁸¹ Otro estudio llevado a cabo por Haynes y colaboradores muestra la estabilidad a corto y largo plazo de MSNs recubiertas con PEG (MSN-PEG) y sin recubrimiento, en función del método de extracción y lavado (diálisis o centrifugado), en diferentes medios y temperaturas.¹⁸² En este trabajo se muestra que las MSN-PEG sometidas a un tratamiento hidrotermal (50 °C durante 20 h) poseían una excelente estabilidad coloidal a tiempos largos en medios biológicos a temperatura fisiológica además de una captación reducida por parte de los macrófagos, lo que hace de ellas unas excelentes candidatas para aplicaciones biomédicas.

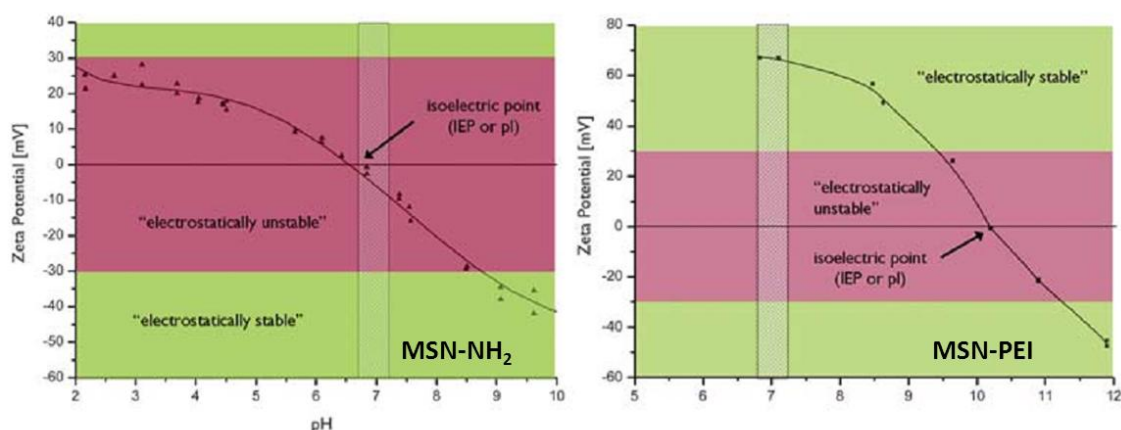


Figura I.12. Curvas de potencial ζ -pH de MSNs estabilizadas a pH fisiológico mediante interacciones electrostáticas con PEI (derecha), y MSNs funcionalizadas con grupos amina (izquierda) las cuales no son cinéticamente estables debido a su carga superficial a valores de pH fisiológico. Reproducido con permiso de¹⁷⁸.

El secado de las MSNs puede ser beneficioso en términos de transporte, pesado y almacenamiento siempre y cuando no conlleve la agregación irreversible (como ocurre en los procesos de calcinación), asegurando así la estabilidad coloidal de las nanopartículas tras su redispersión. Existen trabajos que aseguran la viabilidad del secado y posterior redispersión de las MSNs aunque conlleva un proceso de síntesis complicado, en especial cuando se trata de MSNs con múltiples funcionalidades o pasos de funcionalización.¹⁸³ Así pues, ajustando las propiedades de la superficie es posible lograr no solo la reducción de la agregación de las nanopartículas, si no también reducir las interacciones inespecíficas y conferir alta estabilidad en medios biológicos.

I.2.4. MSNs en administración controlada de fármacos

Los primeros estudios de liberación de fármacos desde materiales mesoporosos de tipo MCM-41 fueron llevados a cabo por el grupo de Vallet-Regí en el año 2001.¹⁰ En este trabajo se investigaron diferentes estrategias para la adsorción de ibuprofeno por impregnación en las paredes de sílice del material en función del tamaño de poro y su perfil de liberación. Los resultados indicaron que no hay dependencia del tamaño de poro en la

liberación y que la difusión de ibuprofeno al exterior es sostenida en el tiempo (hasta 70 h). La liberación sostenida de moléculas bioactivas desde este tipo de materiales permite mantener una dosis constante en el tiempo y reducir la frecuencia de las dosis, lo que implica una mayor seguridad en la administración respecto a los métodos tradicionales.^{184,185}

La superficie de los poros de los materiales de sílice mesoporosa es la responsable de la adsorción de fármacos, por lo que modificar esta superficie con grupos funcionales permite modular las interacciones fármaco-matriz para su aplicación en ACF.¹⁸⁶⁻¹⁹⁰ Debido a la naturaleza “dura” de las MSNs estas son resistentes a disolventes orgánicos y por lo tanto apropiadas para alojar moléculas hidrofóbicas en su interior. Esto es especialmente interesante ya que la mayoría de fármacos antitumorales tienen un marcado carácter hidrofóbico, lo que requiere el uso de disolventes orgánicos para la carga de MSNs.¹⁶⁷ Además la sílice puede ser funcionalizada para optimizar la interacción fármaco-nanotransportador frente a la interacción fármaco-disolvente, y utiliza así el medio orgánico con mayor capacidad de solubilizar el fármaco requerido. Respecto a la carga de fármacos hidrofílicos, la retención se puede llevar a cabo por interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno decorando las paredes del material con grupos funcionales que interactúen con dichos fármacos, lo que permite aumentar la cantidad de agente terapéutico retenido en su interior y modular la liberación de los mismos.^{12,191}

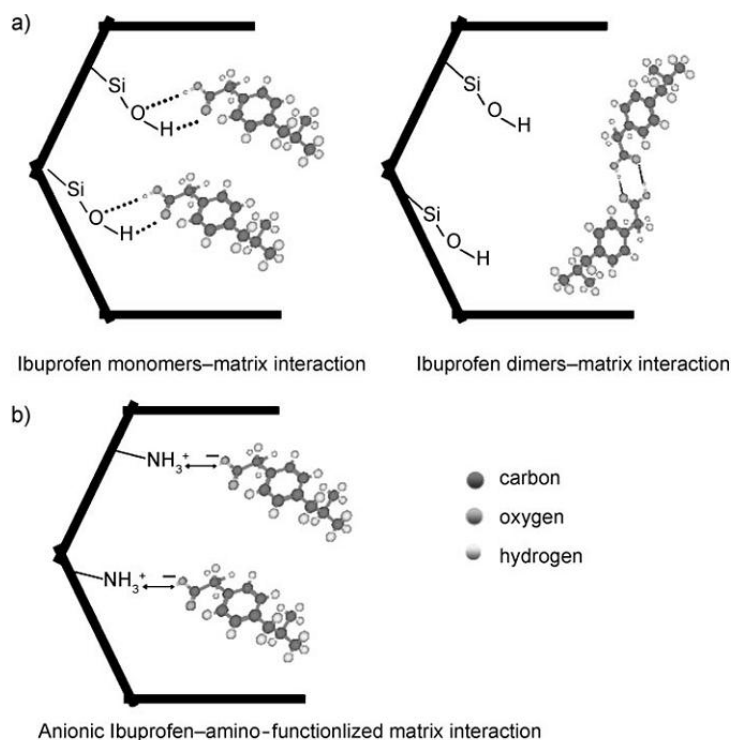


Figura I.13. Posibles interacciones ibuprofeno-MSNs. a) El ibuprofeno puede unirse a la superficie de las MSNs sin funcionalizar (rica en grupos silanol) mediante enlaces de hidrógeno debido a su grupo ácido carboxílico (derecha) o bien fisisorbido como dímero en la superficie (derecha). b) Las MSNs funcionalizadas con grupos amina pueden retener ibuprofeno mediante fuertes interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilato del ibuprofeno y los grupos aminorios de la superficie. Reproducido con permiso de ¹².

I.3. Nanotransportadores estímulo-respuesta

Uno de los retos más importantes en el desarrollo de MSNs es la liberación de agentes terapéuticos mediante el control por parte de determinados estímulos. La gran variedad de estímulos existentes y aplicables en medicina hacen posible elegir el más conveniente en función de las características de la patología que se desea tratar.¹⁹² Una de las grandes ventajas que presentan las MSNs en este tipo de sistemas es la estructura mesoporosa ordenada que presentan algunos de estos materiales. En concreto, la estructura del MCM-41 con canales individuales, no interconectados y organizados en formación hexagonal hace que existan solo dos aberturas en cada poro. Esto facilita la retención de fármacos puesto que al tapar ambas aberturas las moléculas adsorbidas no pueden escapar del interior de la matriz de sílice.¹⁹³ La estrategia más usada para la retención de los fármacos en el interior de las MSNs es el uso de compuertas o tapones moleculares mediante el anclaje de moléculas orgánicas en la apertura de los poros.¹⁹⁴ Estas compuertas moleculares pueden abrirse de forma irreversible mediante la aplicación de un estímulo, que rompa o degrade la propia estructura de la compuerta o su enganche con la matriz mesoporosa. También es posible crear sistemas “on/off” utilizando compuertas en las que el estímulo induce un cambio reversible (conformacional, de formación/ruptura de enlaces o acoplamiento/desacoplamiento) que active la liberación de la carga “a demanda” solamente bajo la aplicación del estímulo adecuado.

La clasificación de nanotransportadores estímulo-respuesta más establecida en la literatura se realiza en función del tipo de estímulo que facilite la liberación del contenido de los transportadores. Éstos pueden ser internos, cuando provienen del interior de la célula o su entorno (cambios de pH, procesos redox o enzimáticos, etc.) o externos, como por ejemplo campos magnéticos alternos, luz o ultrasonidos entre otros.^{20,195–201}

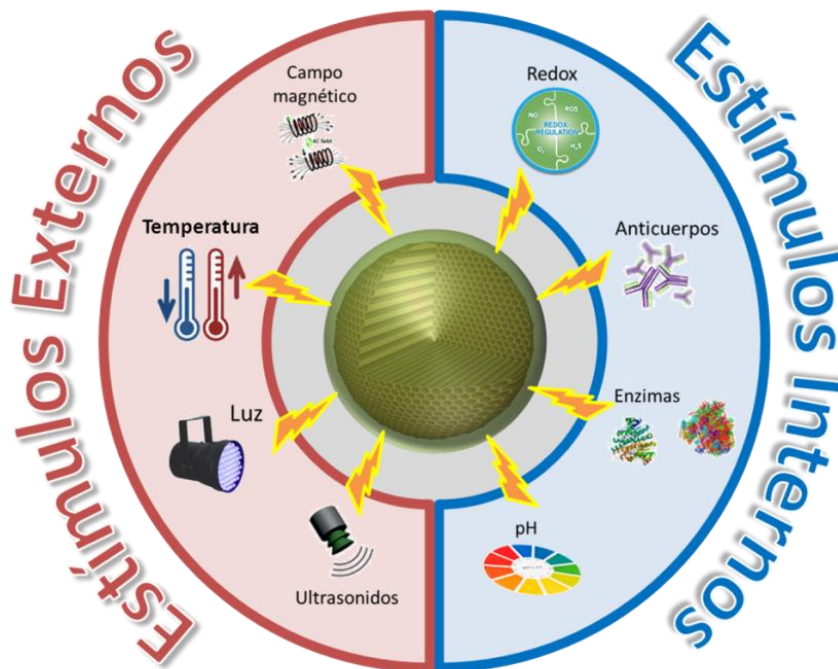


Figura I.14. Esquema de tipos de estímulos externos e internos capaces de inducir una respuesta que provoque la liberación de los fármacos alojados en el interior de las MSNs.

En los microambientes tumorales la cantidad de oxígeno disminuye a medida que se penetra en el tumor lo que resulta en hipoxia, aumentada además por la baja perfusión existente en el interior tumoral. Esto también genera altas concentraciones de CO₂ y ácido láctico, que producen una acidificación de la matriz extracelular. Como consecuencia de estas condiciones, la concentración y naturaleza de ciertas enzimas también varían en función de la localización en el tejido tumoral. Estos factores son los que los nanotransportadores sensibles a estímulos internos pueden explotar para disparar la liberación de su carga citotóxica en el tumor. Entre los estímulos internos más explorados en la fabricación de nanodispositivos estímulo-respuesta se encuentra el accionado mediante el pH ácido presente en las matrices extracelulares tumorales y ciertos orgánulos. Aprovechando estas condiciones, Stoddart y colaboradores fueron capaces de fijar a la superficie de las MSNs unas válvulas compuestas de rotaxanos y pseudo-rotaxanos. Estos complejos se disociaban por el cambio en su carga electrostática a ciertos valores de pH, permitiendo la apertura de los poros y la liberación de la carga.²⁰²

Otro de los estímulos internos más usados es el glutatión. Este tripéptido de carácter reductor se encuentra de manera natural en el cuerpo humano y es capaz de romper enlaces disulfuro (S-S). El interior de las células contiene mayores concentraciones de glutatión (GSH) que el entorno extracelular (de 2-20 μM en el torrente sanguíneo se incrementa hasta 0.5-10mM en el medio intracelular). Este hecho confiere un mayor ambiente reductor dentro de las células y la posibilidad de usarlo como disparador de la liberación.²⁰³ Esta diferencia de concentraciones fue aprovechada por Feng y colaboradores anclando cadenas poliméricas lineales a la superficie de MSNs y la posterior unión de esas cadenas entre sí mediante interconectores con grupos ditiol (HS-R-SH). El recubrimiento polimérico presente en la superficie de las partículas actúa como barrera de difusión impidiendo la salida del fármaco al exterior. La adición de ditioneitol (DTT) como equivalente de GSH rompe los enlaces disulfuro degradando la cobertura polimérica, dejando escapar la carga al exterior.²⁰⁴ La estrategia seguida por Luo *et ál.* fue el uso de cadenas colágeno bifuncionales que permiten la formación de grupos ditiol fragmentables en la superficie de las MSNs con moléculas de guiado en el extremo contrario.¹⁹⁹

Los nanotransportadores diseñados para liberar su carga mediante estímulos internos pueden sufrir cierta degradación antes de alcanzar el tejido objetivo. Esto supone un riesgo de toxicidad durante el trayecto hasta la zona tumoral. Sin embargo, los nanotransportadores sensibles a estímulos externos presentan una mejora en cuanto al control de su aplicación. Éstos pueden focalizarse en la zona tumoral y así evitar la activación prematura de la liberación allí donde no se aplica el estímulo. Los dispositivos controlados por estímulos externos no dependen de las condiciones intracelulares o de los tejidos circundantes (pH, enzimas, condiciones reductoras). Por ello la liberación prematura de la carga citotóxica está impedida hasta el momento en el que se aplique el estímulo correspondiente. Un inconveniente de este tipo de estímulos, es que deben ser capaces de traspasar o propagarse hasta el tejido tumoral objetivo. Por ello, su aplicación está condicionada por la localización de la zona corporal a tratar. En el caso de tumores localizados en los tejidos más profundos, la terapia con campos magnéticos alternos (CMA) es una opción muy adecuada debido a su alta penetrabilidad en los tejidos. Además, es posible realizar el tratamiento de tumores por hipertermia magnética, ya que la aplicación de un campo magnéticos alterno induce el calentamiento de nanopartículas magnéticas.^{112,205}

Existen multitud de procesos a escala molecular y nanométrica controlados por la temperatura: cambios conformacionales, ruptura o formación de enlaces, cinéticas de liberación y diferencias de solubilidad entre otras. Esto se suma al hecho que el incremento de la temperatura en los tumores induce una muerte celular mayor que en tejidos sanos. El tratamiento de tumores mediante el aumento de la temperatura del tumor (hipertermia o termoablación) mediante nanopartículas fue introducido por Jordan *et ál.* en 2003.¹¹⁴ Para ello se usaron suspensiones coloidales de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION), las cuales son capaces de disipar energía térmica en respuesta a un campo magnético alterno. Esta funcionalidad se puede incluir en el interior de las MSNs o en la superficie, actuando como fuente de calor y/o compuerta, como se desarrollará en mayor detalle en el siguiente apartado. Los primeros en demostrar una liberación controlada mediante CMA de moléculas modelo desde MSNs con fueron Thomas y colaboradores en 2010.²⁰⁶ En este trabajo, se incluyeron nanopartículas de óxido de hierro dopadas con zinc en el interior de MSNs. El confinamiento del fármaco se llevó a cabo mediante el recubrimiento de la superficie con unas nanoválvulas compuestas por un anillo macromolecular (cucurbit[6]uril) cuyo interior enhebra mediante fuerzas electrostáticas en un vástago molecular, que se encuentra anclado a la superficie de las MMSNs. Al aplicar un campo magnético alterno, las SPION generan calor suficiente para romper las interacciones entre el anillo y el vástago, lo que supone la liberación efectiva de la molécula modelo alojada en la matriz de sílice.

I.3.1. Sistemas de liberación de fármacos mediante estímulo magnético

Entre los nanotransportadores inteligentes empleados en la liberación controlada de fármacos, aquellos que responden a campos magnéticos alternos han sido ampliamente estudiados en biomedicina debido a características como su naturaleza no invasiva y alta penetrabilidad en tejidos.²⁰⁷ Existe además la posibilidad de aplicar estos dispositivos en tratamientos de hipertermia intracelular mediada por nanopartículas magnéticas, ya que son capaces de disipar energía térmica bajo la aplicación de un campo magnético alterno. El incremento de temperatura induce una mayor muerte celular en los tejidos tumorales que en los sanos.²⁰⁸ El calentamiento localizado puede aumentar la citotoxicidad de los fármacos alojados en el interior de los poros activando el sistema inmune para emitir señales de peligro, induciendo mayor mortalidad y necrosis celular.^{209–211} Esta sinergia entre la actividad del fármaco y el calentamiento eleva la muerte celular y puede localizarse en la zona tumoral mediante la vectorización (activa o pasiva) de este tipo de nanotransportadores, reduciendo así la toxicidad sistémica en el huésped.²¹²

La librería de materiales magnéticos susceptibles de emplearse en hipertermia magnética (HM) es enorme, de manera que deben tomarse en cuenta varios factores como su estabilidad coloidal o biocompatibilidad entre otros, para cumplir los requisitos seguridad para su uso en medicina.¹⁵⁴ En este sentido, las nanopartículas de óxido de hierro se han erigido como las candidatas más importantes en el campo ya que son fácilmente funcionalizables, presentan una buena biocompatibilidad y pueden ser totalmente metabolizadas en organismos vivos.^{108,213} En las últimas dos décadas la eficacia de las SPION en aplicaciones como agentes de contraste en resonancia de imagen y como transportadores de biomoléculas (fármacos, ácidos nucleicos o péptidos) a órganos específicos de manera controlada, ha sido ampliamente estudiada.^{11,214–216} Para estas nuevas aplicaciones se requiere la modulación de las propiedades físico-químicas de

la superficie de las SPION que permitirán superar las barreras biológicas innatas del organismo contra la administración de cuerpos exógenos. El tamaño y su uniformidad, la carga electrostática, las moléculas de recubrimiento y la adsorción de proteínas en el plasma son los criterios más importantes a tener en cuenta en el diseño de estos nanodispositivos para controlar de manera efectiva la biodistribución y la farmacocinética de los mismos en un organismo vivo.²¹⁷

Las propiedades de las nanopartículas magnéticas dependen de la estructura cristalina del material y de los átomos que la componen. A medida que se reduce el tamaño de grano de un material magnético macroscópico los efectos de superficie son más significativos, puesto que la relación entre el número de átomos en superficie y el núcleo se incrementa. Es por ello que las propiedades como la anisotropía magnética, momento magnético por átomo, la temperatura de Curie, y el campo coercitivo pueden ser diferentes de las del material masivo.²¹⁸ Los tamaños habituales de nanopartículas magnéticas para aplicaciones médicas se sitúan entre los 10 nm y los 50 nm, donde normalmente tienen un único dominio magnético para minimizar su energía magnética, lo que supone un comportamiento superparamagnético por encima de cierta temperatura (temperatura de bloqueo, T_B).

En el estado superparamagnético, los momentos magnéticos de cada nanopartícula cambian continuamente de orientación por encima de la T_B . Al aplicar un campo magnético las SPION responden rápidamente sin mostrar remanencia (magnetización residual) ni coercitividad (el campo magnético necesario para llevar la magnetización a cero). La ausencia de remanencia y coercitividad se comprueba mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM) donde la histéresis de la curva de magnetización es casi nula. Variando el campo magnético aplicado a la muestra se obtienen curvas de magnetización, características de cada tipo de material magnético (figura I.15.a) Así pues, el superparamagnetismo de las SPION es muy útil en aplicaciones biomédicas puesto que al no retener el magnetismo (al contrario que los imanes permanentes) al término de la aplicación del campo magnético, apenas existe tendencia a la agregación de las nanopartículas por interacciones entre ellas.

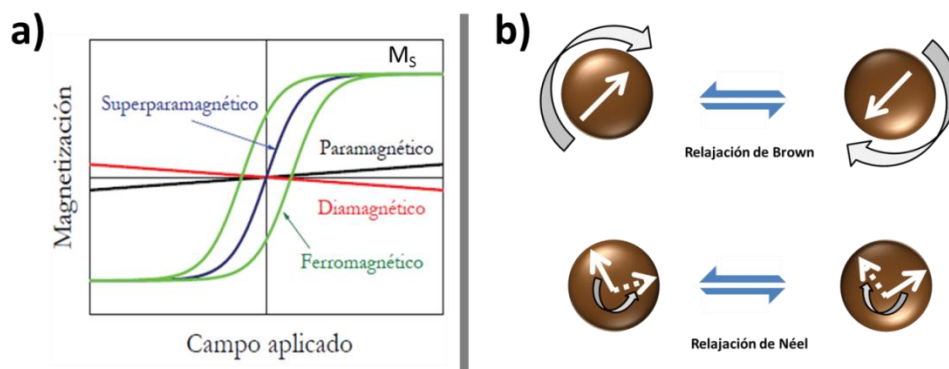


Figura I.15. (a) Curvas de magnetización en función del campo aplicado para diferentes tipos de materiales. La respuesta magnética de un material superparamagnético se caracteriza por la ausencia de histéresis y sus altos valores de magnetización de saturación (M_s). (b) Esquema de los mecanismos de Néel y Brown responsables del calentamiento inducido mediante la aplicación de un CMA.

La disipación de energía térmica se consigue sometiendo a las SPION a un campo magnético alterno, donde el proceso de inversión de la dirección de la magnetización causa las pérdidas en forma de calor.²¹⁹ Se consideran dos mecanismos que pueden contribuir en

diferente medida al calentamiento, estos son los mecanismos de relajación de Néel y Brown. La disipación de calor de las SPION está causado por el retraso en la relajación de los momentos magnéticos, bien a través de su rotación dentro de las nanopartículas (relajación de Néel), bien de la rotación de la nanopartícula sobre sí misma (Brown) cuando se exponen a un campo magnético alterno con una velocidad de inversión (frecuencia) mayor que la relajación magnética de las partículas.²²⁰ El mecanismo de relajación de Néel está presente aun cuando las partículas no pueden rotar físicamente, sin embargo el de Brown implica la rotación física de las nanopartículas, con lo que sólo contribuye al calentamiento cuando éstas son libres de rotar, es decir, cuando se encuentran en un medio líquido (figura I.15.b). La velocidad de inversión de los momentos magnéticos en estos mecanismos depende de las características de las nanopartículas (tamaño y distribución de tamaños) y del campo aplicado (frecuencia y amplitud), así como de la viscosidad del medio en el que se encuentren.

La capacidad de generar calor de las nanopartículas magnéticas en combinación con matrices de sílice mesoporosa, convierte a estos materiales en candidatos excelentes para el desarrollo de nanotransportadores estímulo-respuesta para ACF. Existen diferentes aproximaciones para incluir las SPION como termosemillas en este tipo de dispositivos. Los métodos más usados son la impregnación de los precursores magnéticos, la encapsulación asistida por aerosoles, microemulsiones o mediante la previa transferencia de fase de medio orgánico a disolución acuosa antes de su recubrimiento con sílice mesoporosa.²²¹⁻²²⁵ Una de ellas es la incorporación al nanotransportador de las SPION como compuertas moleculares mediante el anclaje de una funcionalidad termosensible entre estas y la superficie de las MSNs. Para ello Ruiz-Hernández *et ál.* desarrollaron un nanodispositivo sensible a CMA mediante el uso de SPION como compuertas a través de la hibridación/deshibridación de cadenas complementarias de ADN,²²⁶ lo que además permite funcionar al sistema como un dispositivo pulsátil, pudiendo “encender y apagar” la liberación de un fármaco modelo. Otra posibilidad explorada es el uso enlaces termolábiles en la unión entre la matriz que retiene la carga farmacológica y un tapón molecular. De esta manera, al aplicar el CMA el calentamiento inducido da lugar a la ruptura del enlace sensible temperatura y por lo tanto a la liberación de la carga del dispositivo.^{227,228}

En esta tesis doctoral se ha estudiado el recubrimiento de la superficie de las MMSNs con co-polímeros termosensibles, que actúan como compuerta para liberar la carga dependiendo de la temperatura del medio (artículos 1, 2 y 3). Este tipo de sistemas se basan en la capacidad de la cobertura polimérica para cambiar de una fase hidrofílica (expandida) a una fase hidrofóbica (contraída) de forma reversible cuando la temperatura del medio está por encima de su temperatura de transición (temperatura crítica mínima de disolución, o LCTS por sus siglas en inglés). Se escogieron co-polímeros basados en NIPAM debido a que su temperatura de transición hidrofílico/hidrofóbico (32 °C) es cercana a la temperatura corporal (37 °C).²²⁹ Además, la introducción de monómeros hidrofílicos en la estructura del polímero induce un aumento de la temperatura de transición, debido a que existen un mayor número de interacciones con las moléculas de agua. Los recubrimientos poliméricos de MSNs proveen además de mayor estabilidad coloidal, posibilidad de anclaje de moléculas de vectorización y mayores tiempos de circulación en el torrente sanguíneo, las cuales son características importantes para posibles aplicaciones en ACF *in vivo*.^{32,230,231} Como se describirá más adelante, la liberación de las moléculas atrapadas en el interior dependerá de la conformación y la densidad del recubrimiento polimérico, características que pueden ser moduladas mediante el uso de monómeros hidrofílicos y monómeros de entrecruzamiento, respectivamente.

I.4. Generación in situ de agentes citotóxicos

La quimioterapia tradicional es efectiva en el tratamiento de tumores sólidos, pero tiene riesgos asociados debido a su poca especificidad y alta toxicidad. Además, los tratamientos se prolongan durante largos periodos, por lo que son muy nocivos para el paciente. De igual manera, en un tratamiento con nanopartículas la retención de los fármacos en el interior de los nanodispositivos es de vital importancia. En los dispositivos estímulo-respuesta la retención de fármacos en su interior puede verse comprometida por la eficacia de las compuertas moleculares que actúan de barrera de difusión en la superficie de las MSNs. Para evitar que una liberación prematura cause una toxicidad sistémica no deseada se pueden usar profármacos que resulten inocuos durante el transporte hasta la masa tumoral, en lugar de transportar especies citotóxicas activas.

Una definición amplia clasifica a los profármacos como sustancias farmacológicas inactivas hasta que son metabolizadas *in vivo*, dando lugar a metabolitos con actividad terapéutica. La aproximación más general es la de modificar químicamente los fármacos activos haciéndolos biológicamente inertes, hasta que su transformación libere el agente terapéutico activo.²³² Estos profármacos se pueden diseñar mediante la unión covalente lábil de la forma activa a un agente de vectorización que transporte el profármaco hacia antígenos específicos, transportadores de péptidos o enzimas que estén sobreexpresados en tejidos o células cancerosas. Una vez allí, el grupo funcional lábil se degrada mediante la acción del agente disparador, como cambios de pH o enzimas, liberando la forma activa del fármaco e induciendo la muerte de las células tumorales.²³³

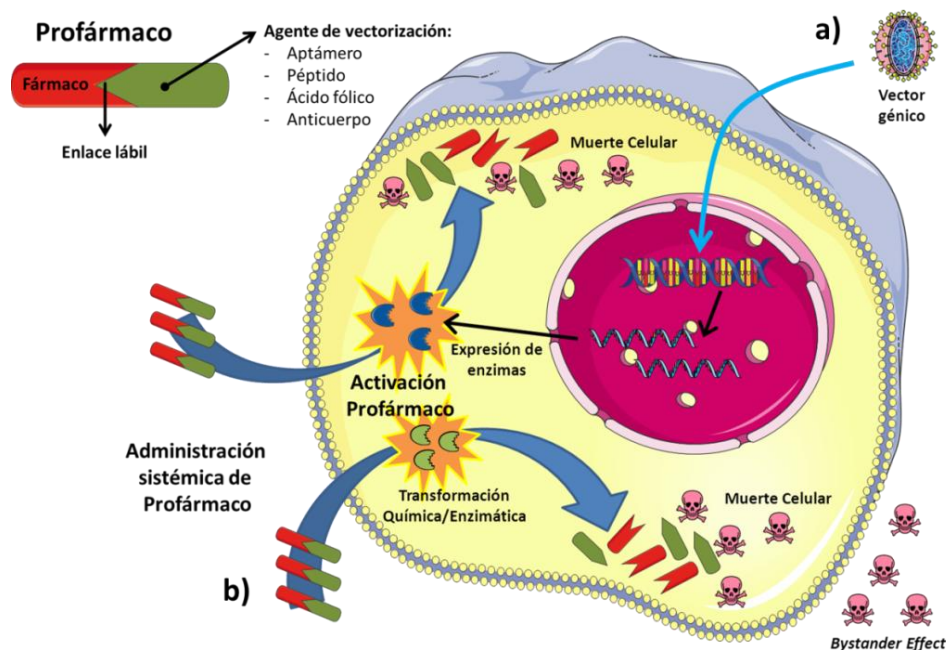


Figura I.16. Terapias basadas en el uso de profármacos. a) El vector genético inserta su ADN en las células tumorales para que estas expresen enzimas específicas que rompan el enlace lábil que libera el fármaco al medio celular (GDEPT). b) El agente de vectorización hace que el profármaco se acumule preferentemente en las células tumorales, donde el profármaco se ve transformado en su forma activa por degradación de su enlace lábil, bien por reacciones químicas (pH, glutatión) o bien por enzimas sobreexpresadas por las células tumorales.

Entre las estrategias más estudiadas en el diseño de profármacos se encuentra la citada activación mediante enzimas específicas presentes en ambientes tumorales. Sin embargo existen ciertas restricciones a este tipo de terapias, como las bajas concentraciones de estas enzimas en las células cancerosas. Además, muchos de ellos carecen de enzimas endógenas que los activen, y tan solo unas pocas de ellas han probado ser eficaces en la activación de profármacos. Otro de los problemas en este campo es la limitada la cantidad de tumores humanos que sobreexpresan estas enzimas específicas.²³⁴ Para solventar estas limitaciones se han desarrollado dos aproximaciones diferentes. La primera se basa en la administración de la enzima catalítica conjugada a un anticuerpo específico para el tumor a tratar. Una vez el conjugado se encuentra acumulado en el tumor, se administra el profármaco que resulta inerte hasta su activación por parte de la enzima (terapia enzima-profármaco dirigida por anticuerpos, ADEPT).²³⁵ La segunda consiste en la administración de un gen que induzca la producción de la enzima activadora en el tumor, seguido de la administración del profármaco de forma sistémica (terapia enzima-profármaco dirigido por genes, GDEPT).²³⁶ Ambas terapias han demostrado ser eficaces para la activación de profármacos en las células tumorales, pero presentan algunos inconvenientes como la degradación de los componentes *in vivo* mediante enzimas proteolíticas, la inhibición de la vectorización hacia el tumor por la presencia de antígenos en sangre o la activación de una respuesta inmunológica en el caso de emplear ciertos virus como vectores para la transfección génica.²³⁷

Para subsanar estos problemas, en esta tesis doctoral se desarrolló un nanotransportador capaz de generar especies citotóxicas una vez acumulado en el espacio confinado de células tumorales (artículo 4). El dispositivo se basó en MSNs, las cuales se encuentran funcionalizadas para retener en su interior el profármaco ácido indol-3-acético (IAA). Estos grupos funcionales se utilizaron además para llevar a cabo el anclaje de la enzima de origen vegetal HRP (responsable de la activación del IAA) en su superficie. La transformación del profármaco da lugar a especies de oxígeno reactivas (ROS) que son capaces de producir la muerte de células tumorales dañando la membrana y el ADN. La enzima HRP no es inmunogénica ni tóxica y no se encuentra presente en el cuerpo humano, por lo que el IAA sólo puede ser transformado en la zona tumoral donde se acumule el nanotransportador.

El anclaje directo de enzimas en superficie normalmente produce una reducción significativa en su actividad, debido al bloqueo del sitio activo o cambios conformacionales en la enzima durante el proceso de unión.²³⁸ En general, las proteínas suelen presentar baja estabilidad en medios biológicos debido a la presencia de proteasas u otros agentes agresivos.²³⁹ Para superar estas limitaciones, la protección de la HRP se llevó a cabo mediante su inclusión puntual en una cápsula polimérica. Este recubrimiento impide la acción de las proteasas sobre las enzimas encapsuladas, permitiendo además el anclaje a la superficie de las MSNs y a la vez preservar su actividad catalítica por más tiempo. La estrategia de síntesis y la caracterización se encuentran recogidas y ampliadas en el capítulo de resultados y discusión (sección II.2).

I.5. Obtención de nanocápsulas de polidopamina

Las cápsulas son contenedores con una carcasa sólida cuyo interior está vacío. Poseen aplicaciones como microreactores, sensores, orgánulos artificiales o transportadores de fármacos.²⁴⁰ Para su uso en ACF deben mostrar buenas cualidades en cuanto a tamaño, forma y carga superficial, mencionadas en el apartado I.1.2.2. Junto a estos factores se encuentra también la flexibilidad del nanotransportador que está directamente relacionada con la capacidad de absorción celular. Las partículas y macromoléculas son absorbidas por las células mediante endocitosis, que controla de manera precisa la respuesta de las células a su entorno.²⁴¹ Existen dos mecanismos mayoritarios de endocitosis, la fagocitosis y la pinocitosis. El primero es el proceso usado para la absorción de partículas de gran tamaño donde las células rodean con su membrana citoplasmática las partículas sólidas y las introducen al interior celular. El segundo mecanismo de absorción, la pinocitosis, es la vía por la que se absorben las partículas más pequeñas, fluidos o solutos por invaginación de la membrana citoplasmática.²⁴² La fagocitosis por parte de las células mamíferas se lleva a cabo principalmente por células especializadas como macrófagos, monocitos y neutrófilos. Este tipo de células se encargan de eliminar patógenos grandes tales como bacterias o levaduras, además de restos de células muertas, depósitos arteriales, etc.²⁴³

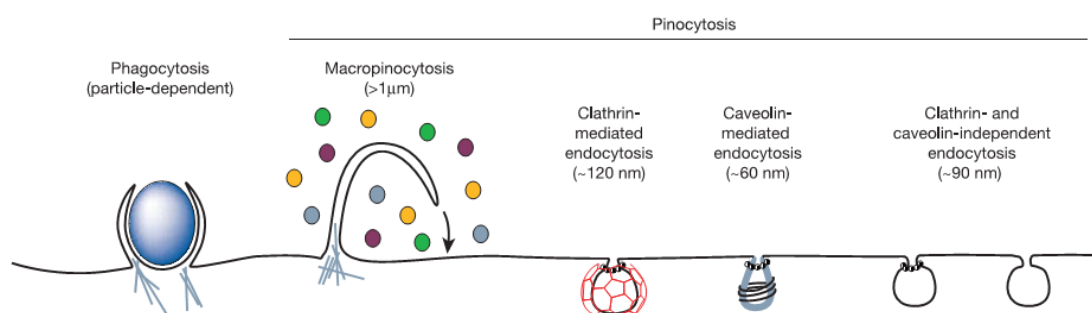


Figura I.17. Algunas vías de entrada en la célula mamífera. Las vías de endocitosis difieren en relación al tamaño de la vesículas endocíticas, la naturaleza de la carga (ligandos, receptores y lípidos) y el mecanismo de formación de la propia vesícula.²⁴³

La capacidad de deformación elástica de los nanotransportadores blandos dificulta la fagocitación del dispositivo por parte de los macrófagos. Así pues, los dispositivos elásticos sortean mejor al sistema inmune permaneciendo en el sistema circulatorio durante periodos más largos, aumentando las posibilidades de éxito de la vectorización.²⁴⁴ La metodología más extendida para la obtención de cápsulas de naturaleza blanda es el uso de polímeros o lípidos.

Dentro de la variedad de procesos de fabricación existen dos aproximaciones generales para la obtención de cápsulas poliméricas: sin el uso de plantillas (o moldes) para la formación de la cápsula y mediante el uso de plantillas sobre las que formar el recubrimiento polimérico. En los métodos sin moldes se aprovechan las propiedades de autoensamblado de diferentes moléculas para formar las cápsulas requeridas. Un ejemplo representativo es la formación de los llamados polimerosomas. Estas vesículas pueden ser consideradas análogos poliméricos de los liposomas ya que se valen de las propiedades de co-polímeros anfifílicos que se organizan para formar estructuras supramoleculares esféricas con un núcleo acuoso encerrado por la formación de una bicapa. De esta manera, se puede modular la composición

de la membrana para obtener diferentes funcionalidades en la superficie exterior usando diferentes co-polímeros de bloque e incluso mezclas de ellos.¹⁸

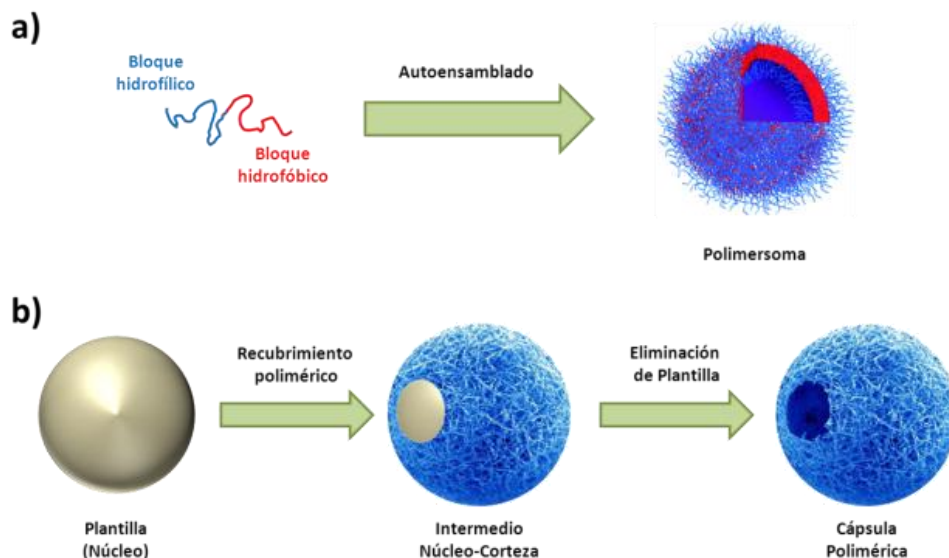


Figura I.18. Estrategias de fabricación de cápsulas poliméricas. Autoensamblado de cápsulas poliméricas mediante co-polímeros de bloque (a) y fabricación de cápsulas poliméricas mediante el uso de plantillas (b).

El uso de plantillas para generar cápsulas poliméricas es probablemente la aproximación más extendida para la obtención de este tipo de materiales.²⁴⁵ Existen multitud de métodos diferentes en función de los mecanismos de formación de la corteza polimérica y el tipo de molde utilizado. De manera general, en esta aproximación se genera un núcleo (plantilla) sobre el cual se forma la cobertura polimérica, formando un intermedio núcleo-corteza. A continuación se lleva a cabo la eliminación del núcleo mediante métodos físicos o químicos y posteriormente se carga con la sustancia requerida por difusión a través de la corteza.

La elección de la plantilla así como de la naturaleza del polímero son factores cruciales para la fabricación de cápsulas con distintas propiedades y aplicaciones. De la elección del núcleo dependerán tanto el tamaño como la forma de las cápsulas finales, y su eliminación no debe afectar a la estructura ni a la estabilidad de la corteza polimérica formada. Los moldes son de muy diferentes naturalezas, pudiéndose clasificar en duros (NPs de sílice, metálicas, etc.) y blandas (polímeros o emulsiones).

Otro método interesante para la formación de cápsulas poliméricas es la polimerización sobre la superficie de la plantilla. En esta metodología es necesaria la previa funcionalización de la superficie del molde con grupos iniciadores (generadores de radicales) o polimerizables (metacrilatos, acrilamidas, etc.). El crecimiento de las cadenas puede producirse desde la superficie de la plantilla, lo que se denomina el método *grafting from*. Si el crecimiento del polímero se produce en el seno de la disolución para más tarde unirse a la superficie de la plantilla, se denomina método *grafting to*. Estos tipos de crecimiento dan lugar a diferentes estructuras y densidades de la corteza polimérica, lo que determina su funcionamiento.

Para la formación de la carcasa polimérica existen numerosas técnicas.²⁴⁶ En esta tesis doctoral se ha desarrollado una nueva metodología rápida y sencilla para la obtención de cápsulas de polidopamina (PDA) mediante el uso de MSNs como plantilla en colaboración con el grupo de investigación *Nanostructured Functional Materials* liderado por el Dr. Ruiz Molina. La utilización de PDA se debe a sus excelentes características en cuanto a adhesión a superficies, biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que suscita un gran interés en aplicaciones biomédicas.²⁴⁷ La utilización de plantillas duras es la aproximación más usada para la fabricación de cápsulas de PDA, en concreto el uso de nanopartículas de sílice compacta. Ésta metodología requiere la utilización de productos químicos muy agresivos y tóxicos para disolver la sílice (p.ej. HF), lo que lo hace incompatible con incorporación de funcionalidades sensibles a estos agentes químicos.

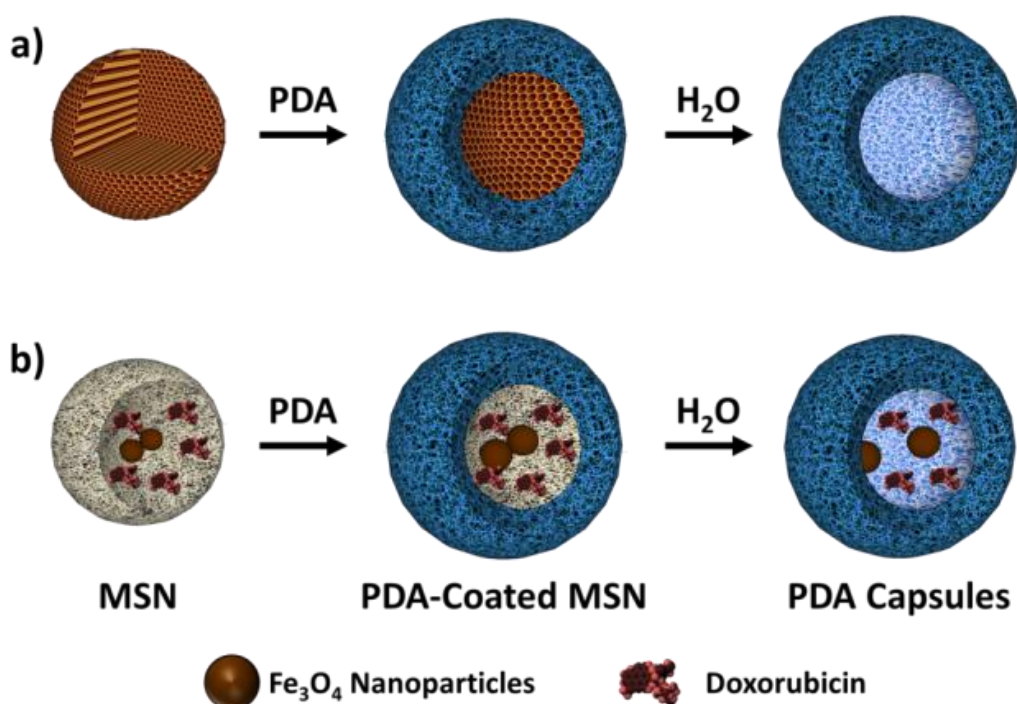


Figura I.19. Esquema de rutas sintéticas para la obtención de cápsulas de PDA (a) y cápsulas de PDA cargadas con SPION y doxorubicina.

El proceso desarrollado en esta tesis doctoral carece del uso de agentes químicos agresivos para eliminar la plantilla de sílice. Ésta metodología permite la inclusión de agentes terapéuticos, nanopartículas e incluso ambas funcionalidades a la vez en el interior de las cápsulas de PDA. Los resultados (artículo 5) de los estudios de liberación de fármacos y cultivos celulares ponen de manifiesto la posibilidad de su aplicación en ACF.

Capítulo

II

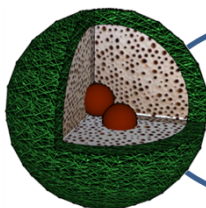
Resultados y Discusión

Como la vela al arder,
el entendimiento humano alumbra quemándose,
consumiéndose y derramando lágrimas.

Santiago Ramón y Cajal

II. Resultados y Discusión

El objetivo de este capítulo es describir y discutir los aspectos metodológicos implicados en la síntesis y caracterización de los materiales sintetizados. Las técnicas de caracterización utilizadas serán brevemente descritas a continuación (Anexo A) así como la información que brindan para analizar los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. Los detalles sobre los procedimientos sintéticos y los equipos utilizados están recogidos en la sección experimental de los artículos a los que ha dado lugar esta tesis doctoral.



III.1. Síntesis de MMSNs estímulo-respuesta para ACF mediante compuertas poliméricas termosensibles

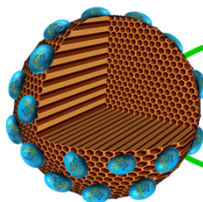
- II.1.1. Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
- II.1.2. Inclusión de SPION en la matriz de nanopartículas de sílice mesoporosa
- II.1.3. Recubrimiento de MMSNs con polímeros termosensibles

CHEMISTRY OF
MATERIALS

Artículo 1. *Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles*

Langmuir Artículo 2. *Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect*

RSC Advances Artículo 3. *Design of thermoresponsive polymeric gates with opposite controlled release behaviors*

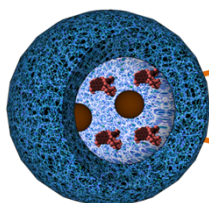


II.2. Síntesis de nanotransportadores híbridos MSN-cápsula enzimática para la generación de citotóxicos *in situ*

- II.2.1. Síntesis de cápsulas poliméricas de HRP
- II.2.2. Estrategias de anclaje de HRPc a la superficie de las MSNs

ADVANCED
FUNCTIONAL
MATERIALS
www.afm-journal.de

Artículo 4. *Hybrid Enzyme-Polymeric Capsules/Mesoporous Silica Nanodevice for In Situ Cytotoxic Agent Generation*



II.3. Síntesis de cápsulas de polidomamina como nanotransportadores para ACF

WILEY-VCH

Artículo 5. *Green Synthesis of Polydopamine-Like Nanocapsules via Water-triggered removal of a Sacrificial Mesoporous Silica Template*

II.1. Síntesis de MMSNs estímulo-respuesta para ACF mediante compuertas poliméricas termosensibles

La figura II.1 ilustra la ruta de síntesis general de estos materiales, la cual comienza con la obtención de SPION por co-precipitación. A continuación, las SPION se añaden en una solución de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que actúa como agente estabilizador y director de estructura. La formación de la matriz de sílice mesoporosa se realizó mediante hidrólisis básica y policondensación de tetraetilortosilicato (TEOS) como fuente de sílice para formar las nanopartículas con estructura mesoporosa. Previa funcionalización con 3-(Trimetoxisilil)propil metacrilato (MPS) para dotar de grupos polimerizables a la superficie de las partículas, se procedió a la polimerización radicalaria en superficie de diferentes proporciones y combinaciones de monómeros (NIPAM/NHMA/MBA) o polímeros ya formados como la PEI.

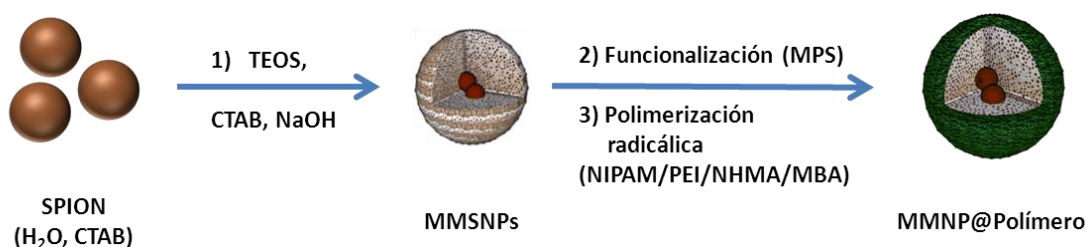


Figura II.1. Esquema general de síntesis de nanotransportadores magnéticos estímulo-respuesta.

II.1.1. Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

Las nanopartículas superparamagnéticas pueden obtenerse por varios procesos físicos y químicos. Dejando a un lado aquellos obtenidos por aproximación “de arriba abajo” los métodos más usados implican la formación de las nanopartículas desde iones o precursores moleculares. Esta aproximación “de abajo arriba” permite modular la composición, el tamaño y la forma, mediante el control de las condiciones de síntesis, obteniendo así las propiedades magnéticas deseadas. Dentro de las rutas sintéticas más empleadas se encuentran la co-precipitación de sales de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, descomposición térmica de complejos organometálicos, hidrólisis alcalina en disolventes polialcólicos y tratamiento hidrotermal post-sintético (i.e., a altas presiones). Todas estas estrategias utilizan el “modelo de LaMer” para interpretar la formación de las NPM y explicar las distribuciones de tamaño obtenidas. Este modelo postula que la precipitación de las nanopartículas está gobernada por tres procesos diferentes: nucleación, crecimiento del cristal y maduración. Los métodos desarrollados para la síntesis de estos materiales se basan en una rápida nucleación separada en el tiempo del proceso de crecimiento del cristal, el cual se produce mediante la difusión de los reactivos hacia los núcleos formados.

El método de síntesis de SPION utilizado en esta tesis doctoral es el de co-precipitación, el cual fue descrito por primera vez por Massart en 1981.²⁴⁸ Éste método permite la fabricación de SPION de una forma reproducible y en dispersión acuosa. En una primera aproximación, se disolvieron sales de cloruros de Fe^{2+} y Fe^{3+} en medio ácido (para evitar la precipitación temprana en forma de hidróxidos de hierro). A continuación se produjo

la precipitación de ambas sales por la adición rápida de una base (NH_4OH) siguiendo la reacción (1):



Este método permite la fabricación de magnetita (Fe_3O_4) en medio acuoso a escala de kilogramos, por lo que es muy usado en la industria, aunque el control de las condiciones de reacción debe ser minucioso puesto que la precipitación se produce de forma instantánea. La proporción $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, el tipo de aniones en disolución, el pH final de la disolución, la temperatura, la fuerza iónica, afectan a las características de las nanopartículas, incluidos tamaño y forma. Una vez obtenidos los cristales de magnetita, se oxidó a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) mediante la incorporación de sales de nitrato de Fe^{3+} en medio ácido. La exposición al oxígeno presente en el aire también lleva a cabo esta transformación debido a que la maghemita es el producto termodinámicamente favorable. El proceso de oxidación se aceleró empleando nitrato de hierro (II) se realizó para asegurar la completa oxidación de la muestra. Normalmente, las nanopartículas obtenidas por este método muestran formas irregulares y tamaños entre 5-15 nm estabilizadas en medio acuoso a $\text{pH} = 1$.²⁴⁹

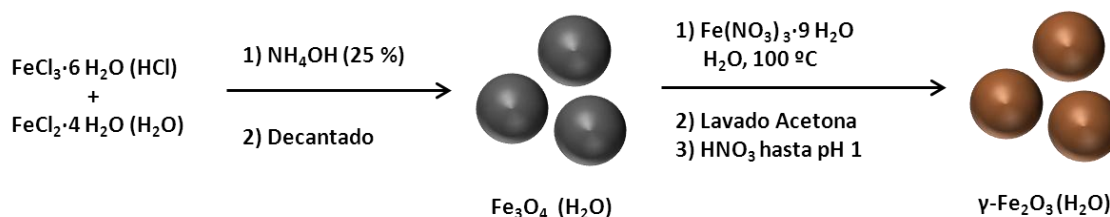


Figura II.2. Ruta de síntesis de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Otra de las síntesis por co-precipitación exploradas fue la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 estables en medio orgánico (CHCl_3) mediante la adición ácido oleico (OA) como estabilizador. El OA actúa como ligando mediante la coordinación de su grupo ácido con la superficie de las partículas, exponiendo su parte hidrofóbica al exterior y por tanto haciendo a las SPION dispersables en cloroformo ($\text{OA-Fe}_3\text{O}_4$). Así pues, se obtuvieron SPION recubiertas de una densa monocapa de OA que protege a las partículas y ayuda a prevenir la agregación.²⁵⁰ Se comprobó en ambos casos que los difractogramas corresponden a cristales de óxido de hierro y los perfiles de las curvas de magnetización, sin apenas histéresis, demuestran su naturaleza superparamagnética. Además no se observan diferencias apreciables en la magnetización de saturación entre ambas muestras.

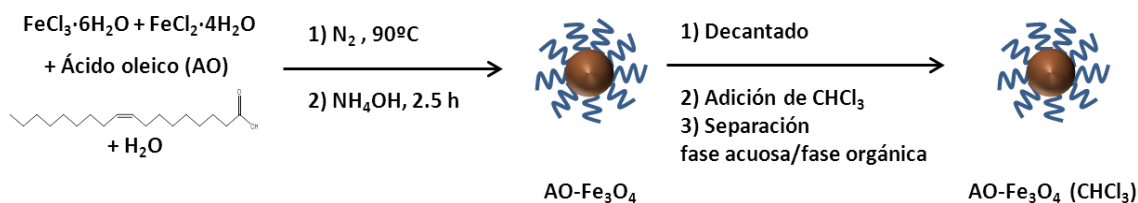


Figura II.3. Ruta de síntesis de nanopartículas de magnetita ($\text{AO-Fe}_3\text{O}_4$)

II.1.2. Inclusión de SPION en la matriz de nanopartículas de sílice mesoporosa

Los procesos de encapsulación de ambas muestras ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, estable en medio acuoso y $\text{OA-Fe}_3\text{O}_4$, estable en CHCl_3) son similares ya que se realiza un recubrimiento con CTAB previo a la adición de TEOS, y por tanto a la formación de las MMSNs mediante el método sol-gel. En ambos casos, las SPION actúan como núcleos para el crecimiento de la matriz de sílice, puesto que se observan los núcleos magnéticos en el centro de la estructura mesoporosa.

En el caso de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, el recubrimiento con el surfactante se forma al añadirlo a la mezcla de reacción NaOH/CTAB. En las condiciones de pH básico del medio de reacción (pH = 12) la carga superficial de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ es negativa, lo que permite el recubrimiento con CTAB debido a interacciones electrostáticas entre la superficie de las NPs y la cabeza catiónica del surfactante. El potencial ζ positivo (+35 mV) que muestran las nanopartículas una vez recubiertas indica la formación de una bicapa de surfactante debida a las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas de CTAB. A continuación se procede a la adición de TEOS como precursor de sílice. Éste se añade gota a gota sobre el medio de reacción, se hidroliza y policondensa sobre las micelas de CTAB el cual actúa como agente director de estructura, dando lugar a la formación de MMSNs. Se realizó una comparativa entre el empleo de dos bases diferentes para llevar a cabo la hidrólisis y policondensación de TEOS, una base débil (NH_4OH) y otra fuerte (NaOH). Los datos revelaron que la síntesis en NH_4OH da lugar a MMSNs de mayor tamaño que el obtenido con NaOH, por lo que se eligió esta última para la encapsulación de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (255 nm y 75 nm respectivamente por DLS). La síntesis catalizada por NaOH dio lugar a MMSNs con morfología cuasi-esférica y varias SPION en su interior, como revelan los datos de DLS y las imágenes de TEM obtenidas (figura II.4). También se realizaron estudios sobre la cantidad máxima de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ que se puede encapsular en la matriz de sílice mesoporosa con el objeto de alcanzar la máxima cantidad del componente magnético sin perder tanto sus propiedades texturales, en cuanto a área superficial y volumen de poro, como su tamaño y morfología (artículo 1).

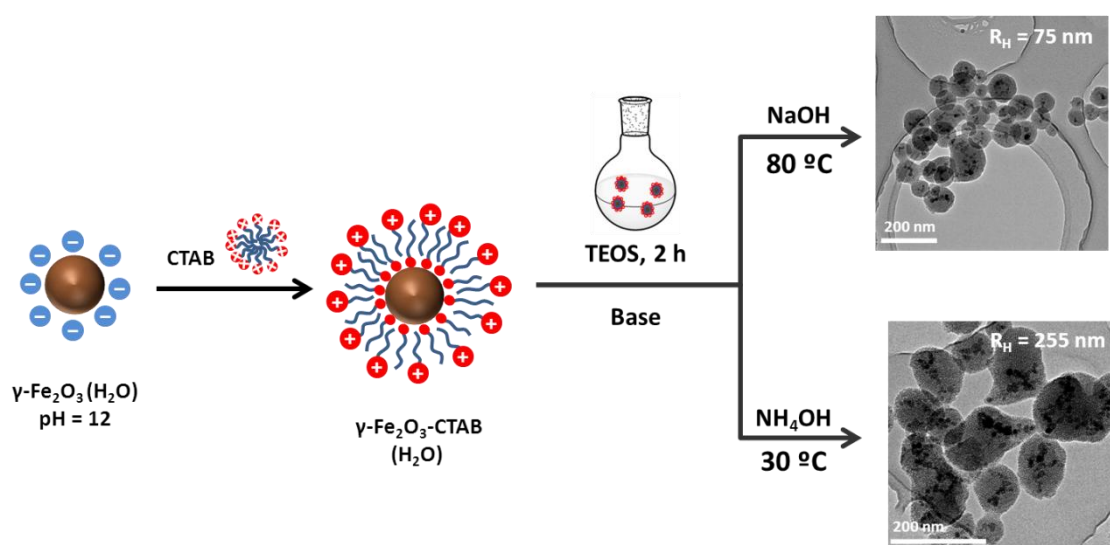


Figura II. 4. Recubrimiento de las SPION (hidrofílicas) en medio acuoso básico con CTAB y síntesis de MMSNs con distintas bases.

El método de encapsulación de las nanopartículas de OA-Fe₃O₄, requiere un paso previo de transferencia de la fase orgánica (CHCl₃) a la fase acuosa para hacerlas dispersables en el medio de reacción donde se producirá el crecimiento de la matriz de sílice. Esta transferencia de fase se consiguió mediante el goteo de las NPs dispersas en CHCl₃ sobre una disolución de CTAB en H₂O bajo agitación, ultrasonidos y a 40 - 60 °C, hasta que todo el cloroformo fue evaporado. La estabilización en medio acuoso se da por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas del OA que recubre las nanopartículas y la parte hidrófoba del CTAB. Así pues, se obtuvieron las nanopartículas de OA-Fe₃O₄ con un potencial ζ positivo, lo que indica que el recubrimiento con el surfactante ha sido efectivo. El crecimiento de la sílice se llevó a cabo por co-condensación retardada mediante la adición de polietilenglicol-trialcoxilano (PEG-Si) 15 min después de la policondensación de TEOS. De esta manera se obtuvieron MMSNs (Fe₃O₄@SiO₂) con un tamaño centrado en 50 nm (DLS, TEM) con una o más SPION en su interior.

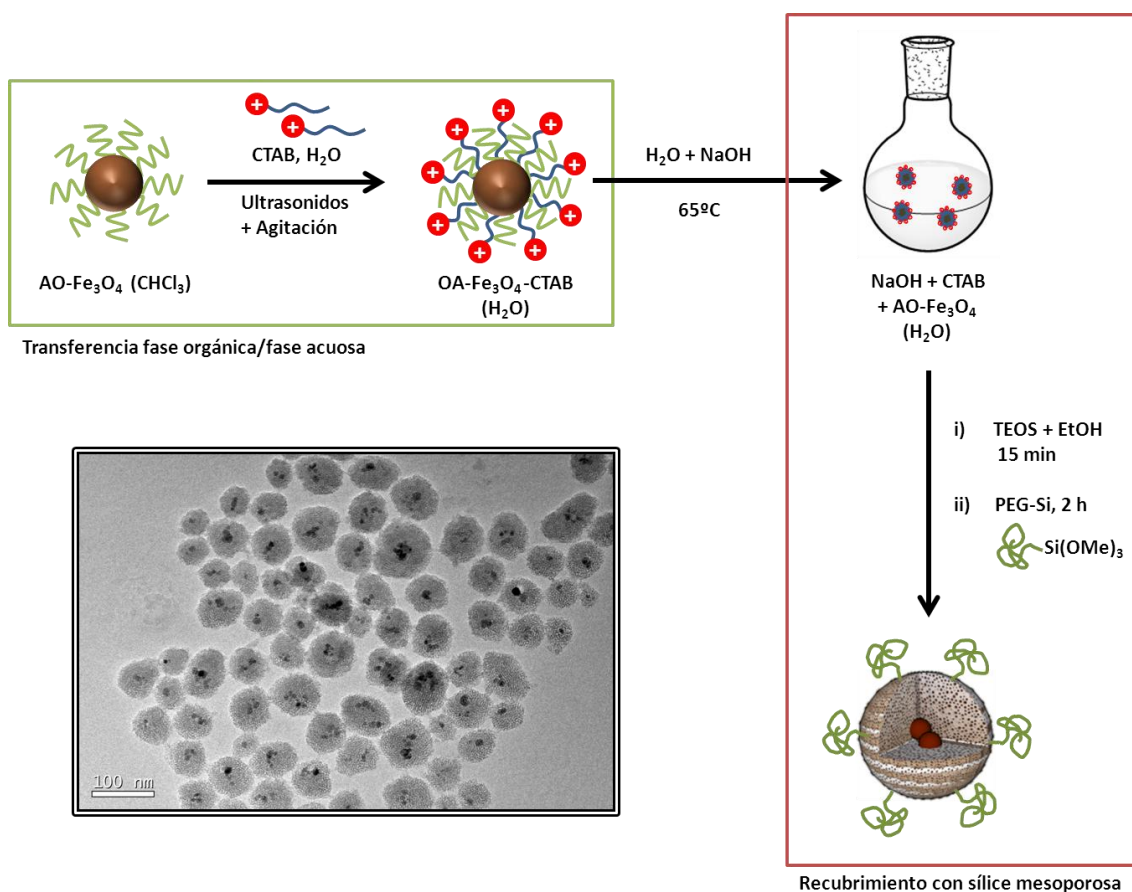


Figura II.5. Transferencia de OA-Fe₃O₄ de la fase orgánica (CHCl₃) a fase acuosa mediante el recubrimiento con CTAB y síntesis de MMSNs con PEG en superficie mediante co-condensación retardada.

La determinación de hierro de ambas muestras se llevó a cabo mediante medidas de magnetización por VSM, revelando un 47 % (en peso) de material magnético en la muestra γ -Fe₂O₃@SiO₂, y un 10 % para la muestra Fe₃O₄@SiO₂. Una mayor carga de hierro en la matriz de sílice supone una mayor capacidad de calentamiento bajo el mismo campo magnético alterno, pero para su aplicación en ACF han de tenerse otros factores en cuenta, como por

ejemplo la estabilidad de las partículas o sus propiedades texturales. La muestra $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ tiene buenas características para su aplicación en ACF pero muestra tendencia a la agregación, probablemente debido a que carece de grupos estabilizantes en su superficie. La presencia de grupos grandes de SPION inmovilizados en su núcleo puede aumentar las fuerzas dipolo-dipolo interpartícula, lo que puede inducir a la agregación.²⁵¹ Además, su gran contenido en hierro hace que área superficial disminuya y por tanto la capacidad de carga de fármacos. Por lo tanto, la encapsulación en matrices de sílice mesoporosa de SPION permite obtener MMSNs con diferentes características dependiendo de la naturaleza de las nanopartículas magnéticas empleadas (tabla II.1).

Muestra	R_H (nm)	S_{BET} ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	50 - 100 nm	747
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	78 - 100 nm	1391

Tabla II.1. Radio hidrodinámico (R_H) y área superficial (S_{BET}) de las muestras $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$, y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

La utilización de SPION de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (estables en medio acuoso), conduce a la obtención de cargas magnéticas mayores que aquellas que se encuentran estabilizadas en medio orgánico. Sin embargo, se observó una disminución notable del área superficial de la matriz mesoporosa en relación al aumento de la cantidad de SPION y tendencia a la agregación. La encapsulación de SPION estabilizadas con ácido oleico (OA- Fe_3O_4) conlleva menores cargas magnéticas aunque mejores propiedades texturales. Estas diferencias podrían deberse a que el recubrimiento con CTAB es más efectivo mediante las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas del surfactante y el OA, que las interacciones electrostáticas entre la cabeza catiónica del CTAB y la superficie de las $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

II.1.3. Recubrimiento de MMSNs con polímeros termosensibles

Los polímeros sensibles a estímulos se pueden clasificar como aquellos capaces de cambiar la dimensión de su cadena, su estructura secundaria, solubilidad o su asociación intermolecular. Las causas de los procesos que dan lugar a la respuesta son en general la formación o destrucción de fuerzas intermoleculares (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, etc.), las reacciones simples (p.ej. ácido-base o redox), gradientes osmóticos e incluso la degradación de las cadenas poliméricas (polímeros auto-inmolativos, hidrogeles). En este marco se encuadran los polímeros termosensibles, cuya respuesta a la temperatura se puede describir mediante dos umbrales de temperatura en función de la miscibilidad de los componentes (agua y polímero). Los polímeros son solubles en cualquier composición por encima (UCST, *upper critical solution temperature*) y por debajo (LCST, *lower critical solution temperature*) de ciertas temperaturas críticas. Para cortezas poliméricas entrecruzadas la temperatura de transición se denomina VPTT (del inglés *volume phase transition temperature*).²⁵²

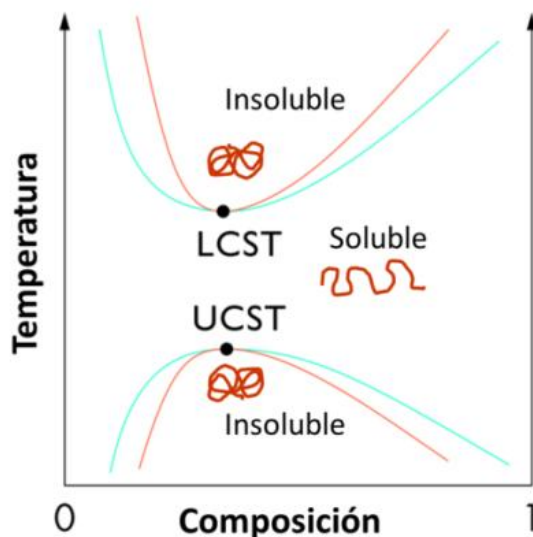


Figura II.6. Gráfico de solubilidad de polímeros termosensibles en disolución acuosa en función de la concentración y la temperatura.

En esta tesis doctoral se sintetizaron co-polímeros termosensibles basados en pNIPAM para el recubrimiento de MMSNs. El uso de este tipo de polímeros se debe a que su temperatura transición hidrofílico/hidrofóbico de 32 °C es muy cercana a la temperatura fisiológica. La síntesis de los polímeros llevada a cabo por vía radicalica, da lugar a redes poliméricas con una ordenación de los monómeros aleatoria. Los polímeros termosensibles así sintetizados se componen de una unidad repetitiva que contiene grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en su estructura. En el caso del pNIPAM el grupo hidrofílico corresponde al grupo amida y el hidrofóbico a los grupos isopropilo. El comportamiento termosensible del pNIPAM se atribuye a que por debajo de su LCST el agua actúa como buen disolvente y las cadenas poliméricas se encuentran en forma lineal. Al superar la LCST, los enlaces de hidrógeno entre el agua y el grupo amida se ven perturbados, por lo que las interacciones hidrofóbicas entre grupos isopropilo se tornan dominantes, y por tanto se produce el colapso de las cadenas adoptando forma globular.²²⁹

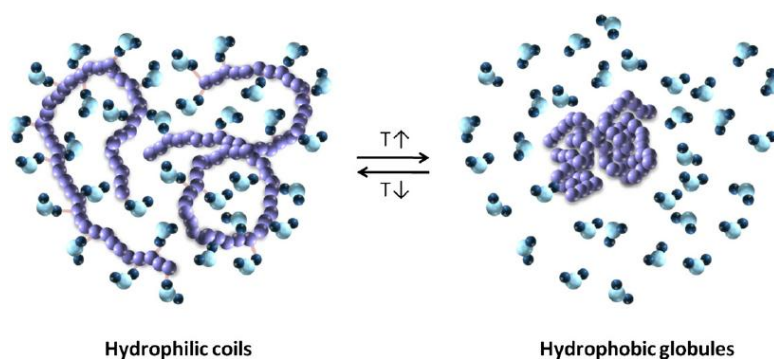


Figura II.7. Esquema del comportamiento reversible soluble/insoluble de polímeros termosensibles en función de la temperatura. Por debajo de la LCST el polímero es hidrofílico (izquierda) y se encuentra solvatado por las moléculas de agua. Por encima de la temperatura de transición (derecha), la pérdida de agua provoca el colapso de las cadenas del polímero, el cual adquiere carácter hidrofóbico.²⁵³ Reproducido con permiso de²⁵⁴

Como ejemplo, una disolución del polímero por debajo de la LCST es homogénea y transparente, mientras que por encima de su LCST el polímero precipita y la disolución se enturbia. Este proceso de precipitación sucede porque es energéticamente más favorable. En términos termodinámicos, considerando la energía libre del sistema (ΔG) la separación de fases es más favorable con el aumento de la temperatura debido al incremento en el término de la entropía ($-T\Delta S$) en la ecuación 1. Concretamente, es la entropía del agua la que impulsa la transición, cuando el polímero se encuentra precipitado, el agua se encuentra en un estado más desordenado y por tanto posee mayor entropía.²⁵⁵ Este proceso es conocido como “efecto de hidrofobicidad”, que describe la tendencia de las sustancias apolares a la agregación en disoluciones acuosas y excluir a las moléculas de agua.²⁵⁶

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Este tipo de polímeros ha sido ampliamente estudiado, encontrándose que su temperatura de transición puede ser modulada de forma precisa mediante la inclusión de distintos monómeros en su estructura. Estos monómeros aumentan las interacciones de las cadenas laterales con el disolvente (aumentar la LCST) o con otros segmentos del propio polímero (disminuir su LCST).

Para el anclaje de las cadenas poliméricas a las MMSNs, es necesaria una funcionalización con grupos polimerizables por medio de radicales. Esto se llevó a cabo mediante la funcionalización post-síntesis con MPS antes de la extracción del surfactante. De esta manera, se consigue funcionalizar tan solo la superficie exterior de las MMSNs, dejando el interior de los poros libre para no afectar a la capacidad de carga de fármacos.

II.1.3.1. Obtención de recubrimientos termosensibles con capacidad de retención de fármacos y macromoléculas

Como primer objetivo se propuso la fabricación de un dispositivo capaz de realizar una terapia combinada con dos agentes terapéuticos diferentes bajo la aplicación de un campo magnético alterno. Para ello se planteó la liberación de moléculas pequeñas desde el interior de los poros y una proteína modelo (el inhibidor de tripsina de soja tipo II-S, STI) adsorbida en la corteza polimérica. A diferencia de la terapia con un solo agente terapéutico, la terapia combinada puede atacar las células tumorales por diferentes vías e incluso sortear los mecanismos de resistencia farmacológica asociados al tratamiento del cáncer. Este tipo de terapias suponen un efecto terapéutico mayor de los fármacos en combinación frente a la suma de los efectos de los fármacos individualmente.²⁵⁷

Por lo tanto, se realizó un recubrimiento de MMSNs con NIPAM como monómero termosensible y PEI para dotar a la capa polimérica de capacidad de retención de macromoléculas y lograr la doble liberación deseada. Este polímero poliaminado presenta gran afinidad por determinadas proteínas y ácidos nucleicos mediante interacciones electrostáticas o la formación de enlaces de hidrógeno. Además, su carácter policationico aumenta la absorción celular debido a las interacciones electrostáticas favorables con la superficie negativa de la membrana celular, lo cual ayuda a mejorar la eficacia de la ACF. La PEI se utilizó también como iniciador de la polimerización radicalica mediante su reacción con persulfato amónico (APS).²⁵⁸ Para modular la retención del STI, se realizaron estudios sobre la proporción de PEI adecuada en la polimerización. Se observó que al aumentar la cantidad de PEI en el

recubrimiento, tanto la carga superficial como la pérdida de masa orgánica aumentaban (tabla II.2). Los datos ponen de manifiesto que una razón del 0.30 % mol de PEI proporcionaba un potencial en superficie de 41.1 mV, lo que resulta adecuado para estabilizar las partículas en suspensión y retener proteínas en su estructura. Sin embargo, a proporciones de PEI muy bajas (0.04 % mol) se observó una pérdida de masa orgánica por TGA muy pequeña (0.4 %), por lo que el recubrimiento no fue efectivo.

%PEI	Potencial ζ (mV)	TGA (% Polímero)
0.04	+14.7	0.4
0.07	+23.6	13.4
0.15	+29.9	14.6
0.30	+41.1	14.0

Tabla II.2. Relación entre la cantidad de PEI añadida en la formación del recubrimiento y los valores de potencial ζ y cantidad de polímero anclado en superficie.

Esto podría explicarse si la PEI actuase como asistente a la polimerización, reteniendo los monómeros sobre la superficie negativa de las MMSNs, y facilitando así la formación de la capa polimérica. En este supuesto, una cantidad de PEI demasiado baja daría lugar a una adsorción en superficie y retención de los monómeros insuficientes para formar una corteza polimérica termosensible después del inicio de la polimerización por parte de la PEI.

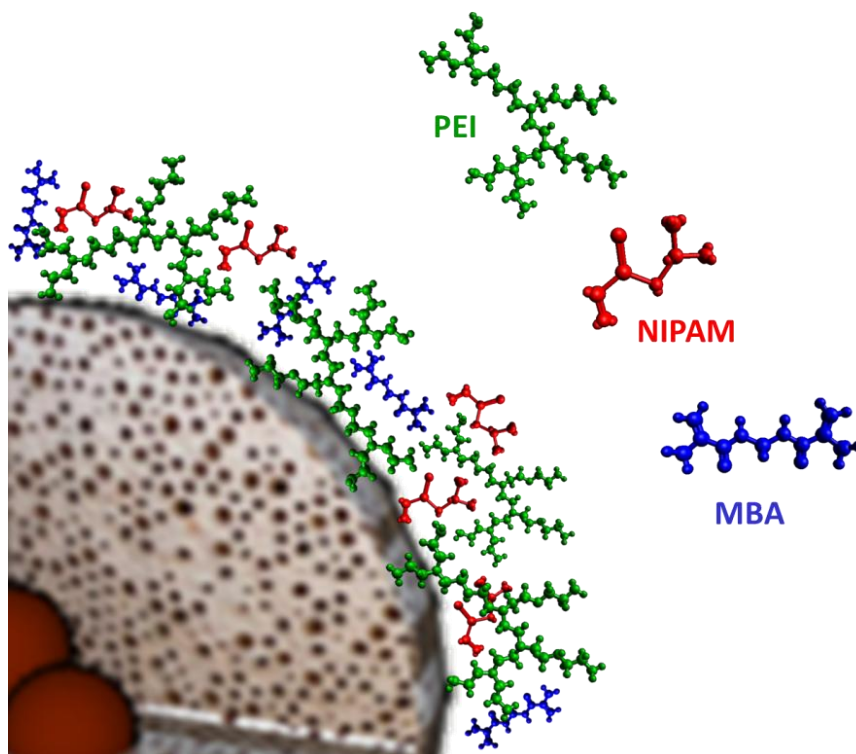


Figura II.8. Esquema del mecanismo propuesto de adsorción MMSN-PEI-NIPAM.

La utilización de *N,N'*-Metilenbis(acrilamida) (MBA) como monómero entrecruzante responde a la necesidad de controlar la densidad de la capa polimérica formada. Para conocer la cantidad adecuada de MBA, se realizaron varios recubrimientos con diferentes proporciones de este monómero. A continuación, los materiales obtenidos se cargaron con fluoresceína en el interior de los poros y se siguió la liberación del fluoróforo por espectroscopia de fluorescencia. Los resultados mostraron que un 10 % mol de MBA era la cantidad adecuada para obtener una densidad de la corteza polimérica que respetase el carácter termosensible del polímero, observándose una temperatura de transición entre 30 °C y 40 °C. También se observó que un exceso de MBA resultaba en la agregación irreversible de las MMSNs.

Una vez determinadas las cantidades más adecuadas de NIPAM, MBA y PEI para conservar las propiedades requeridas del polímero (termosensibilidad y retención de macromoléculas), se procedió a la caracterización de MMSN-NIPAM. Estos resultados mostraron una cantidad de polímero anclado del 18 – 20% por TGA, un radio hidrodinámico apenas alterado y un potencial ζ positivo. Seguidamente, se sometió al nanotransportador cargado con fluoresceína y STI a dos temperaturas, 20 °C y 50 °C. Los perfiles de liberación de fluoresceína y STI obtenido, revelaron que el recubrimiento era eficaz para la retención de moléculas en el interior de la matriz mesoporosa de sílice, así como de la proteína en la capa polimérica exterior. La capacidad estímulo-respuesta del nanotransportador fue investigada mediante la aplicación de un campo magnético alterno (CMA) de 24 kA·m⁻¹ y 100 kHz, mostrando una respuesta efectiva a la aplicación del estímulo magnético (figura II.9).

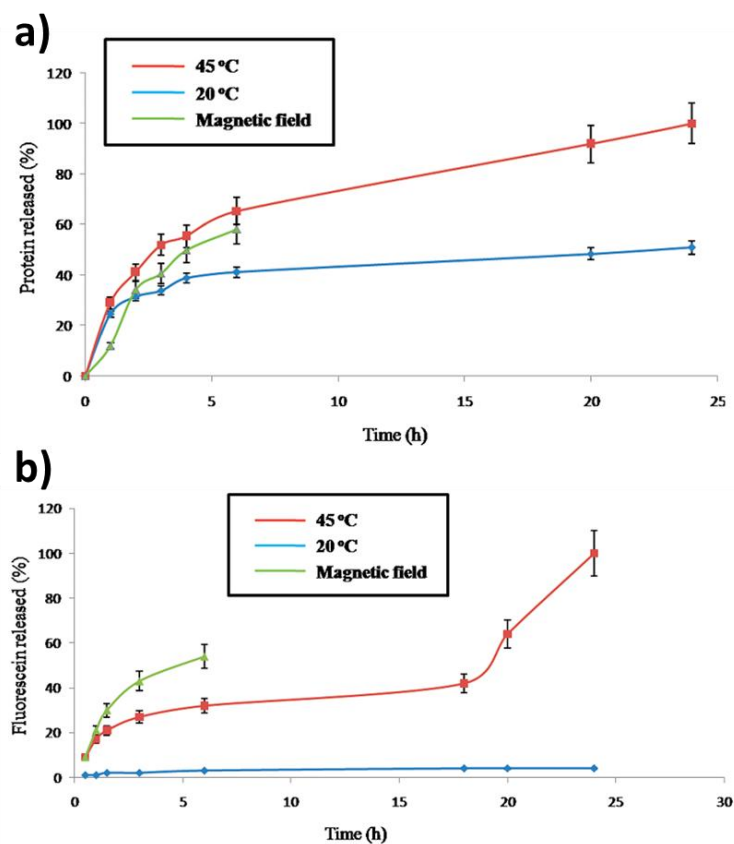


Figura II.9. Perfiles de liberación en función del tiempo a dos temperaturas (45 °C y 20 °C) y bajo aplicación del campo magnético para la proteína STI (a) y la fluoresceína retenida en la matriz de sílice mesoporosa (b).

Para conocer la temperatura a la cual se producía la transición hidrofílico/hidrofóbico del recubrimiento polimérico, varias alícuotas de MMSN-NIPAM cargado con fluoresceína se sometieron a diferentes temperaturas entre 20 °C y 50 °C durante 5 h. A continuación, las suspensiones se centrifugaron para medir la fluorescencia de los sobrenadantes. Se observó que la muestra a 40 °C liberaba la máxima cantidad de fluoresceína. Este hecho indica que la VPTT se encontraba entre los 30 °C y 40 °C, lo que está de acuerdo con los valores típicos de este tipo de polímeros (artículo 1).

Dado que el rango de temperaturas en el que se produce la liberación es ancho, se realizaron nuevos recubrimientos poliméricos incluyendo *N*-hidroximetilacrilamida (NHMA) como monómero hidrofílico. El objetivo era elevar la temperatura de transición del polímero termosensible hasta los 40 - 45 °C, donde se establece el rango para terapia por hipertermia.¹¹² La formación de la capa polimérica sobre la superficie de las MMSNs funcionalizadas con grupos metacrilato se realizó siguiendo la metodología descrita en el artículo 1, utilizando PEI como iniciador y posible asistente de la polimerización. Si bien el recubrimiento polimérico de las MMSNs fue efectivo, se observó que no existían diferencias significativas en la liberación de fluoresceína entre 37 °C y 50 °C con las diferentes proporciones NIPAM/NHMA/MBA/PEI empleadas (figura II.10). Por tanto, estos nanotransportadores no pudieron ser considerados como sistemas estímulo-respuesta. Las pequeñas diferencias en la liberación podrían atribuirse a efectos de solubilidad en función de la temperatura. Este hecho podría deberse a que la introducción del monómero hidrofílico NHMA, más la presencia de PEI (también de naturaleza hidrofílica) habría variado la VPTT del recubrimiento termosensible, no produciéndose la transición hidrofílico-hidrofóbico a la temperatura adecuada.

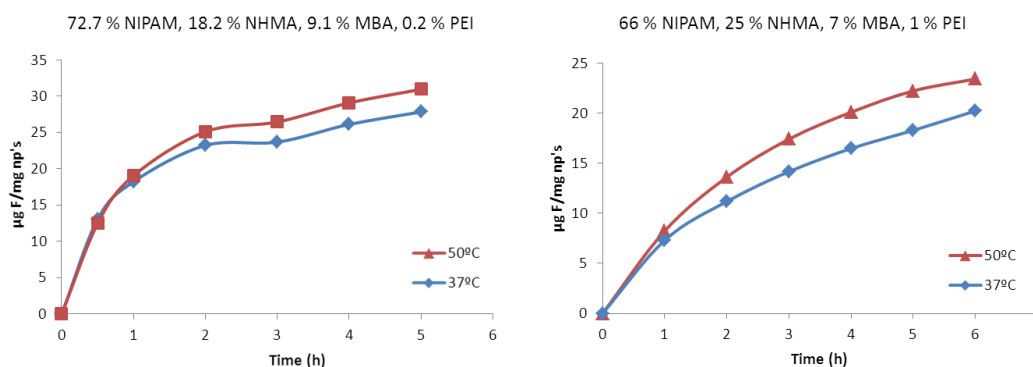


Figura II.10. Ejemplo de liberación de fluoresceína en función del tiempo a 37 °C y 50 °C de dos recubrimientos con diferentes proporciones de monómeros e iniciador, los cuales no muestran diferencias apreciables entre las dos temperaturas.

Dado que el método de determinación de la LCST por liberación de fluoresceína no fue suficientemente preciso, se exploró la posibilidad de detectar la contracción del polímero mediante medidas de tamaño por DLS. Para ello, se trató de medir el cambio en el radio hidrodinámico del recubrimiento termosensible en PBS en función de la temperatura del medio, no observándose cambios significativos en el tamaño de la muestra. Esto podría deberse a que la capa polimérica sobre la superficie de las partículas no era suficientemente gruesa para haber podido detectar un cambio de grosor del recubrimiento mediante esta técnica.

Debido a la imposibilidad de controlar la VPTT, se decidió eliminar la PEI para salvaguardar la precisión de la temperatura de transición de la corteza polimérica. Al llevar a cabo la polimerización en superficie sin la presencia de PEI, se observó que el recubrimiento de las MMSNs no era efectivo. Esto puede deberse a que los monómeros no presentan suficiente afinidad por la superficie de las MMSNs, con lo que se procedió al uso de otros disolventes para aumentar las interacciones superficie-monómero. Los recubrimientos poliméricos llevados a cabo en EtOH, DMF y THF tampoco resultaron eficaces, llegando a la conclusión de la necesidad de un agente que aumentase la afinidad entre los monómeros y la superficie de las partículas como asistente de la polimerización, en pos de obtener recubrimientos poliméricos efectivos.

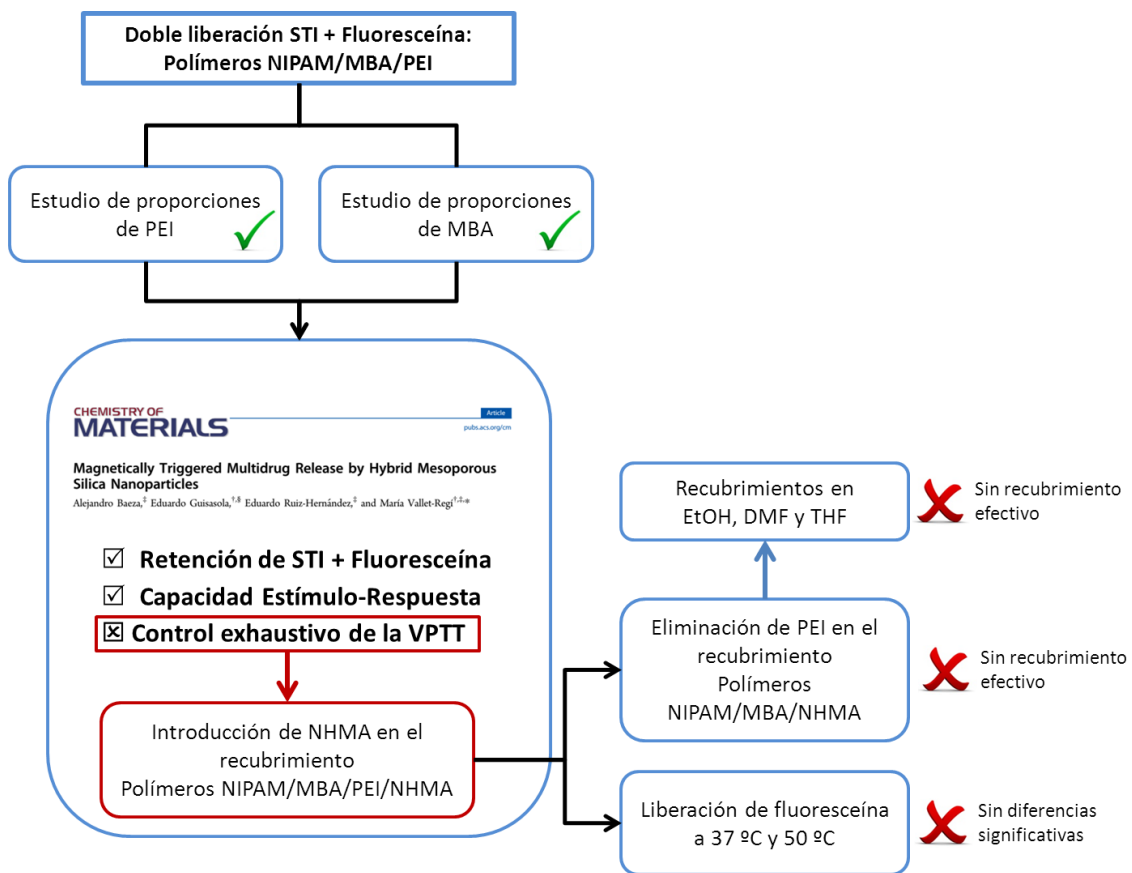


Figura II.11. Esquema de las estrategias llevadas a cabo para lograr un recubrimiento polimérico capaz de retener dos especies terapéuticas distintas con una temperatura de transición en el rango de temperaturas de hipertermia.

II.1.3.2. Determinación de la temperatura de transición y comportamiento estímulo-respuesta de los los nanotransportadores

Con la finalidad de obtener un co-polímero con una LCTS más ajustada al rango de hipertermia (40 – 45 °C), se llevó a cabo la síntesis de una librería de nuevos polímeros lineales con NHMA como monómero hidrofílico. El objetivo de esta síntesis fue determinar la LCST de estos polímeros antes del anclaje a la superficie de las MMSNs. De esta manera, se pretendía conocer la proporción NIPAM/NHMA más adecuada para obtener la transición del polímero a una temperatura dentro del rango de hipertemia. La temperatura de transición fue

determinada mediante espectroscopia UV-Vis. Esta técnica permite observar la transición del polímero de su forma hidrofílica (lineal/espiral) a hidrofóbica (globular) de manera fácil y precisa, ya que por encima de la LCST se produce la precipitación del polímero y por tanto un aumento brusco de la absorbancia. La relación NIPAM/NHMA = 90:10 mostró una temperatura de transición a 42 °C, la cual es adecuada para retener de la carga a temperatura fisiológica y liberarla dentro del rango de temperaturas de hipertermia, por lo que esta relación NIPAM/NHMA sería usada en los sucesivos recubrimientos poliméricos.

Una vez obtenido el co-polímero lineal con la LCST adecuado, se procedió al recubrimiento de las MMSNs. De acuerdo con los datos obtenidos en experimentos anteriores, tanto la presencia de un monómero entrecruzante, como el uso de un asistente a la polimerización son necesarios para obtener un recubrimiento polimérico efectivo. Yang y colaboradores describieron el uso del surfactante dodecilsulfato sódico (SDS) como asistente para la polimerización en la superficie de MSNs.²⁵⁹ Dado que el SDS es de naturaleza aniónica, al igual que la superficie de las MMSNs sintetizadas, se modificó este método sustituyendo el surfactante SDS por CTAB (surfactante catiónico) para facilitar las interacciones superficie-surfactante-monómeros. De esta manera se procedió a la polimerización en la superficie de las MMSNs, con una proporción 90:10 de NIPAM/NHMA, MBA como entrecruzante y CTAB como asistente de la polimerización. Después del proceso de recubrimiento, la caracterización mediante DLS, FT-IR, TEM y SEM mostrada en el artículo 2, reveló la presencia del polímero sobre la superficie de las MMSNs.

Para conocer la capacidad de calentamiento de las nanopartículas en función de su masa (en $W \cdot g^{-1}$) se llevaron a cabo medidas de la tasa de absorción específica (SAR, anexo A.2.1) de los nanotransportadores con recubrimiento polimérico (MMSNP@P(NIPAM/NHMA)) y sus precursores (MMSNP-PEG/MA). El SAR de las muestras se calculó con una concentración de partículas fija de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a cuatro frecuencias distintas. En la tabla II.2 se muestran los valores de SAR de las muestras MMSNP@P(NIPAM/NHMA) así como de su precursor MMSNP-PEG/MA, obtenido mediante la síntesis con OA- Fe_3O_4 descrita anteriormente (apartado II.1.2). Se advirtió un ligero aumento del SAR después del proceso de recubrimiento, probablemente debido a efectos magnéticos cooperativos como consecuencia de una ligera agregación de las nanopartículas. Los resultados ponen de manifiesto que se consigue mayor ΔT a la frecuencia de 838 KHz.

Muestra	[Fe] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	f (KHz), H (G)	SAR (W/g)	Ti (°C)	Tf (°C)	ΔT (10min)
MNP-PEG/MA	38.9	838KHz, 252G	170.9	17.5	25.6	8.1
		717KHz, 300G	135.1	19.4	26.2	6.8
		550KHz, 300G	91.5	19	23.3	4.3
		424KHz, 300G	52.7	19.3	22.2	2.9
MMSNP@P(NIPAM/NHMA)	28.6	838KHz, 252G	178.53	18	25.1	7.1
		717KHz, 300G	162.2	19.6	25.5	5.9
		550KHz, 300G	102.7	20	23.7	3.7
		424KHz, 300G	64.9	19.2	21.9	2.7

Tabla II.3. Medidas SAR. Temperaturas inicial (Ti) y final (Tf) e incrementos de temperatura (ΔT) de las medidas de hipertermia a 10 minutos a diferentes frecuencias e intensidades de campo.

A continuación, se determinó la temperatura de transición mediante la liberación de fluoresceína de las partículas sometidas bajo la acción de un CMA de 838 KHz y 252G. Para ello se procedió al registro del aumento de temperatura desarrollado por el material en función del tiempo bajo dicho campo. Se analizó la concentración de fluoresceína liberada cuando el medio alcanzó 37°C, 40°C y 43°C (figura II.6). Como control, se siguió ese mismo aumento de temperatura de la muestra en una incubadora.

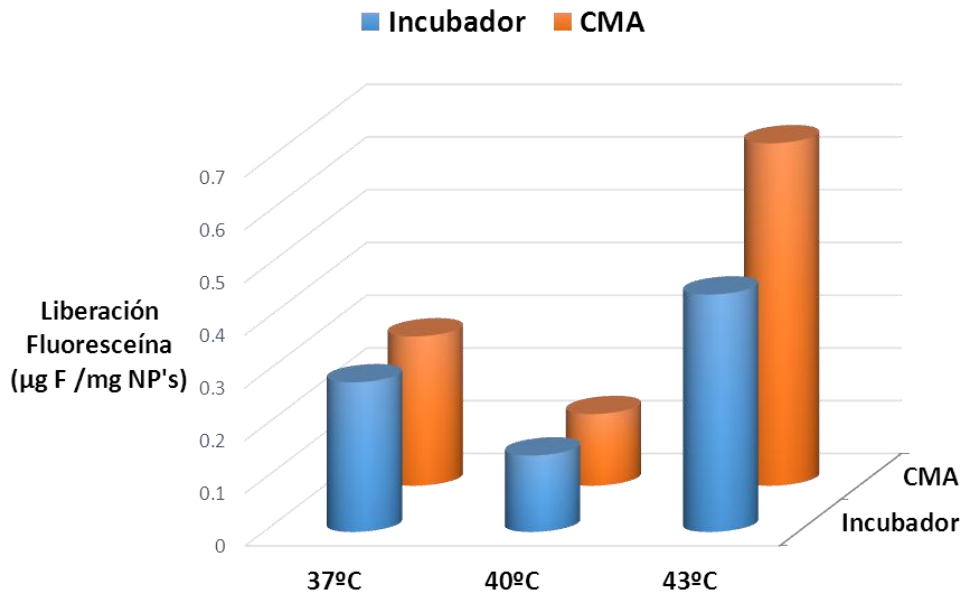


Figura. II.12. Liberación de fluoresceína obtenida hasta alcanzar las temperaturas objetivo, mediante campo magnético a 252 G y 838 KHz (naranja) y por incubación (azul).

Este experimento mostró que la liberación era menor en las muestras llevadas hasta 37°C y 40°C comparado con aquellas que llegaron a los 43°C. A su vez se observó cómo, dentro de las muestras que alcanzaron los 43°C, aquella a la cual se le aplicó campo magnético liberaba 1.4 veces más fluoresceína que su respectivo control a 43 °C. Estos resultados permiten concluir que la transición del recubrimiento polimérico se produce cuando el medio alcanza una temperatura entre los 40°C y los 43°C. Los datos recogidos también indujeron a pensar que sería posible observar el efecto de puntos calientes. Este efecto describe que al aplicar el CMA la temperatura de las nanopartículas a escala local debe ser superior a la recogida por una sonda de temperatura macroscópica.

Por lo tanto, se desarrollaron experimentos para estudiar el comportamiento estímulo-respuesta en condiciones isotérmicas. Los tiempos de aplicación del campo magnético necesarios para alcanzar la temperatura de transición del polímero pueden prolongarse hasta aproximadamente 40 min. En este periodo pueden manifestarse aumentos de temperatura debido al calentamiento del propio medio dispersante (PBS). Con la finalidad de discriminar este efecto y evaluar la respuesta del sistema debida exclusivamente al estímulo magnético, se mantuvo la muestra a temperatura constante (37°C) durante la aplicación del CMA a un tiempo determinado (45 min).

Como control, se llevó a cabo el seguimiento de la liberación de fluoresceína en una incubadora. Se pudo apreciar como después de la aplicación del campo magnético, la muestra libera mayor cantidad del fluoróforo en comparación con la muestra control (figura II.13). Este

hecho confirmó el calentamiento en el seno de las nanopartículas, como consecuencia de las pérdidas magnéticas de las OA-Fe₃O₄ en su interior. Las pérdidas magnéticas ocasionadas por las nanopartículas de magnetita demostraron por tanto, ser capaces de producir suficiente energía calorífica para promover la transición hidrofílico/hidrofóbico de la cobertura polimérica a escala local.

Es importante remarcar el hecho de que la transición de la cobertura polimérica fue efectiva en un sistema sometido a disipación térmica que imita las condiciones de temperatura del torrente sanguíneo. Por lo tanto, este tipo de sistemas serían capaces de superar los inconvenientes propios de la disipación térmica que se produce en el cuerpo humano, pudiendo liberar su carga bajo un CMA para conseguir el efecto terapéutico deseado.

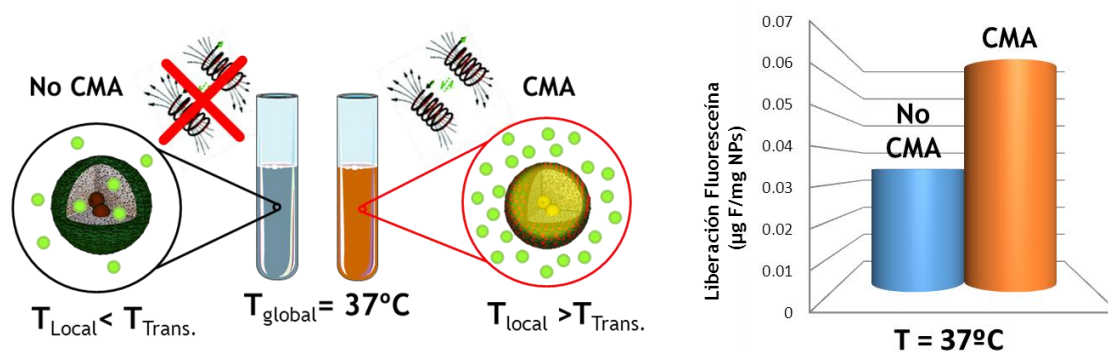


Figura. II.13. Esquema del experimento en condiciones isotermas (izquierda) y liberación de fluoresceína a 37°C mediante campo magnético a 252 G y 838 KHz e incubación (derecha).

II.1.3.3. Estudio de la liberación controlada de fármacos en función de la estructura polimérica termosensible

La estructura del recubrimiento polimérico formado sobre la superficie de las MMSNs juega un papel crucial en el perfil de liberación de las sustancias alojadas en el interior de la matriz de sílice. Como se ha visto anteriormente, la LCST o VPTT de la cobertura polimérica se puede regular para que la transición se produzca a una temperatura dada. El cambio de fase hidrofílico/hidrofóbico del polímero puede activar o desactivar la liberación dependiendo de la ruta de síntesis escogida para la formación del recubrimiento polimérico. En esta tesis doctoral se quiso estudiar el papel que juega la densidad y estructura del recubrimiento polimérico en el control de la liberación de sustancias desde el interior de la matriz mesoporosa (artículo 3). El sistema descrito anteriormente (MMSNP@P(NIPAM/NHMA) en el artículo 2 y MMNP@CPS, *crosslinked polymer shell* en el artículo 3) se seleccionó como material con recubrimiento polimérico entrecruzado y de alta densidad. Para obtener un recubrimiento polimérico de baja densidad y con una estructura de cadenas lineales, se sintetizó una nueva cobertura polimérica termosensible llamada MMNP@HP (*hairy polymer*, artículo 3). Este recubrimiento se realizó mediante un anclaje por co-condensación retardada de p(NIPAM-co-NHMA) sililado a la superficie de las MMSNs. A continuación, se funcionalizó la superficie con grupos MPS y se realizó una polimerización en ausencia de monómeros entrecruzantes (figura II.8).

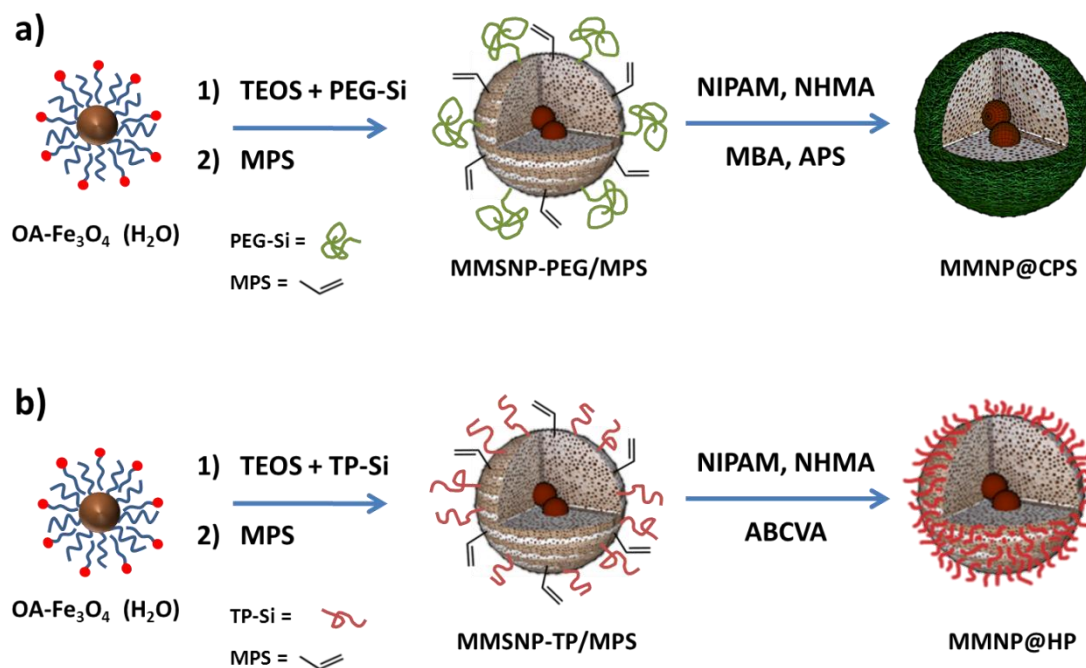


Figura II.14. Rutas de síntesis de MMSNs recubiertas de: una capa polimérica densa entrecruzada (a, MMNP@CPS) y de un polímero termosensible lineal (b, MMNP@HP).

La primera etapa de recubrimiento para obtener MMSN@HP (figura II.14.b) requirió la síntesis de polímeros lineales con capacidad de anclaje a la superficie de las MMSNs. Para ello se obtuvieron tres tipos diferentes de polímeros con grupos Si-OR en su estructura utilizando 4,4'-Azobis(ácido 4-cianoaléxico) (ABCVA) como iniciador radicalico. Este iniciador genera radicales al verse expuesto a altas temperaturas (≈ 70 °C) por la ruptura de su enlace diazo (-N=N-), generando N₂ y dos especies radicalicas que inician la polimerización. Seguidamente, se procedería al anclaje de los distintos polímeros a la superficie de las nanopartículas y estudiar los perfiles de liberación de fluoresceína de los distintos materiales para comprobar su respuesta termosensible.

En una primera aproximación, se sintetizó una serie de polímeros lineales de p(NIPAM-co-NHMA) para después funcionalizarlos con grupos Si(OMe)₃ (figura II.15.a). Esto se llevó a cabo mediante la reacción de los grupos OH primarios del polímero con clorotrimetoxisilano (ClSi(OMe)₃). La eficacia de la reacción se comprobó mediante ¹H-NMR, observando un desplazamiento de parte de la señal del CH₂ unido al oxígeno del polímero. Este hecho probó que la funcionalización era efectiva, sin embargo, los polímeros sililados obtenidos de esta manera resultaron ser insolubles en medio acuoso, lo que impedía su uso en la posterior formación del recubrimiento polimérico sobre las MMSNs. Es posible que la precipitación de este tipo de polímeros en agua se produjera por la policondensación de los grupos Si(OMe)₃ entre cadenas poliméricas. Para evitar estos problemas de homocondensación se siguió la misma ruta de síntesis y funcionalización del polímero anterior. El monómero NHMA se sustituyó por otro monómero hidrofílico, el 2-hidroxipropilmetacrilato (HPMA), el cual posee un grupo hidroxilo secundario (figura II.15.b). Después de llevar a cabo la reacción de p(NIPAM-co-HPMA) con Si(OMe)₃, la señal ¹H-NMR del monómero hidrofílico no cambiaba su desplazamiento químico. Este hecho unido a que el polímero conservaba su LCST

reveló que la reacción de sililación no tuvo lugar, probablemente debido a que su grupo hidroxilo no es suficientemente reactivo frente a $\text{ClSi}(\text{OMe})_3$.

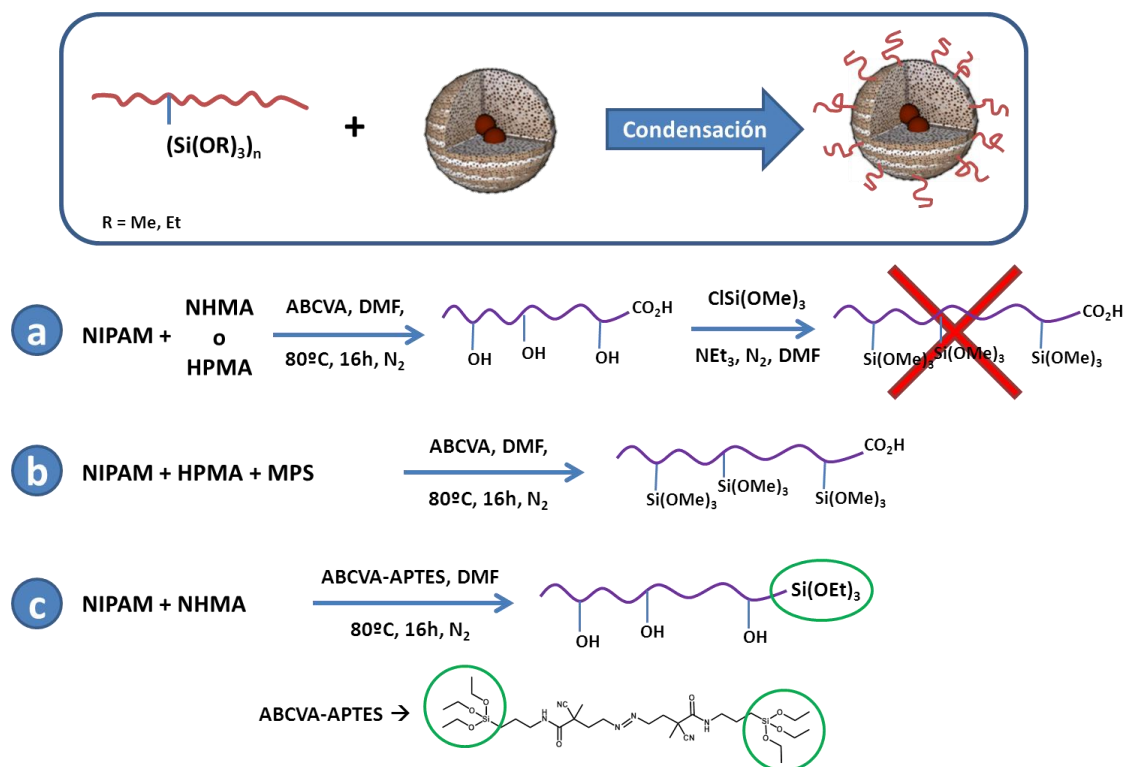


Figura II.15. Esquema general de anclaje de polímeros sililados a la superficie de las MMSNs (arriba). Estrategias de síntesis y/o funcionalización de los mismos: a) Funcionalización con $\text{ClSi}(\text{OMe})_3$, b) Síntesis con monómero sililado y c) funcionalización del iniciador ABCVA con APTES y posterior polimerización.

Ante la imposibilidad de funcionalizar los polímeros termosensibles después de su síntesis, se desarrolló una segunda aproximación la cual consistió en la introducción de MPS como co-monómero en la síntesis del polímero lineal (figura II.15.b). De esta manera se obtendría de manera directa los grupos trimetoxisilano en las cadenas laterales del polímero $\text{p}(\text{NIPAM-co-HPMA-co-MPS})$. La caracterización por $^1\text{H-RMN}$ confirmó la presencia de grupos trimetoxisilano junto con NIPAM y HPMA en la estructura del polímero (figura II.16). A continuación, se procedió al recubrimiento de las nanopartículas mediante la condensación en DMF entre los grupos $\text{Si}(\text{OMe})_3$ del polímero y los grupos SiOH de la superficie de las partículas. A la luz de los datos de TGA, que muestran una pérdida de masa orgánica muy similar a la del material precursor ($\approx 7\%$), la reacción de condensación sobre la superficie de las MMSNs no tuvo lugar. Para favorecer la condensación, se procedió a realizar el anclaje a temperaturas y concentraciones mayores de polímero, lo que llevó a la obtención de grandes agregados e incluso la gelificación.

Dado que las dos aproximaciones anteriores no tuvieron éxito, se diseñó una tercera vía de recubrimiento con polímeros lineales con un solo grupo trietoxisilano como punto de unión del polímero a la superficie de las MMSNs (figura II.15.c). Para ello, se obtuvo primeramente un iniciador radicalico con grupos trietoxisilano mediante la reacción del iniciador ABCVA con APTES. La descomposición térmica del iniciador ABCVA-APTOS genera los radicales que comienzan la reacción de polimerización, por lo tanto los grupos $\text{Si}(\text{OEt})_3$ deberían encontrarse al principio de cada cadena polimérica. Llevando a cabo la

polimerización con este iniciador y diferentes relaciones NIPAM/NHMA, se obtuvieron distribuciones de tamaño centradas en 44 kDa medidas por GPC. La presencia de los grupos trialcoxilano en estos polímeros no se pudo determinar por FT-IR o $^1\text{H-RMN}$ debido a su pequeña proporción respecto al tamaño del polímero. Por tanto se procedió a medir la LCST de los polímeros obtenidos y seleccionar aquel con la temperatura de transición más adecuada. La relación 90:10 NIPAM/NHMA mostró una LCST de 43 °C.

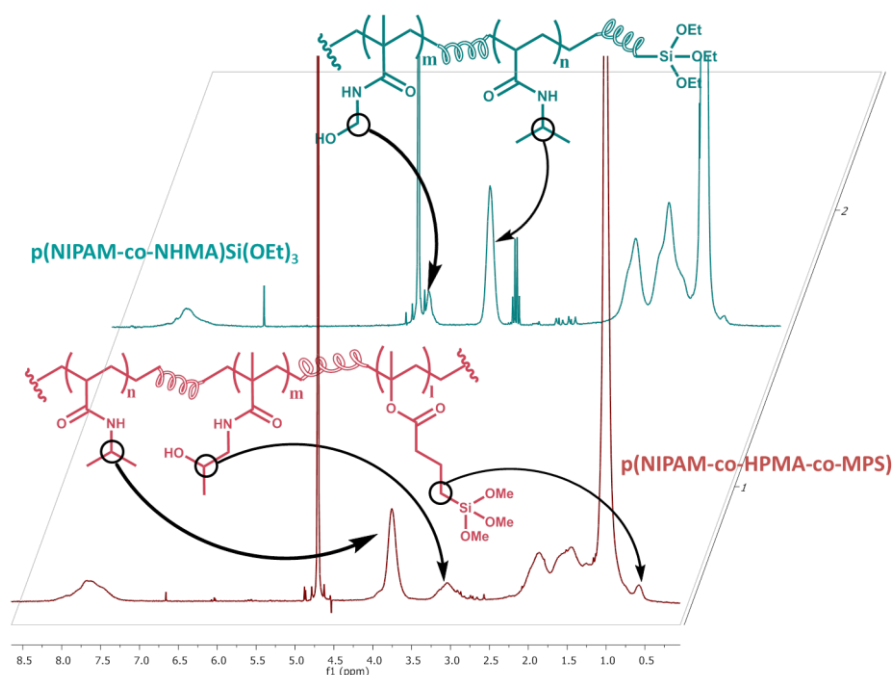


Figura II.16. Espectros de resonancia $^1\text{H-RMN}$ de los polímeros lineales sililados p(NIPAM-co-HPMA-co-MPS) (verde) y p(NIPAM-co-NHMA)Si(OEt) $_3$ (rojo, denominado TP-Si en el artículo 3).

Puesto que la adición de polímeros hidrofílicos en la síntesis de las MMSNs Puede ayudar a su estabilización, este polímero termosensible sililado (TP-Si) se adicionó 15 min después del comienzo de la policondensación de TEOS. Este método de co-condensación retardada dio lugar a MMSNs recubiertas del polímero termosensible (MMSN-TP). Después de la extracción del surfactante, se realizaron los estudios de liberación de fluoresceína. Los datos recogidos no fueron concluyentes, dado que los perfiles de liberación para temperaturas por encima y por debajo de la LCST resultaron ser muy similares. Este hecho sugiere que la densidad del polímero termosensible lineal sobre la superficie de las MMSNs no es suficiente para apreciar diferencias en la liberación de fluoresceína, no observándose el comportamiento estímulo-respuesta buscado. Para aumentar la cantidad de recubrimiento polimérico, se añadieron cantidades crecientes de TP-Si después de la formación de las MMSNs, pero las pérdidas de masa orgánica medidas por TGA para cada muestra después de la extracción del surfactante no fueron mayores del 5 % alcanzado inicialmente.

Con el fin de obtener una mayor densidad de polímeros lineales unidos a la superficie de las MMSNs, se optó por llevar a cabo una segunda polimerización sobre la superficie de las nanopartículas. Primero se realizó la funcionalización de la superficie de MMSN-TP con MPS en tolueno, dando lugar a la muestra MMSN-TP/MPS con grupos metacrilato en superficie (figura II.14.b). A continuación, se realizó una polimerización radicalica en presencia de los monómeros NIPAM y NHMA utilizando ABCVA como iniciador. De esta manera se obtuvo una

muestra (MMSN@HP, artículo 3) con un recubrimiento de densidad adecuada para retener una carga de fluoresceína en el interior de la matriz de sílice cuando se encuentra a una temperatura mayor que la LCST del polímero (figura II.17.b).

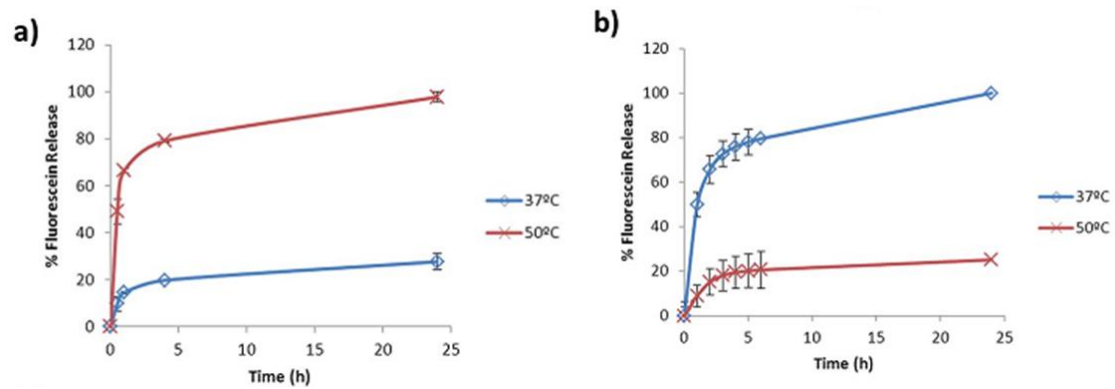


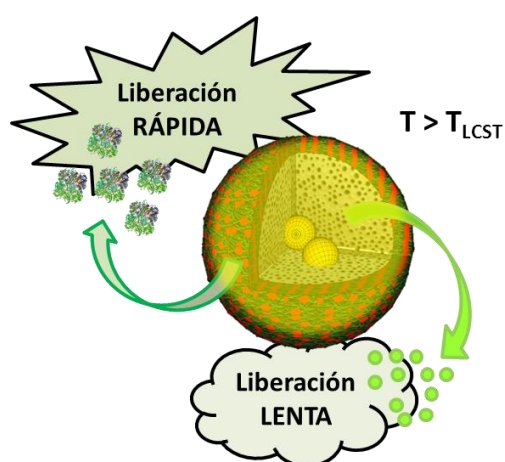
Figura II.17. Cinéticas de liberación de fluoresceína a 37 °C y 50 °C en función del tiempo para la MMSNs recubiertas con polímeros entrecruzados (a) y recubiertas de polímeros lineales (b).

Artículo

1

Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles

[DOI: 10.1021/cm203000u](https://doi.org/10.1021/cm203000u)

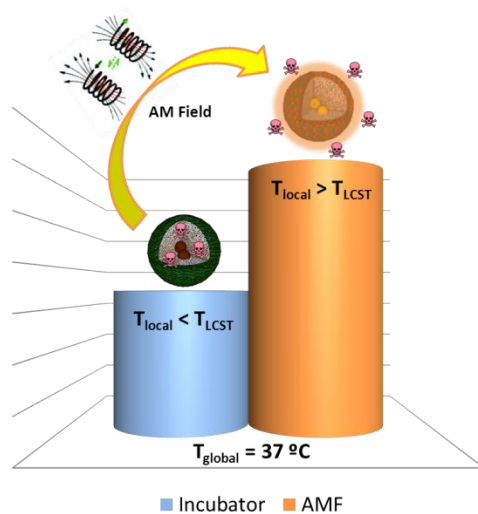


Artículo

2

Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect

[DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03470](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03470)

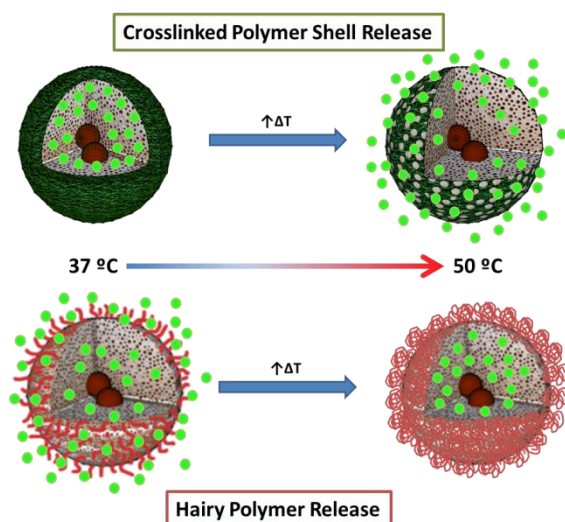


Artículo

3

Design of thermoresponsive polymeric gates with opposite controlled release behaviors

[DOI: 10.1039/C6RA02260J](https://doi.org/10.1039/C6RA02260J)



II.2. Síntesis de nanotransportadores híbridos MSN-cápsula enzimática para la generación de citotóxicos *in situ*

La fabricación de este nanotransportador se llevó a cabo mediante la encapsulación de la enzima HRP en una matriz polimérica y su posterior anclaje a la superficie de MSNs (figura II.18). El recubrimiento de la enzima nativa (HRPn) requirió de un paso previo de funcionalización con grupos acroílo (HRPa) para facilitar que se produzca el recubrimiento polimérico entorno a la estructura de la proteína (HRPc). La composición de la cápsula polimérica se diseñó con un doble objetivo, por un lado proteger a la enzima manteniendo su actividad catalítica y por otro lado, proporcionar grupos funcionales que permitiesen el anclaje a la superficie de las MSNs. Se decoró el interior de los poros de las MSNs con grupos amino con el fin de alojar el profármaco ácido indol-3-acético (IAA). Finalmente, se exploraron diferentes métodos de para la unión covalente entre las cápsulas y las MSNs.

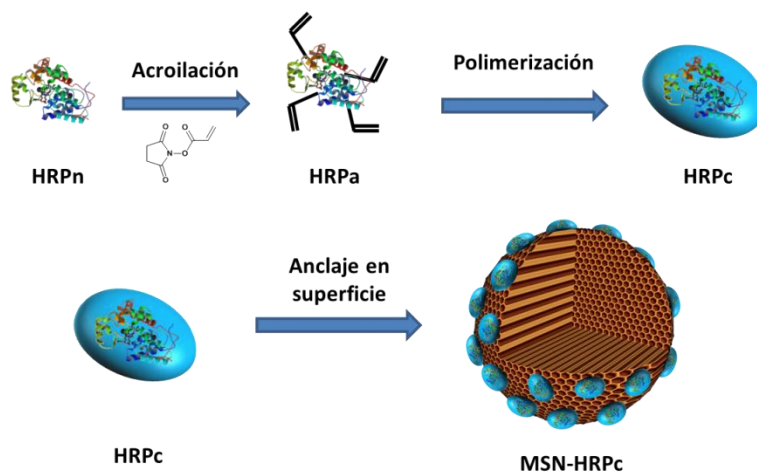


Figura II.18. Ruta sintética general para la obtención de MSN con cápsulas de HRP ancladas en la superficie de las nanopartículas.

La enzima HRP es extraída del rábano picante (*Armoracia rusticana*), donde participa en multitud de procesos como la lignificación, el entrecruzado de las paredes celulares, la formación de suberina y la resistencia a la infección. Esta enzima contiene dos centros metálicos esenciales para conservar la integridad estructural y funcional de la proteína, una fotoporfirina IX de hierro (III) (llamado grupo *hemo*) y dos átomos de calcio. El grupo hemo es el responsable de su acción catalítica sobre sustratos como fenoles aromáticos, ácidos fenólicos, indoles, aminas y sulfonatos.²⁶⁰ Uno de los sustratos de esta enzima más estudiados es el IAA, el cual es la hormona vegetal más común dentro de las auxinas que interviene en el crecimiento y desarrollo de multitud de plantas. El uso de IAA en combinación con HRP para terapia antitumoral fue propuesto por primera vez por Wardman y colaboradores, quienes observaron su citotoxicidad en células tumorales en presencia de HRP.²⁶¹ El mecanismo principal de toxicidad involucra la formación de oxindoles procedentes de la reacción entre el IAA y la HRP, los cuales muestran una alta reactividad frente a nucleófilos como el glutatión y los grupos tiol de las histonas. Los mecanismos de transformación del IAA por la HRP involucran la formación de peróxidos, los cuales inducen la peroxidación de lípidos, que produce una reacción en

favorables entre los monómeros y la propia superficie de la enzima. Así pues, el control de la naturaleza y proporciones de los monómeros permite la obtención de los grupos funcionales y/o la carga superficial requeridos para la cápsula polimérica. El uso de monómeros entrecruzantes con grupos funcionales degradables ofrece además la posibilidad de generar cápsulas sensibles a determinadas condiciones. Una vez acumulada la cápsula en el tejido objetivo, la degradación de la cobertura polimérica permitiría la acción terapéutica de la enzima.^{87,263}

El paso previo de funcionalización con *N*-acriloxisuccinimida dota a la proteína de grupos vinilo polimerizables. Como primera aproximación se sintetizaron cápsulas poliméricas degradables a pH ácido para taponar la entrada de los poros de las MSNs a pH fisiológico, impidiendo la liberación de la carga de IAA. Una vez en la célula tumoral, el descenso a pH ácido provocaría la degradación de la cápsula, facilitando la salida del profármaco. Estas cápsulas sensibles a pH ácido se obtuvieron mediante la inclusión del monómero entrecruzante glicerol dimetacrilato (GMA) en la polimerización, el cual es hidrolizable a pH ácido. Otros monómeros utilizados para conformar la cápsula junto con el GMA fueron la acrilamida (AAm) e hidrocloreuro de 2-aminoetilmetacrilato (AEMA). La AAm tiene una función estructural en la carcasa polimérica, mientras que el AEMA dota a la HRPc de grupos amina para su posterior anclaje sobre las MSNs (figura II.20).

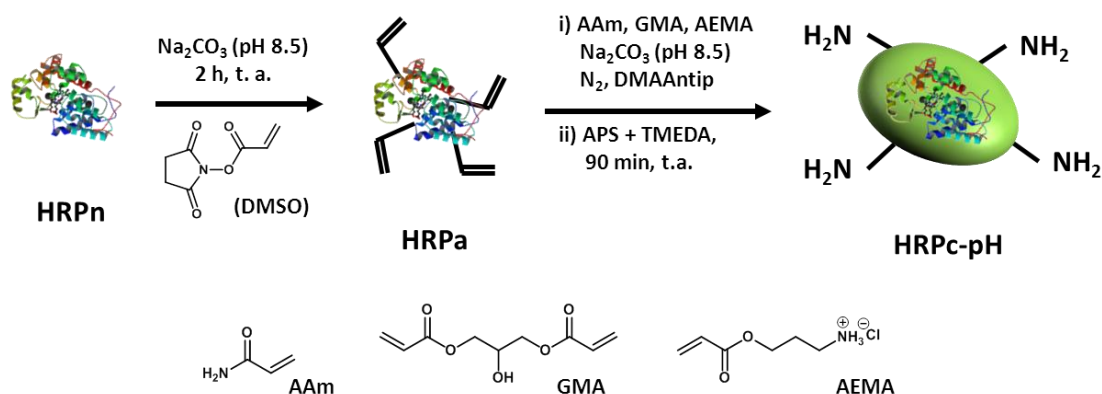


Figura II.20. Esquema de síntesis de las cápsulas poliméricas de HRP degradables a pH ácido (arriba). En la polimerización, el primer paso corresponde a la adsorción de monómeros en la superficie de la enzima (i), para a continuación iniciar la polimerización (ii) mediante la mezcla de los iniciadores radicales persulfato amónico (APS) y tetrametiletildiamina (TMEDA). Estructura de los monómeros utilizados en la formación de la cápsula degradable a pH ácido (abajo).

Tanto el paso de acroilación como en el de recubrimiento, fue necesaria la adición de 4-dimetilaminoantipirina (DMAntip) para prevenir la inactivación de la enzima, impidiendo la reacción de los aminoácidos presentes en su centro activo. El recubrimiento de la enzima dio lugar a un aumento del radio hidrodinámico desde los 4 nm de HRPn a los 7 nm de la HRPc. Las variaciones de potencial ζ permiten seguir las etapas de funcionalización y recubrimiento, ya que la HRPn tiene potencial inicial negativo, el cual disminuyó después de la reacción de acroilación sobre grupos amina de la estructura proteica. La carga superficial de la HRPa cambió a valores de potencial positivos después de la formación de la cápsula polimérica, lo que está de acuerdo con la presencia de los grupos amina introducidos por el monómero AEMA. Este tipo de cápsulas degradables son estables a pH 7.4, mientras que a pH 5.5 la

degradación se produce en un periodo de 3 h por la hidrólisis del GMA. La ruptura de la cápsula se observa mediante la reducción del tamaño de la cápsula hasta el tamaño inicial de la proteína nativa.²⁶²

II.2.2. Estrategias de anclaje de HRPc a la superficie de las MSNs

A continuación, se detallan tres estrategias de anclaje de cápsulas de HRP pH sensibles a la superficie de las MSNs llevadas a cabo en esta tesis doctoral. En las dos primeras rutas sintéticas (rutas 1 y 2, figuras II.21 y II.22 respectivamente), aquellas que implicaron el uso de cápsulas degradables a pH ácido (HRPc-pH), no se observó un anclaje efectivo de las mismas sobre la superficie de las MSNs. Sin embargo, mediante la tercera aproximación (ruta 3, figura II.24) si se obtuvo el nanotransportador con cápsulas enzimáticas no degradables unidas a la superficie de las MSNs. Estas tres estrategias utilizadas requirieron de la modificación de la superficie de las nanopartículas con diferentes grupos funcionales para realizar el anclaje de las cápsulas en su superficie.

La primera aproximación (figura II.21) se llevó a cabo mediante la síntesis de MSNs funcionalizadas con APTES (MSN-NH₂) por co-condensación para después hacer reaccionar los grupos amina con anhídrido succínico, obteniendo así nanopartículas con grupos ácido en la superficie (MSN-CO₂H). Posteriormente, se procedió al anclaje de las HRPc-pH mediante el acoplamiento de las aminas primarias presentes en la cápsula y los grupos carboxílicos de las MSNs. Este paso se realizó mediante la activación previa de los grupos ácido carboxílico con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para luego proceder a la adición de las HRPc-pH (figura II.14).

Acoplamiento por EDC

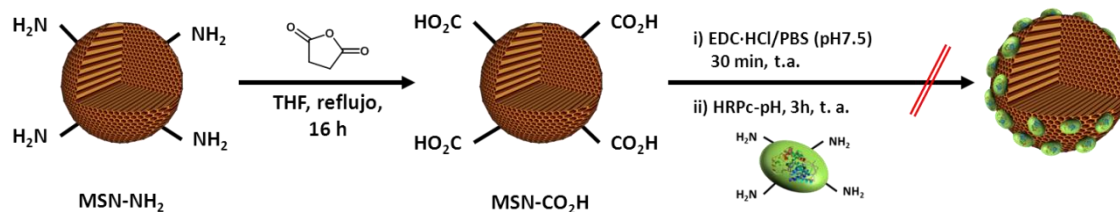


Figura II.21. Ruta 1: Estrategia de anclaje de cápsulas de HRP sensibles a pH ácido sobre la superficie de MSN mediante el acoplamiento de grupos CO₂H y NH₂ activado por EDC.

Después de 3h de incubado a t. a. el sólido se separó y lavó por centrifugado, recogiendo el medio de reacción y las aguas de lavado para determinar la cantidad de proteína presente en estas disoluciones mediante el método con ácido bicinonínico (BCA). Los resultados no mostraron una diferencia apreciable entre la cantidad de proteína añadida al medio de reacción y los sobrenadantes. Las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico (PTA) para su caracterización por TEM, donde no se observaron cápsulas adheridas a la superficie de las MSNs. Estos ensayos indican que la unión de HPRc a la superficie de las MSNs por este método no fue eficaz.

La segunda estrategia de anclaje (figura II.22) consistió en el uso de una reacción tipo *click* para la unión entre MSN y HRPc-pH. Esta metodología implica una reacción de cicloadición 1,3-dipolar de tipo Huisgen entre grupos azida (R-N₃) y alquinos (R-C≡CH)

catalizada por Cu (I). Se seleccionó esta reacción ya que es casi cuantitativa y muy robusta, puesto que puede tener lugar en multitud de condiciones, incluso en medio acuoso. Por ello resulta ser especialmente interesante en la síntesis de dispositivos con biomoléculas. Para llevar a cabo el anclaje entre la cápsula y las MSNs, primero fue necesario dotar a cada elemento de uno de los grupos funcionales que intervienen en la cicloadición. Se decidió funcionalizar la cápsula HRPc-pH con grupos alquino mediante la reacción de ácido 4-pentinoico activado por EDC con los grupos amina de la cápsula. Para funcionalizar las MSNs con grupos azida se sintetizó el compuesto 3-azidopropiltrimetoxisilano (AzPTMS) mediante sustitución nucleófila bimolecular del 3-cloropropiltrimetoxisilano (ClPTMS) con azida sódica (NaN_3) en DMF. A continuación se decoró la superficie de las MSNs (con grupos Si-OH en superficie) mediante post-síntesis con AzPTMS en tolueno. Una vez confirmada la presencia de los grupos funcionales en cada parte, se procedió a su unión mediante la reacción *click*.²⁶⁴ De nuevo no fue posible determinar la cantidad de HRPc-pH anclada a la superficie de las MSNs mediante el método de cuantificación de proteínas con BCA, por lo que no se pudo determinar que las HRPc-pH se encontrasen unidas a las nanopartículas. Por tanto, la caracterización de este material indicó que esta metodología no es válida en estas condiciones para la unión de las cápsulas a la superficie de las partículas.

Reacción Click

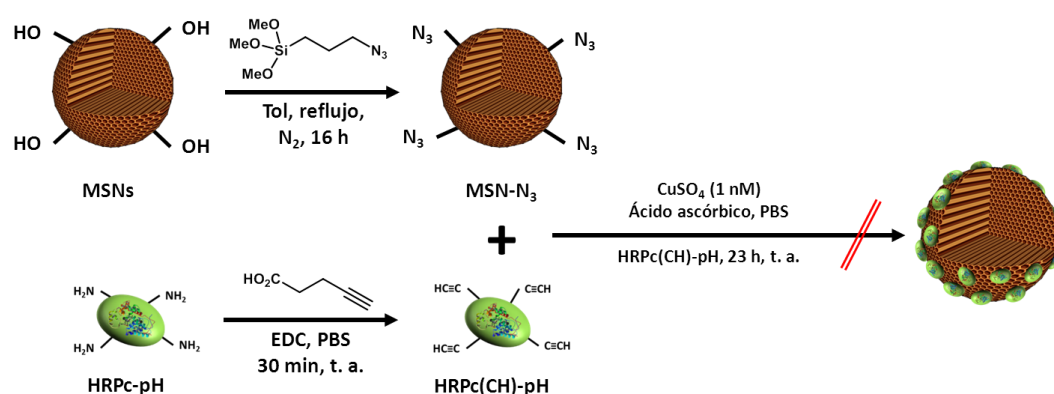


Figura II.22. Ruta 2: Estrategia de anclaje de cápsulas de HRP sensibles a pH ácido sobre la superficie de NSM mediante reacción de tipo click entre grupos azida (R-N_3) y alquinos ($\text{R-C}\equiv\text{CH}$) catalizada por Cu (I).

Mediante TEM no se observaron cápsulas sobre la superficie de las MSNs y el material no mostró actividad enzimática, por lo que se concluyó que el anclaje de las cápsulas en la superficie de las MSNs no tuvo lugar. Probablemente la degradación de las cápsulas poliméricas es demasiado rápida en el medio acuoso del anclaje. Este hecho impediría mantener la integridad de la estructura polimérica al verse expuesta tanto a los medios de reacción de anclaje a las MSNs como a los sucesivos lavados, incluso con disoluciones tamponadas a pH 7 donde las cápsulas se suponen estables.

II.2.3. Síntesis y anclaje de cápsulas enzimáticas no degradables

Teniendo en cuenta la dificultad del anclaje debido a la inestabilidad de las cápsulas sensibles a pH ácido, se decidió explorar la opción de recubrir la HRP con un polímero no

degradable y permeable al IAA. El objetivo de esta tercera estrategia (ruta 3) era que las cápsulas permanecieran intactas durante los pasos de anclaje a las MSNs y los lavados posteriores. Para la obtención de cápsulas no degradables se siguió el mismo procedimiento substituyendo el monómero entrecruzante pH sensible por otro que no sufre degradación por cambios en el pH, la *N,N*-metilenbis(acrilamida) (MBA, figura II.23).

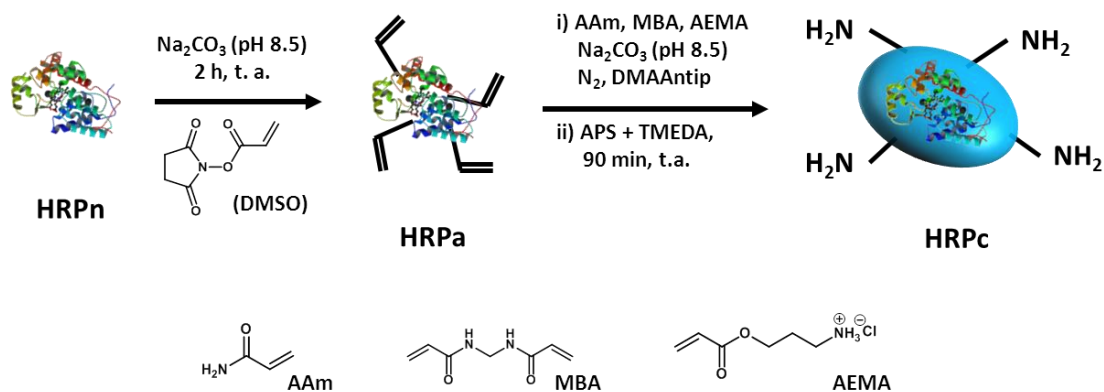


Figura II.23. Esquema de síntesis de las cápsulas poliméricas de HRP no degradables (arriba). La ruta de síntesis de estas cápsulas es paralela al proceso de encapsulación anterior. En este caso se substituyó el monómero degradable GMA por el MBA no degradable. Estructura de los monómeros utilizados en la formación de la cápsula no degradable (abajo).

El anclaje a las MSNs se realizó mediante la reacción entre los grupos amina de la cápsula polimérica y los presentes en la superficie de las nanopartículas, mediante la reacción con éster de bis (*N*-hidroxisuccinimida) del ácido subérico (SA-(NHS)₂) (ruta 3, figura II.24).



Figura II.24. Esquema de anclaje de HRPc no degradables a la superficie de MSN30N-IAA (ruta 3).

Una característica clave de la reacción entre la HRP y el IAA es que no requiere la presencia de peróxido de hidrógeno para tener lugar, hecho que no ocurre con muchas otras peroxidasa.²⁶¹ En lugar de H_2O_2 , la HRP puede utilizar oxígeno para la transformación del IAA, dando lugar al subproducto mayoritario indol-3-carbinol, aunque la presencia de oxígeno atmosférico también es capaz de realizar la oxidación del profármaco. Esto se observó por HPLC en los estudios de liberación de IAA desde las MSNs funcionalizadas con grupos amina (MSN30N). A tiempos de liberación largos en presencia de oxígeno atmosférico se observó la aparición de un segundo compuesto con un tiempo de retención coincidente con el

indol-3-carbinol. Este hecho señaló la necesidad de llevar a cabo el anclaje de las MSNs cargadas con IAA bajo atmósfera inerte, para evitar la transformación prematura del profármaco.

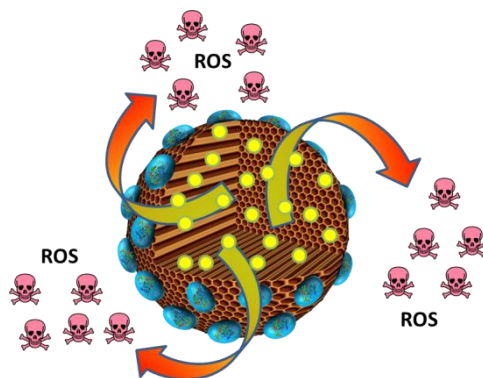
La tinción del dispositivo resultante con ácido fosfotúngstico (PTA) puso de manifiesto un anclaje efectivo de las HRPc a la superficie de las nanopartículas, así como el cambio en el potencial ζ , como se puede apreciar en el artículo 4 de esta tesis doctoral. En este artículo también se recogen los estudios celulares de citotoxicidad y absorción celular, mostrando baja toxicidad tanto para HRPc y MSN30N-IAA a diferentes concentraciones, una muerte celular alta con el sistema completo (MSN30N-IAA-HRPc) y una internalización clara del nanotransportador final por microscopía confocal.

Artículo

4

*Hybrid Enzyme-Polymeric
Capsules/Mesoporous Silica
Nanodevice for In Situ Cytotoxic
Agent Generation*

[DOI: 10.1002/adfm.201400729](https://doi.org/10.1002/adfm.201400729)



II.3. Síntesis de cápsulas de polidopamina como nanotransportadores para ACF

La formación de cápsulas de polidopamina se realizó mediante la polimerización de dopamina (DA) sobre la superficie de MSNs y MMSNs y posterior eliminación de la matriz de sílice mediante su dispersión en PBS. La polimerización de catecoles se realiza por la auto-oxidación de los grupos catecol en medio básico en presencia de aire. En esta polimerización el amoníaco actúa como nucleófilo sobre las *o*-quinonas formadas, acelerando la oxidación entre anillos de catecol y por tanto el entrecruzado entre los mismos, dando lugar a la PDA. La completa elucidación de la estructura de la PDA es difícil debido a la variedad de reacciones que pueden tener lugar simultáneamente, como adiciones de Michael, formación de bases de Schiff o reacciones radicálicas, entre otras. Aun así, la estructura de la PDA sintetizada por este método guarda grandes similitudes con estructuras naturales como las melaninas o la polidopamina responsable de la adhesión de los mejillones a diferentes superficies.^{265,266}

La síntesis de las MMSNs y MSNs se realizó por los métodos ya descritos en los apartados II.1 y II.2, que implica la hidrólisis básica de TEOS como precursor de sílice en presencia de CTAB como agente director de estructura (y las SPION como puntos de nucleación en el caso de las MMSNs). La caracterización mediante TEM, DLS y porosimetría de absorción de N₂, confirmó que las características de ambos tipos de nanopartículas son adecuadas para su posterior recubrimiento, como la morfología cuasi-esférica, volumen y superficie específica altos, y potenciales ζ negativos.

Para llevar a cabo un recubrimiento efectivo se realizaron pequeñas variaciones del método desarrollado por D. Ruiz-Molina *et al.* para la síntesis de nanopartículas de PDA.²⁶⁷ En una primera aproximación se trató de dotar a la cápsula polimérica de respuesta a pH ácido. Para ello se llevó a cabo la polimerización de un bis-catecol con un enlace imina (bisCat-Im) en su estructura, el cual es degradable en medio ácido (figura II.25). Las condiciones de reacción para obtener recubrimientos eficaces y reproducibles, se alcanzaron llevando a cabo la reacción de bisCat-Im en presencia de ⁱPrOH/NH₃ (25 %) a 45 °C durante 3 h.

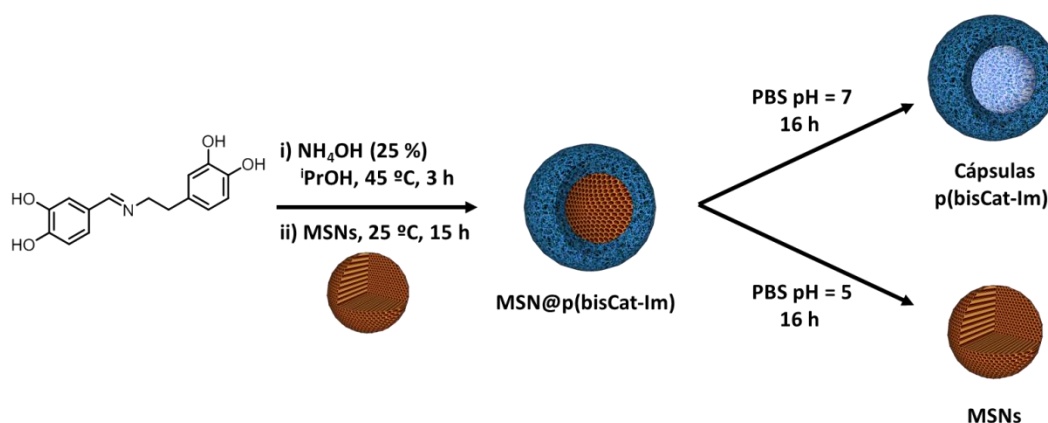


Figura II.25. Esquema del recubrimiento de MSNs con polímeros de bisCat-Im. La exposición del intermedio MSN@p(bisCat-Im) a pH 7 da lugar a la obtención de cápsulas de p(bisCat-Im). Mientras que la exposición del mismo a pH 5, resulta en la disolución del polímero y por tanto la obtención de las MSNs precursoras.

Cuando la disolución adquirió color pardo oscuro, indicativo de que la polimerización de los catecoles está teniendo lugar, se disminuyó la temperatura hasta los 25°C, momento en el que se añadieron las MMSNs/MSNs y se mantuvieron bajo agitación durante 15 horas adicionales.

La caracterización de la muestra por STEM mostró la presencia de un recubrimiento polimérico sobre la superficie de las MSNs. Mediante la realización de un perfil de composición por EDX a lo largo de una línea recta sobre una de las esferas, se advirtió la presencia de dos zonas de unos 40 nm de espesor con alto contenido en carbono al principio y al final de la línea trazada que pertenecerían al recubrimiento polimérico. En la zona central de la trayectoria se observa un aumento de la cantidad de silicio correspondiente a la matriz de sílice (figura II.26). Al poner en contacto este material con PBS (pH = 7) para su lavado, se observó mediante TEM una completa disolución del núcleo de sílice en 16 h (figura II.26.d). Sin embargo, al exponer este mismo material a PBS pH = 5 la matriz de sílice se ve inalterada y se observa una degradación parcial de la cobertura polimérica (figura II.26.c). Experimentos adicionales por $^1\text{H-NMR}$ sometiendo el reactivo bisCat-Im a las condiciones de reacción ($^1\text{PrOH/NH}_3$ (25 %)) revelaron la degradación del reactivo en DA y 3,4-dihidroxibenzaldehído. Estos datos revelan que los procesos de formación del recubrimiento polimérico y degradación de bisCat-Im pueden concurrir en el medio de reacción, siendo el pH del tratamiento posterior el responsable de la obtención de las cápsulas (pH = 7) o bien las MSNs utilizadas como plantilla (pH = 5).

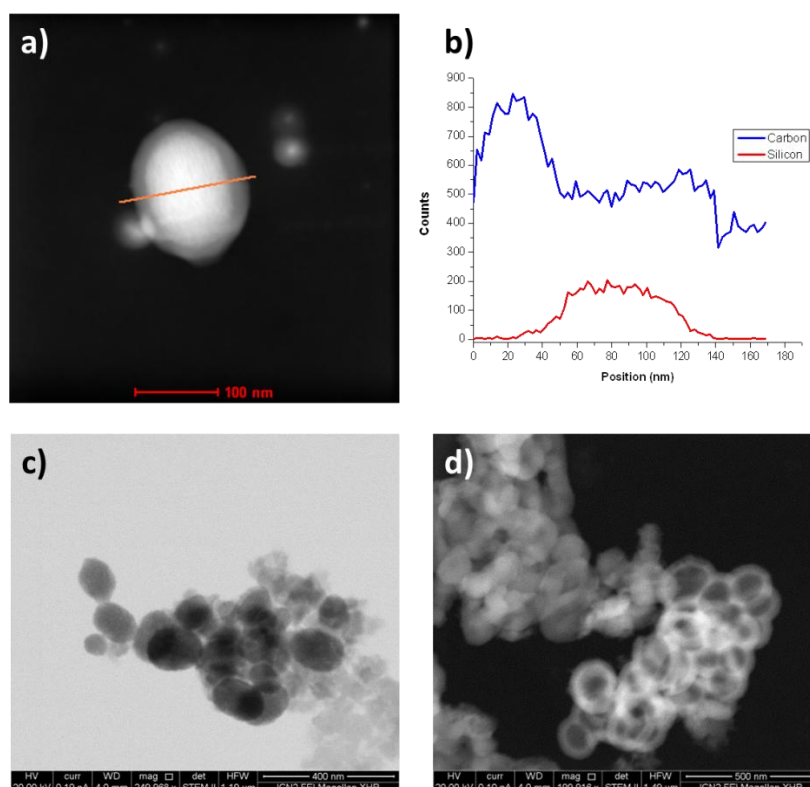


Figura II.26. Imagen STEM de las MSNs recubiertas con el polímero de bisCat-Im y trayectoria del análisis por EDX (naranja) (a), perfil de composición en Si y C de las MSNs recubiertas mediante por EDX (b), MSNs@p(bisCat-Im) después de la exposición a PBS (pH 5) durante 15 h (c) e imágenes STEM de las cápsulas de p(bisCat-Im) después de su exposición a PBS (pH 7) durante 15 h (d).

La sílice policondensada es un compuesto muy estable en medio acuoso y, en general, su disolución requiere del tratamiento con agentes agresivos como el HF o periodos largos de diálisis para la completa eliminación de la red de sílice. Con el ánimo de conocer los factores implicados en la rápida disolución de la sílice mediante este método, se realizó un nuevo recubrimiento de las MSNs con dopamina. La formación del recubrimiento polimérico de PDA en i PrOH/NH₃ (25 %) se confirmó por TEM. Al exponer estas nanopartículas híbridas (MSN@PDA) a soluciones acuosas a diferentes pH se observó la completa disolución de la sílice en 48 h y la formación de las cápsulas de PDA en todos los casos (artículo 5).

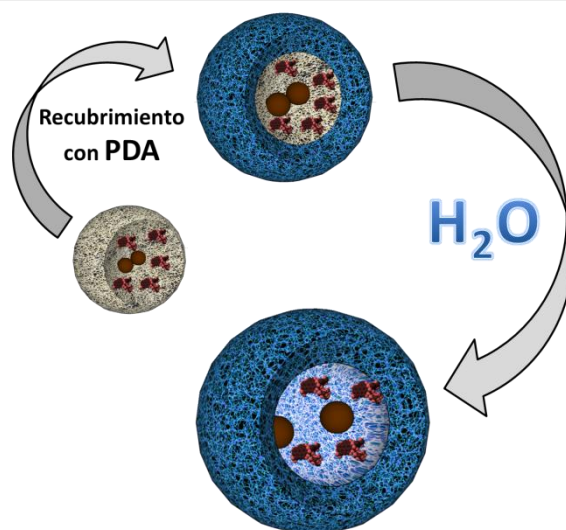
Se planteó la hipótesis de que el proceso de eliminación de la red de sílice porosa podría deberse a dos mecanismos distintos; la formación de complejos de tipo $[\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)_3]$ entre el silicio y los grupos catecol, y el de incremento de la tasa de disolución de la sílice que pueden inducir los grupos poliaminados. Para esclarecer este fenómeno, se repitió el proceso de recubrimiento con un derivado del ácido guayarático (GA), el cual carece de grupos amina. La reacción de este nuevo catecol en amoníaco en presencia de las MSNs, resultó en la formación del recubrimiento polimérico como en el caso anterior. Después de la incubación de este material en PBS o agua durante 48 h, se observó por TEM la presencia de MSNs sin recubrimiento polimérico, lo que sugiere que el proceso que ha tenido lugar es la degradación del polímero soportado sobre las nanopartículas. Este hecho indica que el proceso de disolución de plantilla de MSNs se debe solamente a la acción de los grupos amina/poliamina de la PDA con la matriz de sílice. Los experimentos adicionales se encuentran descritos en el artículo 5 de esta tesis doctoral.

La obtención de cápsulas poliméricas o bien de las MSNs precursoras, parece tener una relación directa con la cantidad de DA presente en el momento de la polimerización. Esta suposición se planteó debido a los siguientes hechos. Los recubrimientos con PDA conducen a la eliminación de la matriz de sílice a cualquier pH. De manera opuesta, al realizar los recubrimientos con GA (carente de grupos amina) se produce la eliminación de la cobertura polimérica, obteniendo las MSNs usadas como plantilla independientemente del pH utilizado. Sin embargo, en el caso de utilizar bisCat-Im para el recubrimiento, la formación de cápsulas o la obtención de las plantillas es dependiente del pH utilizado, como se expuso anteriormente. En este último caso, la degradación de bisCat-Im produce cierta cantidad de DA en el seno de la reacción. Por lo tanto, la dopamina presente podría generar una cantidad suficiente de poliaminas que producirían la disolución de la sílice mesoporosa a pH = 7. La razón por la cual se produce la degradación de la cobertura polimérica a pH = 5 todavía es poco clara. Una posibilidad es que a pH más ácido exista un mayor número de grupos amina cargados positivamente ($\text{R-N}^+\text{H}_3$), y que por ello el proceso de disolución de la sílice se vea retardado frente al de degradación del polímero.

Artículo

5

*Green Synthesis of
Polydopamine-Like Nanocapsules
via Water-triggered removal of a
Sacrificial Mesoporous Silica
Template*



Capítulo

III

Conclusiones

Si quieres tener buenas ideas,
tienes que tener muchas ideas.
La mayoría de ellas serán erróneas,
y solo tienes que aprender cuáles desechar

Linus Pauling

III. Conclusiones

En la presente tesis doctoral se ha planteado como objetivo principal el diseño y desarrollo de nanotransportadores, basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) para su aplicación en terapia antitumoral. Las MSNs presentan altas superficies específicas y facilidad de funcionalización, por lo que pueden ser aprovechadas para el diseño de nanodispositivos para administración controlada de fármacos. Este objetivo se ha abordado mediante tres aproximaciones diferentes: **A)** la utilización de campos magnéticos alternos como disparadores de la liberación, **B)** la generación *in situ* de especies citotóxicas mediante profármacos, y **C)** encapsulación de agentes terapéuticos en nanotransportadores de naturaleza blanda.

Conclusiones específicas de la aproximación A:

A.1) Se han desarrollado nanodispositivos estímulo-respuesta con capacidad de liberar una carga retenida en los poros mediante la aplicación de campos magnéticos. Estos nanodispositivos se han diseñado para contener nanopartículas magnéticas en el interior de una matriz mesoporosa y un recubrimiento polimérico termosensible sobre la superficie, que impide la liberación prematura de la carga contenida.

A.2) Bajo la aplicación de un campo magnético alterno, las nanopartículas magnéticas alojadas en el interior del transportador incrementan la temperatura del nanodispositivo, provocando la transición hidrofílico/hidrofóbico del recubrimiento polimérico termosensible. Esta transición es reversible y por tanto facilita la liberación o retención de la carga a voluntad.

A.3) Las nanopartículas magnéticas manifiestan el efecto de “puntos calientes” o *hot spots*. La temperatura generada por las nanopartículas magnéticas a escala nanométrica induce la apertura del recubrimiento polimérico, sin que se observe un aumento de temperatura del medio en el que se encuentra el nanotransportador.

A.4) El funcionamiento del dispositivo es modulable a través del control de la composición y estructura del recubrimiento polimérico. Los recubrimientos de baja densidad impiden la liberación de la carga a temperaturas superiores a la temperatura de transición del polímero. Por el contrario, los recubrimientos densos se comportan de manera opuesta: a temperaturas inferiores a la temperatura de transición (como los 37 °C de temperatura fisiológica) la carga queda retenida, y solo al alcanzar temperaturas del rango de hipertermia (40 – 45 °C) la carga se libera al medio.

A.5) Mediante la modificación de la composición química del recubrimiento se ha implementado la capacidad estímulo-respuesta del polímero. De esta manera se ha controlado la cinética de liberación de dos sustancias diferentes cargadas en el mismo nanotransportador.

A.6) El comportamiento estímulo-respuesta de los nanovehículos desarrollados los convierte en excelentes candidatos para la ejecución de ensayos preclínicos en modelos animales. En la actualidad se están realizando estudios de internalización y citotoxicidad *in vitro* con estos nanotransportadores funcionalizados con un agente de vectorización activa

hacia células de neuroblastoma humano. Posteriormente, se evaluará la eficacia en terapia antitumoral mediante tratamientos con nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratones que desarrollan neuroblastoma.

Conclusiones específicas de la aproximación B:

B.1) Se ha desarrollado un nuevo nanotransportador para la generación de agentes citotóxicos *in situ*. Este nanovehículo se ha diseñado para alojar un profármaco inocuo en el interior de nanopartículas de sílice mesoporosa, y la enzima responsable de su activación sobre la superficie.

B.2) La actividad enzimática de la proteína nativa no se ve afectada por su inclusión en una cápsula polimérica. Esta cápsula protege a la enzima de la desnaturalización y permite su anclaje efectivo a la superficie de las nanopartículas.

B.3) Este nanotransportador es internalizado por las células tumorales y produce muerte celular. Este hecho indica que el profármaco liberado de la matriz mesoporosa es activado por la enzima, generando compuestos citotóxicos en el medio intracelular que destruyen las células cancerosas.

Conclusiones específicas de la aproximación C:

C.1) Se ha desarrollado un nuevo método de obtención de cápsulas de polidopamina con distintos agentes terapéuticos encapsulados. El procedimiento, basado en la utilización de nanopartículas de sílice mesoporosa como plantilla, permite la inclusión de agentes terapéuticos gracias a la ausencia de compuestos químicos agresivos comúnmente utilizados en la disolución del molde de sílice.

C.2) La carga antitumoral de las nanocápsulas se libera de manera dependiente del pH del medio en el que se encuentren. La naturaleza zwitteriónica de la cápsula de polidopamina y la carga electrostática del compuesto alojado en su interior, regulan la cinética de liberación de este dispositivo.

C.3) Este nanotransportador es apto para inducir muerte celular en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, la doxorubicina del interior de las cápsulas es capaz de difundir al citosol de la célula a través de la corteza de polidopamina provocando toxicidad.

Anexo A. Técnicas de caracterización

A.1. Caracterización estructural

A.1.1. Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de difracción de rayos X a alto ángulo fue empleada para el estudio estructural de las nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas. Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética cuyo espectro de longitudes de onda se sitúa en el rango de 1–100 Å. La difracción de rayos X se produce cuando un haz de energía con una longitud de onda del mismo orden de magnitud que la distancia interplanar de los átomos (del orden de unos pocos Å) interacciona con estructuras cristalinas generando así una dispersión elástica de ondas que están en fase e interaccionan de forma constructiva. La difracción sólo se da en determinados ángulos de acuerdo con la Ley de Bragg ($n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta$). La posición de los máximos de difracción correspondientes a cada familia de planos (hkl) permite conocer la estructura cristalina de las muestras. En esta tesis doctoral se ha utilizado para la identificación de las fases correspondientes de óxidos de hierro γ -Fe₂O₃ y Fe₃O₄, así como la ausencia de α -Fe₂O₃. También se empleó para la determinación del tamaño de cristal (o dominio coherente de difracción) de las SPION mediante la ecuación de Debye-Scherrer y compararlo con otras técnicas como TEM, SEM o DLS.

La misma técnica, aplicada a bajos ángulos de incidencia (difracción de rayos X a bajo ángulo, SAXRD) se emplea en la caracterización estructural de materiales con grandes distancias interplanares (del orden de decenas de Å). La muestra se expone a un haz de RX monocromático y a partir de la difracción a muy bajo ángulo ($2\theta = 0.6^\circ - 10^\circ$) es posible obtener información sobre la estructura de los materiales. En el caso de los materiales mesoporosos ordenados de sílice, el material es amorfo a escala atómica, sin embargo su mesoestructura porosa produce reflexiones que dan lugar a máximos de difracción a bajo ángulo cuando los poros están ordenados.

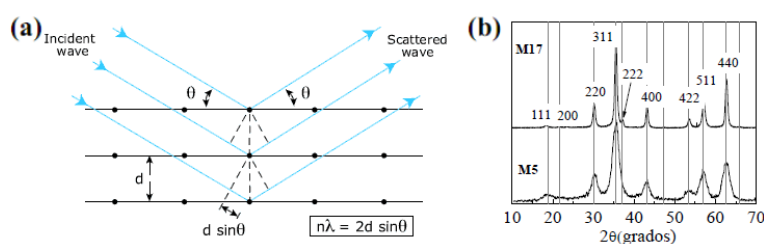


Figura A.1. A) Esquema de la Ley de Bragg. B) Difractogramas de RX, las líneas corresponden a los máximos de difracción de Fe₃O₄.

A.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Esta técnica permite obtener imágenes a escala atómica de los materiales. Es especialmente útil para visualizar la estructura y la distribución de tamaño de nanopartículas, además de su forma. La microscopía de transmisión electrónica se basa en la interacción que se produce cuando un haz de electrones de elevada energía obtenido mediante lentes

magnéticas se hace incidir sobre la muestra y pasa a través de ella. Se obtiene una imagen que contiene información estructural y morfológica. Esta técnica hace uso de las propiedades ondulatorias de los electrones para obtener las imágenes y los diagramas de difracción. Permite, obtener imágenes de defectos planares, contraste de fases e imágenes con resolución atómica (Microscopía electrónica de alta resolución, HRTEM). La imagen está asociada a la intensidad del haz de electrones que son transmitidos a través de la muestra, por lo que el espesor de la muestra debe ser lo suficientemente pequeño para permitir el paso de los electrones. Por otro lado, el contraste electrónico está asociado a los mecanismos de interacción de los electrones con el material de la muestra.

En el estudio de materiales mesoporosos es una herramienta que permite analizar el tamaño de las nanopartículas, su morfología, la presencia y el tamaño de los poros e incluso la presencia de moléculas pequeñas en el interior de los mismos.



Figura A.2. Microscopio de electrónico de transmisión (TEM) JEM ARM200cF con aberración corregida en la lente condensadora.

A.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando un haz de electrones. Aporta información sobre la superficie de las nanopartículas, así como su tamaño y forma. Poseen una gran profundidad de campo, que permite enfocar a la vez gran parte de la muestra. La preparación de las muestras requiere el recubrimiento de la muestra con un metal (generalmente oro) si la muestra no es conductora, aunque puede no ser necesario si se trabaja a voltajes muy bajos (0.5 kV). La técnica consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra opaca a los electrones, realizando un barrido de la misma en una trayectoria de líneas paralelas. Los electrones secundarios y retrodispersados son recogidos por un detector para formar la imagen final. También es posible adquirir una señal de rayos X producida por la muestra para hacer un análisis espectrográfico de la composición de la muestra. En esta tesis doctoral ha sido empleado para la caracterización de la morfología y el tamaño de las MSNs.

A.1.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR)

Esta técnica es muy utilizada en la elucidación de estructuras moleculares, en estudios cinéticos y termodinámicos, incluso con fines cuantitativos. La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico que se basa en la interacción de los momentos magnéticos de los núcleos atómicos con un campo magnético externo. Los núcleos con momento magnético distinto de cero absorben la radiación electromagnética en el rango de la radiofrecuencia. La frecuencia a la que tiene lugar la absorción depende del entorno químico (o apantallamiento electrónico) de los núcleos irradiados, con lo que es posible determinar la estructura de las moléculas dependiendo del desplazamiento químico al que aparecen las señales. Los núcleos más utilizados en esta espectroscopia son el ^1H (el más abundante en la naturaleza) y ^{13}C , poco abundante en la naturaleza, lo que conlleva mayores tiempos de adquisición de señal. En esta tesis doctoral, esta técnica ha sido muy útil en la caracterización de polímeros lineales, puesto que permite conocer la cantidad relativa entre monómeros incluidos en la estructura de copolímeros comparando la relación de señales características de los monómeros que los componen.

A.1.5. Porosimetría de adsorción de nitrógeno

La adsorción física de nitrógeno es una técnica que permite el análisis de las propiedades texturales de los sólidos. Esta técnica está basada en la interacción que tiene lugar entre el nitrógeno gas (adsorbato) y el sólido que se quiere caracterizar (adsorbente). Permite conocer las características del sólido en términos de superficie específica, volumen y tamaño de poro, los cuales son factores fundamentales en la capacidad para alojar fármacos en el interior de la estructura. Cuanto mayor es el área específica mayor capacidad tiene un sólido para retener agentes terapéuticos. De este análisis se obtiene una curva de isoterma de adsorción-desorción, la cual relaciona el volumen de gas retenido por la superficie del sólido en función de las condiciones de presión. Las isotermas se interpretan mediante diferentes modelos matemáticos que permiten obtener los valores de las propiedades texturales. Uno de los más usados para determinar el área específica de los sólidos es el método B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller). El método más usado para conocer los parámetros de distribución de tamaños de poro es el de Barret-Joyner-Halenda (BJH) que permite obtener estas medidas en el rango de los mesoporos (2-50 nm). Existen seis tipos de isotermas de adsorción clasificadas por la IUPAC, siendo la de tipo IV la característica de sólidos mesoporosos. La isoterma de adsorción de tipo IV, presenta un incremento importante de la cantidad de nitrógeno adsorbida a presiones relativas intermedias, que ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas. En esta tesis doctoral, ha permitido confirmar la capacidad de carga de fármacos de los nanotransportadores, así como la existencia de poros y su distribución de tamaños.

A.1.6. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Esta técnica es utilizada en la detección de moléculas en un amplio rango de masas moleculares. Permite detectar desde péptidos, azúcares y lípidos, hasta macromoléculas como polímeros, dendrímeros o proteínas. Se basa en la ionización mediante un láser pulsado de

sustancias embebidas en una matriz (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*). La energía del láser es absorbida por la matriz, lo que provoca tanto la transferencia de H^+ al analito como la desorción de los iones de la fase sólida a la gaseosa. Las especies cargadas “vuelan” por un tubo al que se encuentra acoplado el detector (TOF, *Time of Flight*), que recoge el tiempo de vuelo de las especies y permite identificarlas. En la presente tesis doctoral esta técnica se utilizó para demostrar la funcionalización de la enzima HRP, detectando el cambio en su masa molecular debido a los grupos acroilo anclados, permitiendo incluso calcular su número de manera aproximada (artículo 4).

A.2. Caracterización magnética

A.2.1. Medidas de tasa de absorción específica (SAR, *Specific Absorption Rate*)

Para conocer la capacidad de los materiales para generar calor bajo la aplicación de un campo magnético alterno se usaron dos tipos de inductores de campo, uno comercial capaz de trabajar a diferentes frecuencias y amplitudes de campo (DM100 series, nanoScale Biomagnetics) perteneciente al Grupo de Nanotecnología y Apoptosis (NAP) del Instituto de Nanociencia de Aragón, y otro construido por Fives Celes, capaz de trabajar a frecuencia (100kHz) y amplitud (200 Oe) fijas. En estos equipos el campo magnético es generado mediante una bobina de inducción con refrigeración interna y el aumento de temperatura de la muestra es monitorizado mediante una sonda de fibra óptica que no interfiere en la aplicación del campo. De esta manera, se calcula la capacidad de calentamiento de las nanopartículas en función de su masa (en $W \cdot g^{-1}$) que puede determinar su posible aplicación en hipertermia magnética.

A.2.2. Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Mediante el VSM se realizó la caracterización magnética de las partículas a temperatura ambiente. Conocer las propiedades magnéticas de los materiales permite su clasificación en función de su respuesta magnética, es decir, si son diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos o superparamagnéticos. El principio de funcionamiento de esta técnica es la Ley de Inducción de Faraday, donde un campo magnético variable produce un campo eléctrico que puede ser medido y así obtener información acerca de las propiedades magnéticas de la muestra. Para ello la muestra es sometida a una oscilación armónica únicamente en el eje vertical, perpendicular al campo magnético generado por un electroimán que por tanto magnetiza la muestra. El movimiento de la muestra dentro del campo magnético genera un voltaje inducido en unas bobinas de detección a ambos lados de la misma. Ese voltaje es proporcional al momento magnético de la muestra y por tanto a su magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H). En esta tesis doctoral, permitió calcular el porcentaje en peso de SPION dentro de las MMSNs sintetizadas, así como el carácter superparamagnético de los óxidos de hierro utilizados. Las medidas de VSM fueron realizadas en el Instituto de Sistemas optoelectrónicos y Microtecnología (ISOM) de la ETSI de Telecomunicaciones de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), bajo la supervisión de la Dra. M^a del Mar Sanz LLuch.

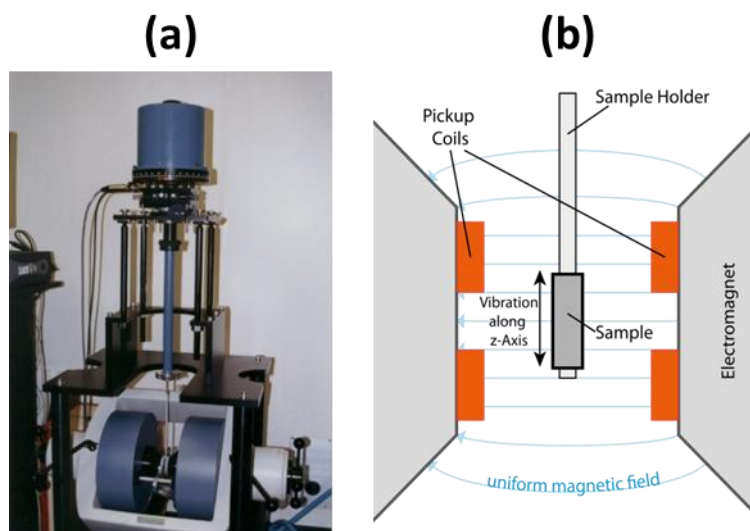


Figura A.3. Imagen del equipo VSM (a) y esquema de funcionamiento de la técnica (b).

A.3. Caracterización fisicoquímica

A.3.1. Dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering)

Esta técnica permite la caracterización de las suspensiones coloidales. Consiste en hacer incidir un láser monocromático sobre una suspensión de partículas en movimiento browniano. Este movimiento causa un desplazamiento en la longitud de onda del haz incidente (por efecto Doppler) sobre las partículas que está relacionado con su tamaño. La función de correlación relaciona el comportamiento de los fotones del haz incidente con el haz de luz dispersado. Mediante la medida de los coeficientes de difusión de las partículas y el uso de la función de correlación, es posible calcular la distribución de tamaños y obtener una descripción del movimiento de las partículas en el medio. Las medidas de tamaño obtenidas se refieren como radio hidrodinámico debido a que incluyen la esfera de solvatación de la partícula que la acompaña el movimiento, por lo que las medidas usualmente difieren de aquellas obtenidas por otras técnicas, como SEM o TEM. También es posible medir tamaños de partícula en disolventes orgánicos, ajustando los parámetros de viscosidad e índice de refracción en función del dispersante utilizado.

A.3.2. Medidas de potencial zeta (ζ Potential)

Esta técnica permite conocer la carga neta de la superficie de nanopartículas en suspensión acuosa. El potencial ζ se refiere a la diferencia de potencial existente entre el medio de dispersión y la capa de fluido estacionaria sobre la superficie de las nanopartículas dispersadas. Es uno de los análisis claves para conocer la estabilidad coloidal de las dispersiones. Su magnitud indica el alcance de las repulsiones electrostáticas entre partículas cargadas en una dispersión. En general, partículas pequeñas con altos potenciales (positivos o negativos) forman coloides más estables debido a la alta repulsión electrostática entre ellas. Por otro lado, las partículas con potenciales próximos a cero tienden a coagular o flocular, aunque es posible estabilizarlas mediante el uso de agentes estabilizantes (sobre todo

polímeros) que minimicen los efectos de la carga en superficie. La realización de medidas de potencial en función del pH (curvas de potencial) son comunes para el estudio de la estabilidad coloidal de la suspensión. Es una técnica de fácil manejo y rápida, especialmente útil para contrastar la eficacia de funcionalizaciones mediante la observación de cambios en el potencial antes y después de la modificación de la superficie, lo que permite incluso la identificación de grupos funcionales.

A.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica de análisis térmico se utiliza en la medición de cambios en las propiedades físicas y químicas de los materiales, normalmente en función de un incremento de temperatura constante; aunque también es posible obtener los resultados en función del tiempo si se fijan los parámetros de temperatura y/o pérdida de peso. Dentro de las múltiples aplicaciones posibles para materiales híbridos, la pérdida de masa en función de la temperatura determina la cantidad de masa orgánica presente en el material. Así pues, se puede determinar la efectividad de la funcionalización de un material si se observa un aumento en el contenido orgánico de la muestra en relación con el material precursor. En esta tesis doctoral las medidas se llevaron a cabo entre los 30 °C y 600 °C, donde la cantidad de masa orgánica se determinó entre 100 °C y 500 °C con una primera etapa de secado (15 min a 100 °C) para desestimar las pérdidas de masa por humedad y la exclusión de la policondensación de grupos silanol ($T > 500$ °C).

A.3.4. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de radiación infrarroja sobre la muestra y determinar la radiación incidente absorbida. La forma del espectro viene determinada por las frecuencias de vibración de los enlaces que forman las estructuras moleculares, por lo que es posible inferir multitud de grupos funcionales de las estructuras moleculares de los compuestos. La fortaleza de los enlaces, la masa de los átomos implicados, la simetría de la molécula y sus modos normales de vibración son factores que definen las absorciones activas, por lo que el espectro IR es característico del compuesto analizado.

En esta tesis doctoral fue una técnica fundamental en la caracterización de materiales híbridos mesoporosos, puesto que aporta información vital sobre la eficacia de la funcionalización de materiales. Con esta técnica se pudieron detectar las modificaciones de la superficie con moléculas pequeñas, la correcta eliminación de los surfactantes y restos de reactivos o la presencia de macromoléculas unidas o adsorbidas en los materiales, entre otras.

A.3.5. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los espectros UV-Vis se generan mediante la diferencia intensidad entre el haz emitido sobre una muestra y el haz incidente en el detector, lo que indica la absorción de este tipo de radiación (200 – 700 nm) por parte de una muestra en disolución. Las bandas de adsorción en las regiones ultravioleta y visible corresponden a transiciones electrónicas en la capa de valencia. Gracias a esta técnica espectroscópica, en esta tesis doctoral se ha podido realizar la detección de analitos relacionados con magnitudes como la actividad enzimática (EA), la

determinación de proteínas mediante ácido bicinconínico (BCA) y de grupos amina en nanopartículas mesoporosas mediante su protección/desprotección con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FmocCl).

A.3.6. Espectroscopia de fluorescencia

En espectroscopia de fluorescencia, las especies son excitadas desde su de estado electrónico fundamental (mediante la absorción de un fotón de una determinada longitud de onda) a uno de sus estados electrónicos excitados. A continuación, la molécula fluorescente vuela a su estado fundamental perdiendo parte de la energía absorbida mediante la emisión de un fotón de una longitud de onda distinta a la de excitación. La gran sensibilidad de la técnica y la variedad de fluoróforos disponible la hace muy versátil. En esta tesis doctoral, se ha aplicado en el marcaje de proteínas y nanopartículas para su localización por microscopía confocal (apartado III.1.4.2) y como fármaco modelo para monitorizar los perfiles de liberación desde matrices mesoporosas de materiales estímulo-respuesta.

A.3.7. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Esta técnica de cromatografía permite la separación, monitorización y detección de sustancias en función de las características tanto de la columna cromatográfica (fase estacionaria) y el eluyente (fase) móvil como del propio analito. La separación se produce por las interacciones químicas y físicas (grupos funcionales, tamaño, etc.) del analito con la fase estacionaria a medida que recorre la columna, lo que diferencia la velocidad de elución determinando el tiempo de retención, el cual es identificativo de cada compuesto en cierta fase móvil y estacionaria. El uso de altas presiones reduce la difusión dentro de la columna mediante el incremento de la velocidad lineal del compuesto, lo que mejora la resolución de la cromatografía. En esta tesis doctoral se empleó en la determinación de proteínas inhibidoras de tripsina (STI, artículo 1) y ácido indol-3-acético (IAA, artículo 4) en los ensayos de liberación *in vitro* de estas sustancias.

A.3.8. Cromatografía de permeabilidad en gel (GPC)

Esta técnica es un tipo de cromatografía de exclusión por tamaño. Se emplea en la separación de moléculas en función de su tamaño, lo que permite estudiar el peso molecular y su distribución. La separación tiene lugar mediante el uso de un material poroso como fase estacionaria empaquetada en la columna, el cual se comporta como un tamiz o filtro molecular. La fase móvil debe arrastrar los diferentes componentes, sin interactuar con la muestra ni con la fase estacionaria, por lo que la muestra debe ser soluble en la fase móvil. El tiempo de retención de los componentes en la columna depende del tamaño molecular de los mismos. De esta manera, los analitos más pequeños entran más fácilmente en los poros y por tanto emplean más tiempo en recorrer la fase estacionaria, aumentando su tiempo de retención. Por el contrario, los analitos de peso molecular más grandes se ven menos retenidos en los poros y eluyen rápidamente, dando lugar a tiempos de retención menores. Todas las columnas tienen una gama de pesos moleculares que pueden ser separados.

Una de las aplicaciones más extendidas de esta técnica es la caracterización de polímeros. A partir de los cromatogramas GPC obtenidos y de los correspondientes datos cromatográficos, se calculan los pesos moleculares promedio (M_N y M_W) y el índice de polidispersidad (PI, del inglés *polydispersity index*). Para ello es necesario utilizar mezclas de patrones de pesos moleculares conocidos para evaluar los pesos moleculares correspondientes a cada tiempo de retención. En esta tesis doctoral, esta técnica se utilizó en la determinación de los pesos moleculares de polímeros lineales termosensibles (sección II.1.3.3). Para ello, se utilizó un módulo de separación Waters 2695 HPLC combinado con un detector de índice de refracción Waters 2414. Las medidas de GPC se llevaron a cabo mediante el uso de patrones de polietilenglicol y DMF con LiCl 10 mM como eluyente.

A.4. Ensayos celulares

A.4.1. Estudios de absorción celular mediante microscopía confocal de fluorescencia

Es una técnica óptica de imagen para eliminar la luz desenfocada mediante una apertura localizada delante del fotomultiplicador, por lo que puede adquirir imágenes sólo del plano focal. Es capaz de reconstruir imágenes tridimensionales mediante el apilamiento de sucesivas capas. Su uso está generalizado en investigación biomédica, ya que permite el seguimiento procesos biológicos mediante el marcaje fluorescente de biomoléculas. En la presente tesis doctoral, esta técnica permitió realizar la localización inequívoca de nanopartículas en el interior de las células, estudios de absorción celular, así como la co-localización entre el nanodispositivo y orgánulos marcados con fluoróforos específicos.

A.4.2. Estudios de viabilidad celular por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica biofísica que permite obtener información sobre poblaciones celulares grandes (habitualmente entre 5000 y 10000). Las células suspendidas en una solución salina, atraviesan un fino tubo transparente una a una sobre el que incide un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro. El citómetro de flujo detecta como las células interactúan con el láser según cómo la célula desvía la luz incidente (parámetros FSC y SSC) o emite fluorescencia (parámetros FL1, FL2 y FL3). Los datos obtenidos permiten el recuento y clasificación de células en función de parámetros como morfología, la presencia de biomarcadores, tamaño y complejidad celulares.

Una de sus aplicaciones más extendidas, utilizada también en esta tesis doctoral (artículos 4 y 5), es la de medir la viabilidad celular. Esto se consigue mediante marcadores fluorescentes específicos capaces de traspasar la membrana celular y comparando la señal (número de células vivas) con la muestra control. También es posible el marcaje de células apoptóticas y apoptóticas tardías con marcadores (incapaces de traspasar la membrana de células vivas) para conocer los procesos de muerte celular.

Capítulo

VI

Bibliografía

“El conocimiento es una riqueza que se puede transmitir sin empobrecerse” [...]. Al contrario, enriqueciendo a quien lo transmite y a quien lo recibe.

La utilidad de lo inútil, Nuccio Ordine (pág. 80)

IV. Bibliografía

- (1) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318*, 162–163.
 - (2) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid–Liquid System. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801–802.
 - (3) Geim, A. K.; Novoselov, K. S. The Rise of Graphene. *Nat. Mater.* **2007**, 183–191.
 - (4) Pray, L.; Yaktine, A. *Nanotechnology in Food Products*; 2009.
 - (5) Ouellette, L. L. Economic Growth and Breakthrough Innovations: A Case Study of Nanotechnology. *World Intellect. Prop. Organ.* **2013**.
 - (6) Gordijn, B. Nanoethics: From Utopian Dreams and Apocalyptic Nightmares towards a More Balanced View. *Sci. Eng. Ethics* **2005**, *11*, 521–533.
 - (7) Gregori, M.; Masserini, M.; Mancini, S. Nanomedicine for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 1203–1218.
 - (8) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–668.
 - (9) Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223–3230.
 - (10) Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311.
 - (11) Liong, M.; Lu, J.; Kovochich, M.; Xia, T.; Ruehm, S. G.; Nel, A. E.; Tamanoi, F.; Zink, J. I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano* **2008**, *2*, 889–896.
 - (12) Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.
 - (13) Zhang, X. Q.; Xu, X.; Lam, R.; Giljohann, D.; Ho, D.; Mirkin, C. A. Strategy for Increasing Drug Solubility and Efficacy through Covalent Attachment to Polyvalent DNA-Nanoparticle Conjugates. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6962–6970.
 - (14) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J. H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C. Y.; *et al.* Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2007**, *3*, 95–101.
 - (15) Manzano, M.; Vallet-Regí, M. New Developments in Ordered Mesoporous Materials for Drug Delivery. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5593.
 - (16) Torchilin, V. P. Structure and Design of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2001**, *73*, 137–172.
 - (17) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **2006**, *18*,
-

-
- 1345–1360.
- (18) Discher, B. M. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science (80-.)*. **1999**, *284*, 1143–1146.
- (19) Paunesku, T.; Rajh, T.; Wiederrecht, G.; Maser, J.; Vogt, S.; Stojićević, N.; Protić, M.; Lai, B.; Oryhon, J.; Thurnauer, M.; *et al.* Biology of TiO₂-oligonucleotide Nanocomposites. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 343–346.
- (20) Paris, J. L.; Cabañas, M. V.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers. *ACS Nano* **2015**, *9*, 11023–11033.
- (21) Vallet-Regí, M.; Ruiz-Hernández, E. Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5177–5218.
- (22) Gonçalves, G.; Vila, M.; Portolés, M.-T.; Vallet-Regi, M.; Gracio, J.; Marques, P. A. A. P. Nano-Graphene Oxide: A Potential Multifunctional Platform for Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1072–1090.
- (23) Weissig, V.; Pettinger, T.; Murdock, N. Nanopharmaceuticals (Part 1): Products on the Market. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 4357.
- (24) Bhushan, B. Summary for Policymakers. In *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*; Intergovernmental Panel on Climate Change, Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2015; Vol. 1, pp. 1–30.
- (25) Mandelkern, M.; Elias, J. G.; Eden, D.; Crothers, D. M. The Dimensions of DNA in Solution. *J. Mol. Biol.* **1981**, *152*, 153–161.
- (26) Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. a.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine - Challenge and Perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 872–897.
- (27) Iqbal, P.; Preece, J. A.; Mendes, P. M. Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramol. Chem.* **2012**.
- (28) Moghimi, S. M. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB J.* **2005**, *19*, 311–330.
- (29) Izquierdo-Barba, I.; García-Martín, J. M.; Álvarez, R.; Palmero, A.; Esteban, J.; Pérez-Jorge, C.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Nanocolumnar Coatings with Selective Behavior towards Osteoblast and Staphylococcus Aureus Proliferation. *Acta Biomater.* **2015**, *15*, 20–28.
- (30) Kim, J.; Piao, Y.; Hyeon, T. Multifunctional Nanostructured Materials for Multimodal Imaging, and Simultaneous Imaging and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 372–390.
- (31) Sakamoto, J. H.; van de Ven, A. L.; Godin, B.; Blanco, E.; Serda, R. E.; Grattoni, A.; Ziemys, A.; Bouamrani, A.; Hu, T.; Ranganathan, S. I.; *et al.* Enabling Individualized Therapy through Nanotechnology. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 57–89.
- (32) Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171.
- (33) Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Bioceramics for Drug Delivery. *Acta Mater.* **2013**, *61*, 890–911.
-

-
- (34) Simmchen, J.; Baeza, A.; Ruiz, D.; Esplandiú, M. J.; Vallet-Regí, M. Asymmetric Hybrid Silica Nanomotors for Capture and Cargo Transport: Towards a Novel Motion-Based DNA Sensor. *Small* **2012**, *8*, 2053–2059.
- (35) James, K.; Highsmith, J.; Evers, P. NANOTECHNOLOGY MARKET - Nanotechnology Markets in Healthcare & Medicine. *Drug Dev. Deliv.* **2014**, <http://www.drug-dev.com/Main/Back-Issues/NANOTECHN>.
- (36) Morigi, V.; Tocchio, A.; Bellavite Pellegrini, C.; Sakamoto, J. H.; Arnone, M.; Tasciotti, E. Nanotechnology in Medicine: From Inception to Market Domination. *J. Drug Deliv.* **2012**, *2012*, 1–7.
- (37) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J. Control. Release* **2015**, *200*, 138–157.
- (38) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9*, 1–14.
- (39) Bawa, R. FDA and Nanotech: Baby Steps Lead to Regulatory Uncertainty. In *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*; 2013; pp. 721–732.
- (40) Bregoli, L.; Movia, D.; Gavigan-Imedio, J. D.; Lysaght, J.; Reynolds, J.; Prina-Mello, A. Nanomedicine Applied to Translational Oncology: A Future Perspective on Cancer Treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *12*, 81–103.
- (41) Desai, N. Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. *AAPS J.* **2012**, *14*, 282–295.
- (42) European Technology Platform on Nanomedicine. NANOMEDICINE 2020 Contribution of Nanomedicine to Horizon 2020 <http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/etpn-white-paper-H2020>.
- (43) Howlader, N.; Noone, A. M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Bishop, K.; Altekruse, S. F.; Kosary, C. L.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013, National Cancer Institute. **2013**, 1–89.
- (44) Nichols, J. W.; Bae, Y. H. Odyssey of a Cancer Nanoparticle: From Injection Site to Site of Action. *Nano Today* **2012**, *7*, 606–618.
- (45) Kelland, L. *Cancer Chemotherapy*; 2007; Vol. 7.
- (46) Licht, T.; Fiebig, H. H.; Bross, K. J.; Herrmann, F.; Berger, D. P.; Shoemaker, R.; Mertelsmann, R. Induction of Multiple-Drug Resistance during Anti-Neoplastic Chemotherapy in Vitro. *Int J Cancer* **1991**, *49*, 630–637.
- (47) Rabik, C. A.; Dolan, M. E. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 9–23.
- (48) Shapira, A.; Livney, Y. D.; Broxterman, H. J.; Assaraf, Y. G. Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy: Towards the Overcoming of Drug Resistance. *Drug Resist. Updat.* **2011**, *14*, 150–163.
-

-
- (49) Liu, Y.; Miyoshi, H.; Nakamura, M. Nanomedicine for Drug Delivery and Imaging: A Promising Avenue for Cancer Therapy and Diagnosis Using Targeted Functional Nanoparticles. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2527–2537.
- (50) Sumer, B.; Gao, J. Theranostic Nanomedicine for Cancer. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 137–140.
- (51) Hare, J. I.; Lammers, T.; Ashford, M. B.; Puri, S.; Storm, G.; Barry, S. T. Challenges and Strategies in Anti-Cancer Nanomedicine Development: An Industry Perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, 1–14.
- (52) Steichen, S. D.; Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. A Review of Current Nanoparticle and Targeting Moieties for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 416–427.
- (53) Key, J.; Leary, J. F. Nanoparticles for Multimodal in Vivo Imaging in Nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 711–726.
- (54) Baeza, A.; Manzano, M.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Recent Advances in Mesoporous Silica Nanoparticles for Antitumor Therapy: Our Contribution. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 803–813.
- (55) Meseguer-Olmo, L.; Ros-Nicolás, M.; Vicente-Ortega, V.; Alcaraz-Baños, M.; Clavel-Sainz, M.; Arcos, D.; Ragel, C. V.; Vallet-Regí, M.; Meseguer-Ortiz, C. A Bioactive Sol-Gel Glass Implant for in Vivo Gentamicin Release. Experimental Model in Rabbit. *J. Orthop. Res.* **2006**, *24*, 454–460.
- (56) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.
- (57) Vallet-Regí, M.; Ruiz-González, L.; Izquierdo-Barba, I.; González-Calbet, J. M. Revisiting Silica Based Ordered Mesoporous Materials: Medical Applications. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 26–31.
- (58) Martínez-Carmona, M.; Colilla, M.; Ruiz-González, M. L.; González-Calbet, J. M.; Vallet-Regí, M. High Resolution Transmission Electron Microscopy: A Key Tool to Understand Drug Release from Mesoporous Matrices. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *225*, 399–410.
- (59) Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Novel Biomaterials for Drug Delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2008**, *18*, 639–656.
- (60) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189–207.
- (61) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 136–151.
- (62) Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1363–1380.
- (63) Skinner, S. A.; Tutton, P. J. M.; O'Brien, P. E. Microvascular Architecture of Experimental
-

-
- Colon Tumors in the Rat. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 2411–2417.
- (64) Maeda, H.; Matsumura, Y. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387.
- (65) Chauhan, V. P.; Jain, R. K. Strategies for Advancing Cancer Nanomedicine. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 958–962.
- (66) Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; *et al.* Accumulation of Sub-100 Nm Polymeric Micelles in Poorly Permeable Tumours Depends on Size. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815–823.
- (67) Chauhan, V. P.; Popović, Z.; Chen, O.; Cui, J.; Fukumura, D.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 11417–11420.
- (68) Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* **2014**, *4*, 81–89.
- (69) Krasnici, S.; Werner, A.; Eichhorn, M. E.; Schmitt-Sody, M.; Pahernik, S. A.; Sauer, B.; Schulze, B.; Teifel, M.; Michaelis, U.; Naujoks, K.; *et al.* Effect of the Surface Charge of Liposomes on Their Uptake by Angiogenic Tumor Vessels. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 561–567.
- (70) Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR Effect for Macromolecular Drug Delivery to Solid Tumors: Improvement of Tumor Uptake, Lowering of Systemic Toxicity, and Distinct Tumor Imaging in Vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71–79.
- (71) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951.
- (72) Paula, A. J.; Araujo Júnior, R. T.; Martinez, D. S. T.; Paredes-Gamero, E. J.; Nader, H. B.; Durán, N.; Justo, G. Z.; Alves, O. L. Influence of Protein Corona on the Transport of Molecules into Cells by Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 8387–8393.
- (73) Torosean, S.; Flynn, B.; Axelsson, J.; Gunn, J.; Samkoe, K. S.; Hasan, T.; Doyley, M. M.; Pogue, B. W. Nanoparticle Uptake in Tumors Is Mediated by the Interplay of Vascular and Collagen Density with Interstitial Pressure. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9*, 151–158.
- (74) Haley, B.; Frenkel, E. Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2008**, *26*, 57–64.
- (75) Villaverde, G.; Baeza, A.; Melen, G. J.; Alfranca, A.; Ramirez, M.; Vallet-Regí, M. A New Targeting Agent for the Selective Drug Delivery of Nanocarriers for Treating Neuroblastoma. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 4831–4842.
- (76) Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Targeting of Drugs and Nanoparticles to Tumors. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 759–768.
- (77) Liechty, W. B.; Peppas, N. A. Expert Opinion: Responsive Polymer Nanoparticles in
-

-
- Cancer Therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 241–246.
- (78) Phillips, M. A.; Gran, M. L.; Peppas, N. A. Targeted Nanodelivery of Drugs and Diagnostics. *Nano Today* **2010**, *5*, 143–159.
- (79) Tong, R.; Kohane, D. S. New Strategies in Cancer Nanomedicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 41–57.
- (80) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1316.
- (81) Low, P. S.; Kularatne, S. A. Folate-Targeted Therapeutic and Imaging Agents for Cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 256–262.
- (82) Minko, T. Drug Targeting to the Colon with Lectins and Neoglycoconjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 491–509.
- (83) Lurje, G.; Lenz, H.-J. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* **2009**, *77*, 400–410.
- (84) Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 428–437.
- (85) Carrstensen, H.; Müller, R. H.; Müller, B. W. Particle Size, Surface Hydrophobicity and Interaction with Serum of Parenteral Fat Emulsions and Model Drug Carriers as Parameters Related to RES Uptake. *Clin. Nutr.* **1992**, *11*, 289–297.
- (86) Wang, S.; Huang, P.; Chen, X. Hierarchical Targeting Strategy for Enhanced Tumor Tissue Accumulation/Retention and Cellular Internalization. *Adv. Mater.* **2016**.
- (87) Villegas, M. R.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Hybrid Collagenase Nanocapsules for Enhanced Nanocarrier Penetration in Tumoral Tissues. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 24075–24081.
- (88) Paris, J. L.; Torre, P. D. La; Manzano, M.; Cabañas, M. V.; Flores, A. I.; Vallet-Regí, M. Decidua-Derived Mesenchymal Stem Cells as Carriers of Mesoporous Silica Nanoparticles. *In Vitro and in Vivo Evaluation on Mammary Tumors. Acta Biomater.* **2016**, *33*, 275–282.
- (89) Nakamura, H.; Jun, F.; Maeda, H. Development of next-Generation Macromolecular Drugs Based on the EPR Effect: Challenges and Pitfalls. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 53–64.
- (90) Folkman, J. How the Field of Controlled-Release Technology Began, and Its Central Role in the Development of Angiogenesis Research. *Biomaterials* **1990**, *11*, 615–618.
- (91) Hewish, A.; Okoye, S. E. Prolonged Administration of Atropine or Histamine in a Silicone Rubber Implant. *Nature* **1965**, *208*, 591–592.
- (92) Diaz, S.; Pavez, M.; Miranda, P.; Robertson, D. N.; Sivin, I.; Croxatto, H. B. A Five-Year Clinical Trial of Levonorgestrel Silastic Implants (Norplant™). *Contraception* **1982**, *25*, 447–456.
- (93) Armaly, M. F.; Rao, K. R. The Effect of Pilocarpine Ocusert with Different Release Rates on Ocular Pressure. *Invest. Ophthalmol.* **1973**, *12*, 491–496.
-

-
- (94) Chang, T. M. S. Semipermeable Microcapsules. *Science (80-.)*. **1964**, *146*, 524–525.
- (95) Langer, R.; Folkman, J. Polymers for the Sustained Release of Proteins and Other Macromolecules. *Nature* **1976**, *263*, 797–800.
- (96) Vallet-Regí, M.; Colilla, M.; Manzano, M. Recent Advances in Ceramic Implants as Drug Delivery Systems for Biomedical Applications. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 403.
- (97) Langer, R. S.; Peppas, N. A. Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems. *Biomaterials* **1981**, *2*, 201–214.
- (98) Tibbitt, M. W.; Dahlman, J. E.; Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, jacs.5b09974.
- (99) Manzano, M.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Drug Delivery from Ordered Mesoporous Matrices. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 1383–1400.
- (100) Tong, R.; Tang, L.; Ma, L.; Tu, C.; Baumgartner, R.; Cheng, J. Smart Chemistry in Polymeric Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6982–7012.
- (101) Daniel, M. C. M.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (102) Taylor-Pashow, K. M. L.; Della Rocca, J.; Huxford, R. C.; Lin, W. Hybrid Nanomaterials for Biomedical Applications. *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, *46*, 5832–5849.
- (103) Martínez, Á.; Fuentes-Paniagua, E.; Baeza, A.; Sánchez-Nieves, J.; Cicuéndez, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; González, B.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles Decorated with Carbosilane Dendrons as New Non-Viral Oligonucleotide Delivery Carriers. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 15651–15666.
- (104) Sailor, M. J.; Park, J.-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779–3802.
- (105) Fang, J.-Y.; Al-Suwayeh, S. Nanoparticles as Delivery Carriers for Anticancer Prodrugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 657–669.
- (106) Duncan, R. Polymer Conjugates as Anticancer Nanomedicines. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 688–701.
- (107) Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted Polymeric Therapeutic Nanoparticles: Design, Development and Clinical Translation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971–3010.
- (108) Kunzmann, A.; Andersson, B.; Thurnherr, T.; Krug, H.; Scheynius, A.; Fadeel, B. Toxicology of Engineered Nanomaterials: Focus on Biocompatibility, Biodistribution and Biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 361–373.
- (109) Fu, C.; Liu, T.; Li, L.; Liu, H.; Chen, D.; Tang, F. The Absorption, Distribution, Excretion and Toxicity of Mesoporous Silica Nanoparticles in Mice Following Different Exposure Routes. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2565–2575.
- (110) Vila, M.; Portolés, M. T.; Marques, P. a a P.; Feito, M. J.; Matesanz, M. C.; Ramírez-Santillán, C.; Gonçalves, G.; Cruz, S. M. a; Nieto, A.; Vallet-Regí, M. Cell Uptake Survey of Pegylated Nanographene Oxide. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 465103.
-

-
- (111) Li, J.; Gupta, S.; Li, C. Research Perspectives: Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2013**, *3*, 284–291.
- (112) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. M. Hyperthermia in Combined Treatment of Cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 487–497.
- (113) Renard, P. Le; Buchegger, F.; Petri-fink, A.; Hofmann, H.; Doelker, E.; Jordan, O. *Formulations for Local, Magnetically Mediated Hyperthermia Treatment of Solid Tumors*; 2012.
- (114) Gneveckow, U.; Jordan, A.; Scholz, R.; Brüß, V.; Waldöfner, N.; Ricke, J.; Feussner, A.; Hildebrandt, B.; Rau, B.; Wust, P. Description and Characterization of the Novel Hyperthermia- and Thermoablation-System MFH 300F for Clinical Magnetic Fluid Hyperthermia. *Med. Phys.* **2004**, *31*, 1444–1451.
- (115) Kastner, E. J.; Reeves, R.; Bennett, W.; Misra, A.; Petryk, J. D.; Petryk, A. a.; Hoopes, P. J. Alternating Magnetic Field Optimization for IONP Hyperthermia Cancer Treatment. *SPIE BiOS* **2015**, 9326, 93260M.
- (116) Kobayashi, T. Cancer Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 1342–1347.
- (117) Rivera Gil, P.; Hühn, D.; del Mercato, L. L.; Sasse, D.; Parak, W. J. Nanopharmacy: Inorganic Nanoscale Devices as Vectors and Active Compounds. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 115–125.
- (118) Martín-Saavedra, F. M.; Ruíz-Hernández, E.; Boré, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Vilaboa, N. Magnetic Mesoporous Silica Spheres for Hyperthermia Therapy. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4522–4531.
- (119) Wang, Y.; Gu, H. Core-Shell-Type Magnetic Mesoporous Silica Nanocomposites for Bioimaging and Therapeutic Agent Delivery. *Adv. Mater.* **2014**, 1–10.
- (120) Knežević, N. Ž.; Ruiz-Hernández, E.; Hennink, W. E.; Vallet-Regí, M. Magnetic Mesoporous Silica-Based Core/shell Nanoparticles for Biomedical Applications. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9584.
- (121) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Cristal Template Mechanism. *Nature* **1992**, *355*, 242–244.
- (122) Colilla, M.; Balas, F.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Novel Method to Synthesize Ordered Mesoporous Silica with High Surface Areas. *Solid State Sci.* **2008**, *10*, 408–415.
- (123) Nieto, A.; Balas, F.; Colilla, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Functionalization Degree of SBA-15 as Key Factor to Modulate Sodium Alendronate Dosage. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *116*, 4–13.
- (124) Horcajada, P.; Rámila, A.; Férey, G.; Vallet-Regí, M. Influence of Superficial Organic Modification of MCM-41 Matrices on Drug Delivery Rate. *Solid State Sci.* **2006**, *8*, 1243–1249.
- (125) Colilla, M.; Manzano, M.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M.; Boissière, C.; Sanchez, C. Advanced Drug Delivery Vectors with Tailored Surface Properties Made of Mesoporous
-

-
- Binary Oxides Submicronic Spheres. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1821–1830.
- (126) Colilla, M.; Balas, F.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Novel Method To Enlarge the Surface Area of SBA-15. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3099–3101.
- (127) Yan, Z.; Meng, H.; Shi, L.; Li, Z.; Shen, P. K. Synthesis of Mesoporous Hollow Carbon Hemispheres as Highly Efficient Pd Electrocatalyst Support for Ethanol Oxidation. *Electrochem. commun.* **2010**, *12*, 689–692.
- (128) Sun, J.; Bao, X. Textural Manipulation of Mesoporous Materials for Hosting of Metallic Nanocatalysts. *Chemistry* **2008**, *14*, 7478–7488.
- (129) Serrano, E.; Linares, N.; Garcia-Martinez, J.; Berenguer, J. R. Sol-Gel Coordination Chemistry: Building Catalysts from the Bottom-Up. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 844–860.
- (130) Zhang, H.; Li, X. Novel Mesoporous Silica Materials with Hierarchically Ordered Nanochannel: Synthesis with the Assistance of Straight-Chain Alkanes and Application. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 1–16.
- (131) Tian, R.; Sun, J.; Zhang, H.; Ye, M.; Xie, C.; Dong, J.; Hu, J.; Ma, D.; Bao, X.; Zou, H. Large-Pore Mesoporous SBA-15 Silica Particles with Submicrometer Size as Stationary Phases for High-Speed CEC Separation. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 742–748.
- (132) Li, X.; Lee, Y. R.; Row, K. H. Synthesis of Mesoporous Siliceous Materials in Choline Chloride Deep Eutectic Solvents and the Application of These Materials to High-Performance Size Exclusion Chromatography. *Chromatographia* **2016**, *79*, 375–382.
- (133) Tang, B.; Bi, W.; Row, K. H. Exploration of Mesoporous Siliceous Particle-Based High-Performance Size Exclusion Chromatography for the Quantitation of Biomacromolecular Polysaccharides. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 774–780.
- (134) Sangvanich, T.; Morry, J.; Fox, C.; Ngamcherdtrakul, W.; Goodyear, S.; Castro, D.; Fryxell, G. E.; Addleman, R. S.; Summers, A. O.; Yantasee, W. Novel Oral Detoxification of Mercury, Cadmium, And Lead with Thiol-Modified Nanoporous Silica. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 5483–5493.
- (135) Yantasee, W.; Rutledge, R. D.; Chouyyok, W.; Sukwarotwat, V.; Orr, G.; Warner, C. L.; Warner, M. G.; Fryxell, G. E.; Wiacek, R. J.; Timchalk, C.; *et al.* Functionalized Nanoporous Silica for the Removal of Heavy Metals from Biological Systems: Adsorption and Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 2749–2758.
- (136) Walcarius, A.; Mercier, L. Mesoporous Organosilica Adsorbents: Nanoengineered Materials for Removal of Organic and Inorganic Pollutants. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4478.
- (137) Wang, Y.; Zhao, Q.; Han, N.; Bai, L.; Li, J.; Liu, J.; Che, E.; Hu, L.; Zhang, Q.; Jiang, T.; *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11*, 313–327.
- (138) Karimi, M.; Ghasemi, A.; Sahandi Zangabad, P.; Rahighi, R.; Moosavi Basri, S. M.; Mirshekari, H.; Amiri, M.; Shafaei Pishabad, Z.; Aslani, A.; Bozorgomid, M.; *et al.* Smart Micro/nanoparticles in Stimulus-Responsive Drug/gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1457–1501.
-

-
- (139) Giret, S.; Wong Chi Man, M.; Carcel, C. Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 13850–13865.
- (140) Lozano, D.; Trejo, C. G.; Gómez-Barrena, E.; Manzano, M.; Doadrio, J. C.; Salinas, A. J.; Vallet-Regí, M.; García-Honduvilla, N.; Esbrit, P.; Buján, J. Osteostatin-Loaded onto Mesoporous Ceramics Improves the Early Phase of Bone Regeneration in a Rabbit Osteopenia Model. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 2317–2323.
- (141) Vallet-Regí, M.; Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M. Structure and Functionalization of Mesoporous Bioceramics for Bone Tissue Regeneration and Local Drug Delivery. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2012**, *370*, 1400–1421.
- (142) Izquierdo-Barba, I.; Sousa, E.; Doadrio, J. C.; Doadrio, A. L.; Pariente, J. P.; Martínez, A.; Babonneau, F.; Vallet-Regí, M. Influence of Mesoporous Structure Type on the Controlled Delivery of Drugs: Release of Ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and Functionalized SBA-15. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, *50*, 421–429.
- (143) Chung, T.-H.; Wu, S.-H.; Yao, M.; Lu, C.-W.; Lin, Y.-S.; Hung, Y.; Mou, C.-Y.; Chen, Y.-C.; Huang, D.-M. The Effect of Surface Charge on the Uptake and Biological Function of Mesoporous Silica Nanoparticles in 3T3-L1 Cells and Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2959–2966.
- (144) Chiu, H.-Y.; Deng, W.; Engelke, H.; Helma, J.; Leonhardt, H.; Bein, T. Highly Efficient Intracellular Chromobody Delivery by Mesoporous Silica Nanoparticles for Antigen Targeting and Visualization in Real Time. **2015**, *30*.
- (145) Radu, D. R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E. W.; Jeftinija, S.; Lin, V. S. Y. A Polyamidoamine Dendrimer-Capped Mesoporous Silica Nanosphere-Based Gene Transfection Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216–13217.
- (146) Trewyn, B. G.; Nieweg, J. A.; Zhao, Y.; Lin, V. S.-Y. Biocompatible Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Morphologies for Animal Cell Membrane Penetration. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 23–29.
- (147) Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y. Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288.
- (148) González, B. Ceramics for Gene Transfection. In *Bio-Ceramics with Clinical Applications*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014; pp. 383–419.
- (149) Vallet-Regí, M.; Colilla, M.; González, B. Medical Applications of Organic-Inorganic Hybrid Materials within the Field of Silica-Based Bioceramics. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 596–607.
- (150) Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8582–8594.
- (151) Yiu, H. H. P.; Wright, P. A. Enzymes Supported on Ordered Mesoporous Solids: A Special Case of an Inorganic–organic Hybrid. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690.
- (152) Ferdousi, M.; Pazouki, M.; Hessari, F. A.; Kazemzad, M. Simultaneous Control of Rod Length and Pore Diameter of SBA-15 for PPL Loading. *J. Porous Mater.* **2016**, *23*, 453–463.
-

-
- (153) Soler-Illia, G. J. de A. A.; Sanchez, C.; Lebeau, B.; Patarin, J. Chemical Strategies To Design Textured Materials: From Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4093–4138.
- (154) Serrano, M. C.; Portolés, M. T.; Pagani, R.; de Guinoa, J. S.; Ruiz-Hernández, E.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. In Vitro Positive Biocompatibility Evaluation of Glass–Glass Ceramic Thermosteeds for Hyperthermic Treatment of Bone Tumors. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 617–627.
- (155) Vallet-Regí, M.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I. Bioactive Mesoporous Silicas as Controlled Delivery Systems: Applications in Bone Tissue Regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 1–15.
- (156) Shadjou, N.; Hasanzadeh, M. Silica-Based Mesoporous Nanobiomaterials as Promoter of Bone Regeneration Process. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103*, 3703–3716.
- (157) Vallet-Regí, M.; Doadrio, J. C.; Doadrio, A. L.; Izquierdo-Barba, I.; Pérez-Pariente, J. Hexagonal Ordered Mesoporous Material as a Matrix for the Controlled Release of Amoxicillin. *Solid State Ionics* **2004**, *172*, 435–439.
- (158) Izquierdo-Barba, I.; Sánchez-Salcedo, S.; Colilla, M.; Feito, M. J.; Ramírez-Santillán, C.; Portolés, M. T.; Vallet-Regí, M. Inhibition of Bacterial Adhesion on Biocompatible Zwitterionic SBA-15 Mesoporous Materials. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2977–2985.
- (159) Colilla, M.; Martínez-Carmona, M.; Sánchez-Salcedo, S.; Ruiz-González, M. L.; González-Calbet, J. M.; Vallet-Regí, M. A Novel Zwitterionic Bioceramic with Dual Antibacterial Capability. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5639.
- (160) Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Sol–gel Silica-Based Biomaterials and Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2874–2888.
- (161) Alcaide, M.; Portolés, P.; López-Noriega, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M. T. Interaction of an Ordered Mesoporous Bioactive Glass with Osteoblasts, Fibroblasts and Lymphocytes, Demonstrating Its Biocompatibility as a Potential Bone Graft Material. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 892–899.
- (162) Colilla, M. Silica-Based Ceramics: Mesoporous Silica. In *Bio-Ceramics with Clinical Applications*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp. 109–151.
- (163) Wu, S.-H.; Mou, C.-Y.; Lin, H.-P. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3862–3875.
- (164) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Giri, S.; Lin, V. S. Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225–1236.
- (165) Huh, S.; Wiench, J. W.; Yoo, J. C.; Pruski, M.; Lin, V. S. Y. Organic Functionalization and Morphology Control of Mesoporous Silicas via a Co-Condensation Synthesis Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4247–4256.
- (166) Kim, T.-W.; Chung, P.-W.; Lin, V. S. Y. Facile Synthesis of Monodisperse Spherical MCM-48 Mesoporous Silica Nanoparticles with Controlled Particle Size. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 5093–5104.
- (167) Rosenholm, J. M.; Lindén, M. Towards Establishing Structure-Activity Relationships for Mesoporous Silica in Drug Delivery Applications. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 157–164.
-

-
- (168) Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216–3251.
- (169) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- (170) Tang, F.; Li, L.; Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
- (171) Huo, Q.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Demuth, D. G.; Feng, P.; Gier, T. E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B. F.; Schuth, F.; *et al.* Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Arrays. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1176–1191.
- (172) Huo, Q.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Feng, P.; Gier, T. E.; Sieger, P.; Leon, R.; Petroff, P. M.; Schüth, F.; Stucky, G. D. Generalized Synthesis of Periodic Surfactant/inorganic Composite Materials. *Nature* **1994**, *368*, 317–321.
- (173) Vallet-Regí, M.; Ruiz-Hernández, E.; González, B.; Baeza, A. Design of Smart Nanomaterials for Drug and Gene Delivery. *J. Biomater. Tissue Eng.* **2011**, *1*, 6–29.
- (174) Cauda, V.; Argyo, C.; Piercey, D. G.; Bein, T. “Liquid-Phase Calcination” of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles in High-Boiling Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6484–6486.
- (175) Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Materials in the Context of Drug Delivery Systems and Bone Tissue Engineering. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12*, 5934–5943.
- (176) Jin, Y.; Gao, H.; Yang, Y. Mesoporous Silica Nanoparticles Coated by Layer-by-Layer Self-Assembly Using Cucurbit[7]uril for in Vitro and in Vivo Anticancer Drug Release. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 6418–6431.
- (177) Bagwe, R. P.; Hilliard, L. R.; Tan, W. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir* **2006**, *22*, 4357–4362.
- (178) Rosenholm, J. M.; Sahlgren, C.; Lindén, M. Towards Multifunctional, Targeted Drug Delivery Systems Using Mesoporous Silica Nanoparticles – Opportunities & Challenges. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1870.
- (179) Lin, Y.-S.; Hurley, K. R.; Haynes, C. L. Critical Considerations in the Biomedical Use of Mesoporous Silica Nanoparticles. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 364–374.
- (180) Salmaso, S.; Caliceti, P. Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers. *J. Drug Deliv.* **2013**, *2013*, 1–19.
- (181) Wang, L.; Wu, L.; Lu, S.; Chang, L.; Teng, I.; Yang, C.; Ho, J. A. Biofunctionalized Phospholipid-Capped Mesoporous Silica Nanoshuttles for Targeted Drug Delivery: Improved Water Suspending Ability and Decreased Nonspecific Protein Binding. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4371–4379.
- (182) Lin, Y.-S.; Abadeer, N.; Haynes, C. L. Stability of Small Mesoporous Silica Nanoparticles in Biological Media. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 532–534.
- (183) Lin, Y.-S.; Abadeer, N.; Hurley, K. R.; Haynes, C. L. Ultrastable, Redispersible, Small, and Highly Organomodified Mesoporous Silica Nanotherapeutics. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**,
-

-
- 133, 20444–20457.
- (184) Doadrio, A. L.; Sousa, E. M. B.; Doadrio, J. C.; Pérez Pariente, J.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Mesoporous SBA-15 HPLC Evaluation for Controlled Gentamicin Drug Delivery. *J. Control. Release* **2004**, *97*, 125–132.
- (185) Izquierdo-Barba, I.; Martínez, Á.; Doadrio, A. L.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. Release Evaluation of Drugs from Ordered Three-Dimensional Silica Structures. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *26*, 365–373.
- (186) Balas, F.; Manzano, M.; Horcajada, P.; Vallet-Regí, M. Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8116–8117.
- (187) Horcajada, P.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. Influence of Pore Size of MCM-41 Matrices on Drug Delivery Rate. *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *68*, 105–109.
- (188) Muñoz, B.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Díaz, I.; Vallet-Regí, M. MCM-41 Organic Modification as Drug Delivery Rate Regulator. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 500–503.
- (189) Manzano, M.; Aina, V.; Areán, C. O.; Balas, F.; Cauda, V.; Colilla, M.; Delgado, M. R.; Vallet-Regí, M. Studies on MCM-41 Mesoporous Silica for Drug Delivery: Effect of Particle Morphology and Amine Functionalization. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 30–37.
- (190) Doadrio, J. C.; Sousa, E. M. B.; Izquierdo-Barba, I.; Doadrio, A. L.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. Functionalization of Mesoporous Materials with Long Alkyl Chains as a Strategy for Controlling Drug Delivery Pattern. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 462–466.
- (191) Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. Mesoporous MCM-41 as Drug Host System. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2003**, *26*, 1199–1202.
- (192) Aznar, E.; Oroval, M.; Pascual, L.; Murguía, J. R.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 561–718.
- (193) Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Smart Mesoporous Silica Nanocarriers for Antitumoral Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 2306–2315.
- (194) Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J. I. Mesoporous Silicate Materials as Substrates for Molecular Machines and Drug Delivery. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 4–13.
- (195) Martínez-Carmona, M.; Baeza, A.; Rodríguez-Milla, M. A.; García-Castro, J.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles Grafted with a Light-Responsive Protein Shell for Highly Cytotoxic Antitumoral Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5746–5752.
- (196) Baeza, A.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Advances in Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Stimuli-Responsive Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 319–337.
- (197) Liu, Y.; Ding, X.; Li, J.; Luo, Z.; Hu, Y.; Liu, J.; Dai, L.; Zhou, J.; Hou, C.; Cai, K. Enzyme Responsive Drug Delivery System Based on Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor Therapy in Vivo. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 145102.
- (198) Martínez-Carmona, M.; Lozano, D.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Selective Topotecan Delivery to Cancer Cells by Targeted pH-Sensitive Mesoporous Silica Nanoparticles. *RSC*
-

-
- Adv.* **2016**, *6*, 50923–50932.
- (199) Luo, Z.; Cai, K.; Hu, Y.; Zhao, L.; Liu, P.; Duan, L.; Yang, W. Mesoporous Silica Nanoparticles End-Capped with Collagen: Redox-Responsive Nanoreservoirs for Targeted Drug Delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 640–643.
- (200) Baeza, A.; Guisasola, E.; Ruiz-Hernández, E.; Vallet-Regí, M. Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 517–524.
- (201) An, N.; Lin, H.; Yang, C.; Zhang, T.; Tong, R.; Chen, Y.; Qu, F. Gated Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Enzyme-Triggered Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**.
- (202) Hernandez, R.; Tseng, H. R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. An Operational Supramolecular Nanovalve. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3370–3371.
- (203) Wu, G.; Fang, Y.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *Environ. Heal.* **2004**, *134*, 489–492.
- (204) Liu, R.; Zhao, X.; Wu, T.; Feng, P. Tunable Redox-Responsive Hybrid Nanogated Ensembles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14418–14419.
- (205) Baeza, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Thermoseeds for Interstitial Magnetic Hyperthermia: From Bioceramics to Nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter* **2013**, *25*, 484003.
- (206) Thomas, C. R.; Ferris, D. P.; Lee, J.-H.; Choi, E.; Cho, M. H.; Kim, E. S.; Stoddart, J. F.; Shin, J.; Cheon, J.; Zink, J. I. Noninvasive Remote-Controlled Release of Drug Molecules in Vitro Using Magnetic Actuation of Mechanized Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10623–10625.
- (207) Hauser, A. K.; Wydra, R. J.; Stocke, N. A.; Anderson, K. W.; Hilt, J. Z. Magnetic Nanoparticles and Nanocomposites for Remote Controlled Therapies. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 76–94.
- (208) Alcaide, M.; Ramírez-Santillán, C.; Feito, M. J.; de la Concepción Matesanz, M.; Ruiz-Hernández, E.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M. T. In Vitro Evaluation of Glass-Glass Ceramic Thermoseed-Induced Hyperthermia on Human Osteosarcoma Cell Line. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100A*, 64–71.
- (209) Huang, J. Y.; Chen, M. H.; Kuo, W. T.; Sun, Y. J.; Lin, F. H. The Characterization and Evaluation of Cisplatin-Loaded Magnetite-Hydroxyapatite Nanoparticles (mHAp/CDDP) as Dual Treatment of Hyperthermia and Chemotherapy for Lung Cancer Therapy. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 2399–2410.
- (210) Yoo, D.; Jeong, H.; Noh, S.-H.; Lee, J.-H.; Cheon, J. Magnetically Triggered Dual Functional Nanoparticles for Resistance-Free Apoptotic Hyperthermia. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 13047–13051.
- (211) Li, T. J.; Huang, C. C.; Ruan, P. W.; Chuang, K. Y.; Huang, K. J.; Shieh, D. Bin; Yeh, C. S. In Vivo Anti-Cancer Efficacy of Magnetite Nanocrystal - Based System Using Locoregional Hyperthermia Combined with 5-Fluorouracil Chemotherapy. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7873–7883.
-

-
- (212) Issels, R. D. Hyperthermia Adds to Chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2546–2554.
- (213) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (214) Kim, K. S.; Kim, J.; Lee, J. Y.; Matsuda, S.; Hideshima, S.; Mori, Y.; Osaka, T.; Na, K. Stimuli-Responsive Magnetic Nanoparticles for Tumor-Targeted Bimodal Imaging and Photodynamic/hyperthermia Combination Therapy. *Nanoscale* **2016**.
- (215) Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. K. T.; Jones, S. K.; Dobson, J. Progress in Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. D-Applied Phys.* **2009**, *42*.
- (216) Ruiz-Hernández, E.; López-Noriega, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Magnetic Microspheres for Drug Targeting. *Solid State Sci.* **2008**, *10*, 421–426.
- (217) Arami, H.; Khandhar, A.; Liggitt, D.; Krishnan, K. M. In Vivo Delivery, Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *42*, 4906.
- (218) Issa, B.; Obaidat, I.; Albiss, B.; Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21266–21305.
- (219) Dutz, S.; Kettering, M.; Hilger, I.; Müller, R.; Zeisberger, M. Magnetic Multicore Nanoparticles for Hyperthermia--Influence of Particle Immobilization in Tumour Tissue on Magnetic Properties. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 265102.
- (220) Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U. O.; Mahmoudi, M. Magnetic Fluid Hyperthermia: Focus on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 8–23.
- (221) Arcos, D.; Fal-Miyar, V.; Ruiz-Hernández, E.; Garcia-Hernández, M.; Ruiz-González, M. L.; González-Calbet, J.; Vallet-Regí, M. Supramolecular Mechanisms in the Synthesis of Mesoporous Magnetic Nanospheres for Hyperthermia. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 64–72.
- (222) Ruiz-Hernández, E.; López-Noriega, A.; Arcos, D.; Izquierdo-Barba, I.; Terasaki, O.; Vallet-Regí, M. Aerosol-Assisted Synthesis of Magnetic Mesoporous Silica Spheres for Drug Targeting. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3455–3463.
- (223) Lin, Y. S.; Wu, S. H.; Hung, Y.; Chou, Y. H.; Chang, C.; Lin, M. L.; Tsai, C. P.; Mou, C. Y. Multifunctional Composite Nanoparticles: Magnetic, Luminescent, and Mesoporous. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5170–5172.
- (224) Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T. Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *120*, 8566–8569.
- (225) López-Noriega, A.; Ruiz-Hernández, E.; Stevens, S. M.; Arcos, D.; Anderson, M. W.; Terasaki, O.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Microspheres with Doubly Ordered Core–Shell Structure. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 18–20.
- (226) Ruiz-Hernández, E.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Smart Drug Delivery through DNA/Magnetic Nanoparticle Gates. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1259–1266.
-

-
- (227) Saint-Cricq, P.; Deshayes, S.; Zink, J. I.; Kasko, A. M. Magnetic Field Activated Drug Delivery Using Thermodegradable Azo-Functionalised PEG-Coated Core-shell Mesoporous Silica Nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, *7*, 13168–13172.
- (228) Zhang, Y.; Hou, Z.; Ge, Y.; Deng, K.; Liu, B.; Li, X.; Li, Q.; Cheng, Z.; Ma, P.; Li, C.; *et al.* DNA-Hybrid-Gated Photothermal Mesoporous Silica Nanoparticles for NIR-Responsive and Aptamer-Targeted Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 20696–20706.
- (229) Liu, R.; Fraylich, M.; Saunders, B. R. Thermoresponsive Copolymers: From Fundamental Studies to Applications. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 627–643.
- (230) He, Q.; Zhang, Z.; Gao, F.; Li, Y.; Shi, J. In Vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small* **2011**, *7*, 271–280.
- (231) Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1909–1915.
- (232) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255–270.
- (233) Mahato, R.; Tai, W.; Cheng, K. Prodrugs for Improving Tumor Targetability and Efficiency. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 659–670.
- (234) Connors, T. A.; Knox, R. J. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Stem Cells* **1995**, *13*, 501–511.
- (235) Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Begent, R. H. Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) for Cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 1777–1789.
- (236) Zhang, J.; Kale, V.; Chen, M. Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *AAPS J.* **2015**, *17*, 102–110.
- (237) Karaman, R. *Prodrugs Design: A New Era*; Pharmacology - Research, Safety Testing and Regulation; Nova Science Publishers, Incorporated, 2014.
- (238) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (239) Fágáin, C. Ó. Understanding and Increasing Protein Stability. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1252*, 1–14.
- (240) Tanner, P.; Baumann, P.; Enea, R.; Onaca, O.; Palivan, C.; Meier, W. Polymeric Vesicles: From Drug Carriers to Nanoreactors and Artificial Organelles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1039–1049.
- (241) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- (242) Wang, J.; Byrne, J. D.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. More Effective Nanomedicines through Particle Design. *Small* **2011**, *7*, 1919–1931.
- (243) Aderem, A.; Underhill, D. M. Mechanism of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593–623.
-

-
- (244) Anselmo, A. C.; Zhang, M.; Kumar, S.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Mitragotri, S. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS Nano* **2015**, *9*, 3169–3177.
- (245) Li, G. L.; Möhwald, H.; Shchukin, D. G. Precipitation Polymerization for Fabrication of Complex Core-Shell Hybrid Particles and Hollow Structures. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3628–3646.
- (246) Cui, J.; van Koeveden, M. P.; Müllner, M.; Kempe, K.; Caruso, F. Emerging Methods for the Fabrication of Polymer Capsules. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 14–31.
- (247) Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L. Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5057–5115.
- (248) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *Magn. IEEE Trans.* **1981**, *17*, 1247–1248.
- (249) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (250) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415.
- (251) Urtizberea, A.; Natividad, E.; Arizaga, A.; Castro, M.; Mediano, A. Specific Absorption Rates and Magnetic Properties of Ferrofluids with Interaction Effects at Low Concentrations. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 4916–4922.
- (252) Strandman, S.; Zhu, X. X. Thermo-Responsive Block Copolymers with Multiple Phase Transition Temperatures in Aqueous Solutions. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *42*, 154–176.
- (253) Alarcon, C. de las H.; Pennadam, S.; Alexander, C. Stimuli Responsive Polymers for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276–285.
- (254) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Temperature Responsive Bio-Compatible Polymers Based on Poly(ethylene Oxide) and poly(2-Oxazoline)s. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 686–714.
- (255) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3*, 1215–1242.
- (256) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. A View of the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.
- (257) Parhi, P.; Mohanty, C.; Sahoo, S. K. Nanotechnology-Based Combinational Drug Delivery: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 1044–1052.
- (258) Zintchenko, A.; Ogris, M.; Wagner, E. Temperature Dependent Gene Expression Induced by PNIPAM-Based Copolymers: Potential of Hyperthermia in Gene Transfer. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 766–772.
- (259) Chang, B.; Chen, D.; Wang, Y.; Chen, Y.; Jiao, Y.; Sha, X.; Yang, W. Bioresponsive
-

-
- Controlled Drug Release Based on Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Reductively Sheddable Polymer Shell. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 574–585.
- (260) Veitch, N. C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259.
- (261) Folkes, L. K.; Wardman, P. Oxidative Activation of Indole-3-Acetic Acids to Cytotoxic Species— a Potential New Role for Plant Auxins in Cancer Therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 129–136.
- (262) Yan, M.; Du, J.; Gu, Z.; Liang, M.; Hu, Y.; Zhang, W.; Priceman, S.; Wu, L.; Zhou, Z. H.; Liu, Z.; *et al.* A Novel Intracellular Protein Delivery Platform Based on Single-Protein Nanocapsules. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 48–53.
- (263) Zhao, M.; Biswas, A.; Hu, B.; Joo, K. Il; Wang, P.; Gu, Z.; Tang, Y. Redox-Responsive Nanocapsules for Intracellular Protein Delivery. *Biomaterials* **2011**, *32*, 5223–5230.
- (264) Schlossbauer, A.; Schaffert, D.; Kecht, J.; Wagner, E.; Bein, T. Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12558–12559.
- (265) Watt, A. a. R.; Bothma, J. P.; Meredith, P. MG14-The Supramolecular Structure of Melanin. *Soft Matter* **2009**, *5*, 3754.
- (266) Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. Elucidating the Structure of Poly(dopamine). *Langmuir* **2012**, *28*, 6428–6435.
- (267) Saiz-Poseu, J.; Sedó, J.; García, B.; Benaiges, C.; Parella, T.; Alibés, R.; Hernando, J.; Busqué, F.; Ruiz-Molina, D. Versatile Nanostructured Materials via Direct Reaction of Functionalized Catechols. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2066–2070.
-



Ésta tesis doctoral se centra en el diseño, síntesis y caracterización de nanosistemas para el tratamiento del cáncer basados en la utilización de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs). La quimioterapia tradicional carece de selectividad hacia las masas tumorales, por lo que los fármacos anticancerígenos administrados causan graves efectos secundarios en los pacientes. Las MSNs muestran excelentes propiedades para transportar fármacos antitumorales debido a su alta área superficial y volumen de poro, actuando así como reservorio de citotóxicos hasta la acumulación de las MSNs en el tejido diana. En esta tesis doctoral, se han estudiado diferentes aproximaciones para la administración controlada de fármacos como son: la liberación asistida por campos magnéticos alternos, la generación de agentes citotóxicos *in situ* y la obtención de nanocápsulas de polidopamina; esta última utilizando nanopartículas mesoporosas de sílice como plantilla.

