



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONALES BASADAS EN POLIELECTROLITOS CONJUGADOS

Marta Rubio Camacho

Tutora: Carmen Reyes Mateo Martínez

Cotutora: M^a José Martínez Tomé

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de conocimiento: Química-Física

Grado en Biotecnología

Curso 2015/2016

Resumen: En este trabajo se pone a punto la síntesis de una nueva nanopartícula híbrida multifuncional basada en liposomas compuestos por lípidos zwitteriónicos (EPC y DPPC) o lípidos aniónicos (EPG y DPPG), nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) y polielectrolitos conjugados fluorescentes (CPEs) que emiten en el azul (HTMA-PFP) y en el rojo (HTMA-PFNT). Este estudio se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas biofísicas, principalmente espectroscopía y microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran la encapsulación de las AuNPs en el núcleo hidrofílico de los liposomas mediante ciclos de congelación-descongelación y la conservación de la integridad estructural y comportamiento termotrópico propio de los lípidos de transición tras este proceso. Por otro lado, los resultados revelan la correcta incorporación de ambos polielectrolitos en la bicapa lipídica, con objeto de dotar a la nanopartícula híbrida de propiedades fluorescentes. Además, se ha visto que las nanopartículas no marcan inespecíficamente las membranas de modelos celulares debido, fundamentalmente, a su gran estabilidad. Asimismo, dicha estabilidad se caracterizó en función del tiempo y la temperatura. Ante los resultados obtenidos es posible proponer el uso potencial de estas nanopartículas híbridas fluorescentes como vehículo de transporte, liberación controlada y monitorización mediante bioimagen.

Palabras clave: liposomas, nanopartículas metálicas de oro, HTMA-PFP, HTMA-PFNT, nanopartícula híbrida multifuncional, bioimagen.



Abstract: This work tunes up the synthesis of a new multifunctional hybrid nanoparticle based on liposomes composed of zwitterionic lipids (EPC and DPPC) or anionic lipids (EPG and DPPG), metallic gold nanoparticles (AuNPs) and fluorescent conjugated polyelectrolytes (CPEs) that emit in the blue (HTMA-PFP) and red (HTMA-PFNT). This study was carried out using different biophysical techniques, mainly fluorescence spectroscopy and microscopy. Results show AuNPs encapsulation in the hydrophilic core of liposomes by freeze-thaw cycles and the structural integrity and transition lipid thermotropic behavior preservation after this process. On the other hand, results show the correct incorporation of both polyelectrolytes in the lipid bilayer in order to provide the hybrid nanoparticle of fluorescent properties. Furthermore, it has been found that nanoparticles don't labeled nonspecifically cell membranes models, mainly due to its high stability. Also, this stability was characterized in function of time and temperature. The results obtained allow to propose the potential use of these fluorescent hybrid nanoparticles as drug delivery, controlled release and monitoring by bioimaging.

Keywords: liposomes, metallic gold nanoparticles, HTMA-PFP, HTMA-PFNT, multifunctional hybrid nanoparticle, bioimaging.

Índice

Introducción	5
- Liposomas	5
- Nanopartículas metálicas de oro (AuNPs)	6
- Sonda fluorescente	6
- Poliectrolitos conjugados fluorescentes (CPEs)	7
- CPEs basados en fluoreno	7
Antecedentes y objetivos	8
- Sistemas liposomales para transporte de fármacos	8
- Liberación controlada con nanopartículas metálicas de oro	8
- HTMA-PFP y del HTMA-PFNT: Síntesis, caracterización e interacción con liposomas	9
- HTMA-PFP	9
- HTMA-PFNT	9
- Objetivos del presente trabajo	10
Materiales y métodos	11
- Materiales	11
- Métodos	11
Resultados y Discusión	14
- Caracterización de los distintos componentes	14
o Liposomas	14
o Nanopartículas metálicas de oro (AuNPs)	15
o Polímeros conjugados HTMA-PFP y HTMA-PFNT	16
- Síntesis de las nanopartículas híbridas multifuncionales	18
o Puesta a punto del método de encapsulación de las AuNPs	18
▪ Encapsulación espontánea	18
▪ Ciclos de congelación-descongelación	19
o Sistema lipídico	22
o Medidas de anisotropía	24
- Incorporación de los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT	25
o Efectos sobre la centrifugación	25
o Adición de los polímeros a los liposomas con AuNPs	26
o Bioimagen: marcaje de modelos celulares	28
- Estudios de estabilidad	29
- Aplicaciones biotecnológicas	32
Conclusión y proyección futura	33
Bibliografía	34
Anexo	36

Abreviaturas

- **EPC** L- α -fosfatidilcolina
- **EPG** L- α -fosfatidilglicerol
- **DPPC** 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
- **DPPG** 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal de amonio
- **AuNPs** Nanopartículas metálicas de oro
- **CPEs** Polielectrolitos conjugados (del inglés *conjugated polyelectrolytes*)
- **HTMA-PFP** Poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]fluoreno-fenileno}
- **HTMA-PFNT** Copoli- {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-(naftol[2,3c]-1,2,5-tiadiazol)}
- **FRET** Fenómeno de transferencia de energía (del inglés *fluorescence resonance energy transfer*)
- **MLV** Vesícula multilamelar (del inglés *multilamellar vesicle*)
- **SUV** Vesícula unilamelar pequeña (del inglés *small unilamellar vesicle*)
- **LUV** Vesícula unilamelar grande (del inglés *large unilamellar vesicle*)
- **GUV** Vesícula unilamelar gigante (del inglés *giant unilamellar vesicle*)
- **PC** Fosfatidil colina
- **PE** Fosfatidil etanolamina
- **SM** Esfingomielina
- **PA** Ácido fosfatídico
- **PG** Fosfatidil glicerol
- **PS** Fosfatidil serina
- **PI** Fosfatidil inositol
- **CL** Cardiolipina
- **T_c** Temperatura de transición de fase
- **SPR** Resonancia de plasmón superficial (del inglés *surface plasmon resonance*)
- **QDs** Puntos cuánticos (del inglés *quantum dot*)
- **TP** Tampón fosfato (50 mM, pH 7,3)
- **DPH** Difenilhexatrieno
- **TEM** Microscopía electrónica de transmisión (del inglés *transmission electron microscopy*)
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **<r>** Anisotropía
- **DLS** Dispersión de luz dinámica (del inglés *dynamic light scattering*)
- **NPs** Nanopartículas

Introducción

Recientemente, el desarrollo de nanocompuestos multifuncionales que integran diferentes propiedades o funciones en una sola entidad ha atraído ampliamente la atención. Durante la última década se han empleado diferentes estrategias y materiales para acoplar las funciones de transporte de fármacos (*drug delivery*), liberación controlada y bioimagen en un único componente construido a escala nanométrica con resultados realmente prometedores [1-3].

En este trabajo se propone la síntesis de una nueva plataforma nanométrica multifuncional, en la cual se integran las funciones previamente mencionadas, mediante el empleo de vesículas lipídicas, nanopartículas metálicas de oro y polímeros conjugados fluorescentes.

Liposomas

Los liposomas son herramientas muy versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina, son vesículas preparadas artificialmente —se forman espontáneamente al poner en contacto lípidos con agua debido a la estructura anfipática de los mismos—, de talla nanométrica (aunque algunas pueden alcanzar tamaños mayores) y forma aproximadamente esférica, con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas [4].

Atendiendo a las características estructurales, y en particular al número de bicapas y al tamaño de las mismas, los liposomas se pueden clasificar en vesículas multilamelares (del inglés *multilamellar vesicles* MLV, 0,1-5 μm) o unilamelares, estas últimas pueden ser de diámetro pequeño (del inglés *small unilamellar vesicles* SUV, <100 nm), de diámetro grande (del inglés *large unilamellar vesicles* LUV, 100-500 nm) o gigantes (del inglés *giant unilamellar vesicles* GUV, >1 μm) [4].

Por otro lado, las cabezas polares de los lípidos biológicamente relevantes pueden ser zwitteriónicas: fosfatidil colina (PC), fosfatidil etanolamina (PE), esfingomiolina (SM); cargadas negativamente: ácido fosfatídico (PA), fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI), cardiolipina (CL) y glicolípidos, cargados o no negativamente [4].

Los lípidos, a su vez, a bajas temperaturas se encuentran en un estado *gel cristalino* o *fase gel* de estructura más bien rígida donde su movilidad está restringida. Conforme aumenta la temperatura, aumenta la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y aparecen ondulaciones en la superficie de los liposomas; pretransición de fase. Y, finalmente, cuando la temperatura supera la temperatura de transición de fase (T_c) del liposoma, este sufre una transición termotrópica hacia un estado *gel líquido* o *fase fluida* donde la fluidez de la bicapa es aún mayor debido al aumento de la libertad rotacional de las colas de los fosfolípidos (Figura 1). Hay que señalar que la temperatura a la cual las cadenas de los ácidos grasos se funden, denominada temperatura de transición de fase (T_c), es función de las propiedades físico-químicas de la bicapa y de la

naturaleza del medio. Además, esta transición desaparece cuando la bicapa está constituida por una mezcla de lípidos distintos y, en este caso, la membrana se encuentra en *fase fluida* a cualquier temperatura [5].

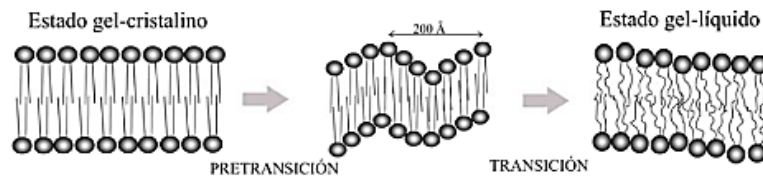


Figura 1. Transición de fase lipídica

Nanopartículas metálicas de oro (AuNPs)

Durante las últimas décadas, las nanopartículas metálicas han recibido un creciente interés ya que sus propiedades físicas y químicas pueden ser controladas mediante su tamaño, morfología y composición. Concretamente, las nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) presentan una gran cantidad de ventajas — facilidad para modificar su superficie, biocompatibilidad, naturaleza inerte químicamente y mínima toxicidad— que las convierte en las candidatas ideales para aplicaciones biomédicas [6].

En cuanto a su preparación, las AuNPs pueden ser obtenidas a partir de diferentes materiales y mediante métodos relativamente simples. Concretamente, existen dos tipos de enfoques: de arriba hacia abajo (del inglés *top down*), basado en la fragmentación de materiales hasta la obtención de nanopartículas; y de abajo hacia arriba (del inglés *bottom-up*), basado en la construcción de nanopartículas a partir del nivel atómico, siendo la reducción de tetracloroaurato (AuCl_4^-) con citrato de sodio en solución acuosa caliente la estrategia más empleada actualmente [7].

Por otro lado, la luz visible es capaz de excitar los electrones de las AuNPs generando un estado de oscilación colectiva denominado resonancia de plasmón superficial (SPR), lo que les permite absorber y dispersar la luz visible en función de su tamaño, forma y estado de agregación. Esta energía absorbida es convertida en calor, lo que permite que sean detectadas mediante diversos tipos de técnicas como pueden ser la microscopía óptica de contraste de fase, la microscopía de campo negro y la espectroscopía de absorción [6,7].

Sonda fluorescente

El diseño y desarrollo de nuevos marcadores fluorescentes con elevada sensibilidad es de gran interés en diagnóstico clínico, identificación de células cancerosas, detección de células patogénicas, técnicas inmunofluorescentes, monitorización de rutas catalíticas o seguimiento en la administración, transporte y liberación de fármacos a través de las membranas o el citoplasma. Estos marcadores deben ser materiales altamente fluorescentes, solubles en agua, fotoestables, fácilmente bioconjugables, además de presentar buena biocompatibilidad, buena resolución espacial y mínima perturbación de los sistemas biológicos [8].

La mayoría de los materiales fluorescentes diseñados con este fin (generalmente pequeños fluoróforos, proteínas fluorescentes y puntos cuánticos (QDs) semiconductores) presentan propiedades interesantes, pero también importantes desventajas. Por ejemplo, las moléculas fluorescentes pequeñas y las proteínas fluorescentes por lo general son inestables al ser irradiadas (*photobleaching*), y los QDs, que son mucho más estables, por lo general incluyen metales pesados como Cd y Se, que son susceptibles de liberarse y ser citotóxicos.

Para superar estas limitaciones, se están desarrollando nuevos materiales fluorescentes con propiedades mejoradas (no tóxicos, estables y con elevada sensibilidad). Entre ellos, los polielectrolitos conjugados (CPEs) son candidatos interesantes por sus propiedades únicas [9-11].

- *Polielectrolitos conjugados fluorescentes (CPEs)*

Los polielectrolitos conjugados (CPEs) son polímeros π -conjugados compuestos por un esqueleto rígido o semirrígido que alterna enlaces simples y dobles —facilitando la rápida migración inter e intracatenaria de los electrones, lo que da lugar a respuestas ópticas colectivas y señales amplificadas en comparación con los pequeños fluoróforos—, y por cadenas laterales con grupos ionizables cargados positiva o negativamente para facilitar su solubilización en agua [9-11].

La mayoría de los CPEs presentan una alta fotoestabilidad y una baja citotoxicidad, además de tener la capacidad de autoensamblarse espontáneamente mediante interacciones reversibles, electrostáticas y/o hidrófobas con otras especies, generalmente de carga opuesta, dando lugar a estructuras supramoleculares [9-11].

Dadas estas propiedades, los CPEs han despertado en la última década un considerable interés como nuevos materiales para el desarrollo de biosensores, la detección de biomoléculas y, más recientemente, como sondas fluorescentes para bioimagen [12].

- *CPEs basados en fluoreno*

Estos CPEs presentan un esqueleto principal hidrófobo y rígido compuesto por polifluoreno con cadenas laterales flexibles cargadas positiva o negativamente (Figura 2). Los CPEs catiónicos basados en fluoreno presentan una elevada afinidad por biomoléculas aniónicas tales como las proteínas o el ADN —lo que ha permitido el desarrollo de sensores—, además de por membranas celulares aniónicas [13-15].

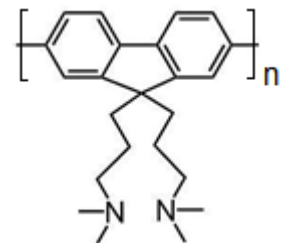


Figura 2. Esqueleto de CPEs

En general, la ventaja de estos CPEs radica en que presentan altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, alta fotoestabilidad, emisión en el azul, una excelente estabilidad térmica y frente a agentes oxidantes, así como una buena accesibilidad sintética [11,13,14].

Antecedentes y objetivos

Sistemas liposomales para transporte de fármacos

Los primeros liposomas fueron descritos en 1965 y desde entonces han sido utilizados como sistemas por excelencia en transporte y liberación de fármacos. Estos sistemas son capaces de incrementar el índice terapéutico de los fármacos mediante la modificación de su absorción, metabolismo, vida media y toxicidad, ya que la administración de éstos queda regulada fundamentalmente por las propiedades del transportador en lugar de por las características físico-químicas intrínsecas del fármaco [20].

Las ventajas que presenta el uso de sistemas liposomales son varias entre las cuales cabe destacar la disminución de los efectos secundarios —ya que los liposomas están compuestos por lípidos biodegradables, biológicamente inertes y no inmunogénicos—; no producen reacciones pirogénicas o antigénicas y presentan una toxicidad limitada [16].

En cuanto a la localización de los fármacos, decir que aquellos de naturaleza hidrofóbica quedan retenidos en el interior de la bicapa de los liposomas mientras que los de naturaleza hidrofílica o bien quedan atrapados en el núcleo acuoso del liposoma o bien en la superficie de estos [16].

Liberación controlada con nanopartículas metálicas de oro

La liberación de fármacos a partir de los transportadores sigue siendo un desafío clave para las aplicaciones clínicas, por ello se han estudiado una gran variedad de materiales y estímulos para la liberación de medicamentos, siendo la irradiación de AuNPs una de las opciones más atractivas y prometedoras actualmente [17-19].

La encapsulación de AuNPs capaces de absorber luz y convertirla en calor, estimulando así la transición de fase de los liposomas e incrementando la permeabilidad de la membrana de estos, demostró que era posible liberar calceína a partir de liposomas de manera controlada. Además, se observó que las AuNPs de naturaleza hidrofóbica —insertadas en la bicapa lipídica— presentaban una liberación mayor de calceína en comparación con las de naturaleza hidrofílica —insertadas en el núcleo hidrofílico de los liposomas. Ello era debido a que las AuNPs hidrofóbicas estaban en contacto directo con los lípidos de manera que el calor generado era transmitido con mayor eficiencia, fluidificando la bicapa y haciéndola más permeable [18].

Por otro lado, la penetración de luz en los tejidos humanos depende de la longitud de onda empleada: longitudes de onda entre 700-900 nm son mucho más efectivas que por debajo de 400 nm. Además, el uso de longitudes de onda cercanas al UV puede ser peligroso para los tejidos. Dado que la absorción de luz por parte de las AuNPs depende de la forma y diámetro de estas, Lajunen et al. han desarrollado un sistema capaz de liberar su contenido irradiando las AuNPs —30-50 nm— con longitudes de onda del espectro visible e infrarrojo (656 y 850 nm), mucho menos dañinas [19].

HTMA-PFP y del HTMA-PFNT: Síntesis, caracterización e interacción con liposomas

El grupo con el que he llevado a cabo este estudio ha sintetizado y caracterizado mediante técnicas biofísicas dos CPEs catiónicos basados en fluoreno capaces de emitir en diferentes longitudes de onda: HTMA-PFP (emisión azul: 390-500 nm) [13] y HTMA-PFNT (emisión roja: 550-800 nm) [14].

- HTMA-PFP

El polielectrolito conjugado catiónico bromuro de poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]fluoreno-fenileno} (HTMA-PFP) (Figura 3) es un polifluoreno parcialmente soluble en agua constituido por una fracción hidrofóbica —cadena principal aromática y cadenas laterales alquílicas—, y una fracción hidrofílica —aminas cuaternarias catiónicas, responsables de las interacciones electrostáticas. Debido su estructura, el polielectrolito tiende a establecer interacciones electrostáticas no específicas con las especies de carga opuesta, las cuales pueden ser monitorizadas mediante cambios en la absorción y en la fluorescencia intrínseca [13].

- HTMA-PFNT

El polielectrolito conjugado catiónico bromuro de copoli-{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-(naftol[2,3c]-1,2,5-tiadiazol)} (HTMA-PFNT) (Figura 3) es un polifluoreno parcialmente soluble en agua basado en la incorporación de nafta[2,3c][1,2,5]tiadiazol en la cadena principal de fluoreno para incrementar la emisión batocrómica, extendiendo así el espacio de conjugación en el esqueleto del polímero [14].

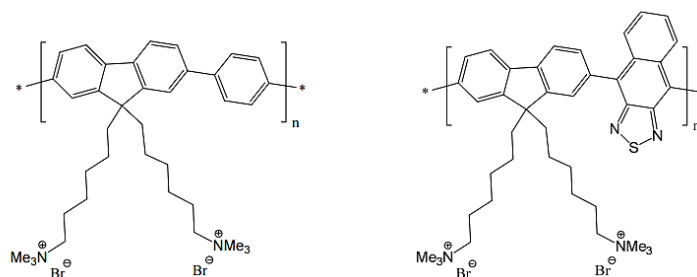


Figura 3. Estructura química del HTMA-PFP (izquierda) y HTMA-PFNT (derecha).

Recientemente se ha explorado la capacidad de estos compuestos para interactuar con vesículas lipídicas aniónicas y zwitteriónicas y actuar como sonda de membrana (Figura 4). Los resultados de estos trabajos indicaron que los polielectrolitos HTMA-PFP y HTMA-PFNT interactúan rápidamente con los dos tipos de membranas, conservando la integridad estructural y la morfología esférica propia de las bicapas lipídicas, así como una diferente ubicación final en dichas membranas. Mientras que en la membrana aniónica el polímero queda embebido en el interior de la bicapa lipídica, en el sistema zwitteriónico permanece cerca de la

superficie, formando agregados que son sensibles al estado físico de la bicapa lipídica. A partir de estos resultados se concluyó que la naturaleza de la interacción entre los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT y las membranas lipídicas depende de la carga de los lípidos. Hay que destacar que aunque en un principio se esperaba que las interacciones electrostáticas fueran las responsables de la alta afinidad del polímero por membranas aniónicas, la ubicación final del polímero, que está bien integrado en el núcleo de la bicapa, indica que las fuerzas hidrófobas también contribuyen a la solubilización, reducción del estado de agregación y al aumento del rendimiento cuántico fluorescente del polímero, en comparación con membranas zwitteriónicas [14,15]. Todos estos resultados llevaron a proponer el uso de ambos polielectrolitos como marcadores fluorescentes de membrana.

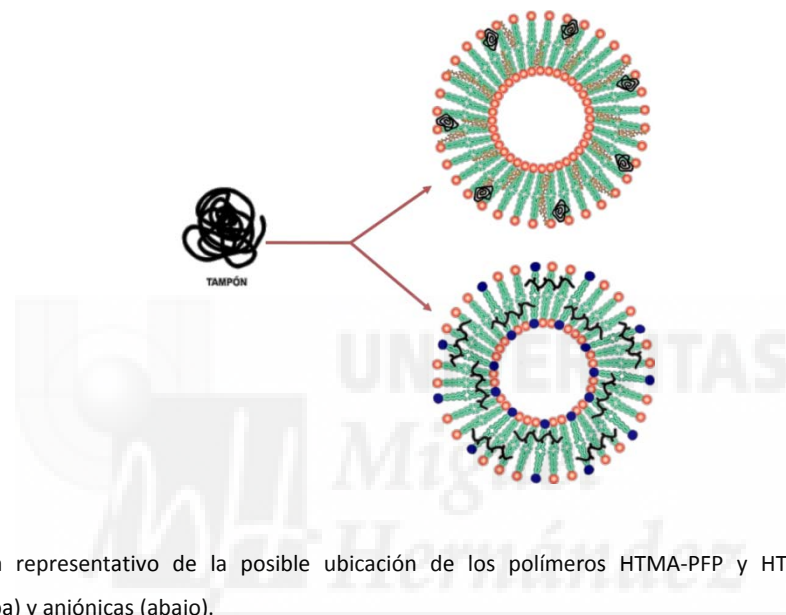


Figura 4. Esquema representativo de la posible ubicación de los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT en vesículas zwitteriónicas (arriba) y aniónicas (abajo).

Objetivos del presente trabajo

Este trabajo tiene como objetivo utilizar liposomas, AuNPs y CPEs basados en anillos de fluoreno como base para preparar nanopartículas híbridas multifuncionales que integren las funciones de transporte de fármacos, liberación controlada y bioimagen.

Específicamente, este estudio persigue los siguientes objetivos:

1. Caracterización de las propiedades de las AuNPs y CPEs sintetizados en el laboratorio.
2. Interacción de las vesículas liposomales, AuNPs y CPEs con objeto de obtener nanopartículas híbridas multifuncionales.
3. Evaluación de las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichas nanopartículas.

Materiales y métodos

Materiales

Los fosfolípidos sintéticos: L- α -fosfatidilcolina (EPC), L- α -fosfatidilglicerol (sal de sodio) (EPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal de amonio (DPPG) para la formación de los liposomas, y los reactivos químicos $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ y HAuCl_4 para la síntesis AuNPs se adquirieron de Sigma-Aldrich.

La sonda fluorescente difenilhexatrieno (DPH) se obtuvo de Molecular Probes, ahora Invitrogen.

Los CPEs catiónicos HTMA-PFP ($M_n[\text{g/mol}] = 4170$; $M_w[\text{g/mol}] = 8340$) y HTMA-PFNT ($M_n[\text{g/mol}] = 4507$; $M_w[\text{g/mol}] = 8990$) se obtuvieron y caracterizaron por miembros del laboratorio. Resumidamente, los lotes de los polímeros neutros, poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]fluoreno-fenileno} y copoli-{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-(naftol[2,3c]-1,2,5-tiadiazol)}, se sintetizaron mediante la reacción de acoplamiento de Suzuki, utilizando Pd(II) como catalizador, y se trataron con trimetilamina en fase gaseosa para obtener los correspondientes CPEs HTMA-PFP y HTMA-PFNT [4][7]. Las soluciones stock de HTMA-PFP y HTMA-PFNT se prepararon en DMSO, con una concentración final de $3.65 \cdot 10^{-4}$ M (en unidades repetidas) y se almacenaron a -20°C .

El tampón fosfato (50 mM, pH 7,3) se preparó con agua que estaba dos veces destilada y desionizada utilizando el equipamiento Milli-Q (Millipore, Madrid).

Métodos

Formación de vesículas multilamelares (MLVs): En primer lugar, se disolvieron los lípidos en cloroformo y se secó el disolvente con argón (Ar), formándose una fina película lipídica en el fondo del vial. A continuación, se resuspendió la película de lípidos con 1 ml de agua Milli-Q a temperatura ambiente para lípidos sin transición de fase —EPC y EPG— o por encima de la temperatura de transición de fase (50°C) para lípidos con dicha transición —DPPC y DPPG—, se agitó en el vórtex para favorecer la resuspensión y se adicionaron 3 ml de agua Milli-Q hasta alcanzar una concentración final de 1 mM de lípido.

Formación de vesículas unilamelares grandes (LUVs): Se siguió el procedimiento anterior hasta la obtención de MLVs y, a partir de éstas, se prepararon LUVs por extrusión a presión a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras (Nucleopore, Cambridge, MA, USA) (Figura 5).

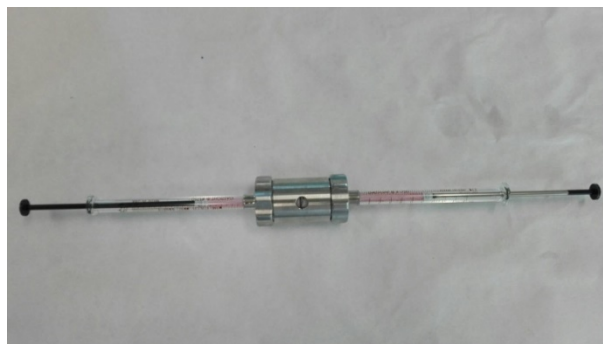


Figura 5. Extrusión a presión a través de filtros de policarbonato

Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs): En primer lugar, se prepararon las disoluciones HAuCl_4 1mM y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ 38.8 mM con agua Milli-Q. A continuación, se calentaron 20 ml de HAuCl_4 hasta su ebullición en agitación constante. Finalmente, se añadieron 2 ml de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ y se dejó hirviendo y agitando durante 10 min hasta que la disolución adquirió un profundo color rojo. Se enfrió a temperatura ambiente.

Preparación de vesículas multilamelares (MLVs) o unilamelares grandes (LUVs) con nanopartículas de oro (AuNPs): Se siguió el procedimiento de síntesis de MLVs anterior pero en lugar de resuspender con un 1 ml de agua Milli-Q, se resuspendió con un 1 ml de la disolución de AuNPs previamente preparada. Seguidamente se llevaron a cabo ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido (N_2) para encapsular las AuNPs en el interior de las vesículas lipídicas: 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido durante 2 min seguido de su descongelación en agua destilada a 37°C . En el caso de querer LUVs con AuNPs, se pasó por el extruder.

Preparación de vesículas liposomales fluorescentes con AuNPs: Las alícuotas de HTMA-PFP y HTMA-PFNT en DMSO se añadieron externamente a la suspensión de vesículas liposomales. En todos los casos la proporción de DMSO en la muestra acuosa fue siempre menor que 1% (v/v). En primer lugar, se atemperaron y sonicaron los CPEs HTMA-PFP y HTMA-PFNT almacenados a -20°C para homogenizar su contenido. A continuación, al precipitado resuspendido en agua MilliQ —obtenido tras centrifugar los liposomas con AuNPs sintetizados en el apartado anterior a 14.300 rpm durante 10 minutos— se le adicionó 3 ó 6 μM de polímero azul (HTMA-PFP) o rojo (HTMA-PFNT), se agitó en el vórtex y se dejó incubar durante 20 minutos.

Preparación de vesículas unilamelares gigantes (GUVs): Las vesículas unilamelares gigantes se prepararon siguiendo el método de electroformación. En primer lugar, se pipetearon 0.6 μl de una disolución de EPC 1 mM en cada uno de los electrodos —seis en nuestro caso— y se dejaron secar a vacío durante 1h 15 min. Una vez secos los electrodos, se pipetearon 450 μl de una disolución de sacarosa 200 mM previamente preparada en cada uno de los pocillos, se taparon con los electrodos y se conectaron a la corriente: 2 h a 10 Hz y 7 V, seguido de 30 min a 1 Hz y 7 V. Transcurrido dicho tiempo, se transfirió el contenido final de los pocillos a un tubo Corning con 7 ml de glucosa 200 mM previamente preparada y se dejó en nevera a 10°C durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó la glucosa con cuidado de no arrastrar los GUVs de la parte inferior del tubo. En este trabajo los GUVs se emplearán como modelos celulares.

Espectros de absorción y fluorescencia: Las mediciones de absorción se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón). Las mediciones de fluorescencia se realizaron en cubetas de cuarzo de 10 mm x 10 mm utilizando un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI, Birmingham, Nueva Jersey, EE.UU) en interfaz con una célula Peltier. Las rendijas y longitudes de onda de emisión y de excitación empleadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendijas y longitudes de onda de emisión y excitación

	HTMA-PFP	HTMA-PFNT	DPH
	$\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 510 \text{ nm}$	$\lambda_{exc}: 360 \text{ nm}$
Espectro de emisión	$\lambda_{emi} = 390\text{-}500 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 550\text{-}800 \text{ nm}$	$\lambda_{emi}: 370\text{-}550 \text{ nm}$
	Rendijas: 0.4-0.7	Rendijas: 1.25-2.0	r. 0.75-1.25
	$\lambda_{emi} = 420 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 650 \text{ nm}$	
Espectro de excitación	$\lambda_{exc} = 300\text{-}410 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 450\text{-}600 \text{ nm}$	
	Rendijas: 0.4-0.7	Rendijas: 1.25-2.0	

Mediciones de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario: La anisotropía en estado estacionario $\langle r \rangle$, definida como:

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{VV} - GI_{VH})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})}$$

se obtuvo utilizando polarizadores Glan-Thompson incorporados en el espectrofluorímetro mediante la medición de los componentes verticales y horizontales de la emisión de fluorescencia con excitación vertical y horizontal al eje de emisión. El factor G ($G = I_{HV}/I_{HH}$) corrige los sesgos de transmisividad introducidos por el sistema de detección.

Medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS): El tamaño de las partículas se estudió mediante técnicas de DLS, utilizando un Malvern Zetasizer Nano-ZS equipado con un láser monocromático de Helio-Neon 4 mW ($\lambda = 633 \text{ nm}$) como fuente de luz, con un ángulo de dispersión de 173° para las medidas de tamaño. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y en cubetas desechables.

Medidas de microscopía: Las imágenes de microscopía de fluorescencia se adquirieron con un microscopio invertido Leica DMI 3000B equipado con una fuente de luz compacta Leica EL6000 y una cámara digital Leica DFC3000G. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo de 63x con 0.7 de magnificación y filtros DAPI (Ex BP 350/50, Em: BP 460/50) o DsRed (Ex BP555/25, Em BP 620/60). La adquisición de datos se controló manualmente y el procesamiento de datos con la aplicación Leica Suite AF6000 Module Systems. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se adquirieron mediante un microscopio Jeol 1011 (Jeol, Japón), trabajando a 80 kV. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de estas sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón y dejándolas secar al aire previamente a su visualización. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara Gatan Erlangshen ES500W.

Resultados y discusión

Caracterización de los distintos componentes

Previamente a la síntesis de las nanopartículas híbridas fluorescentes, se estudió el comportamiento de cada componente por separado —liposomas, AuNPs y CPEs: HTMA-PFP y HTMA-PFNT.

- Liposomas

Para el estudio de los liposomas, se prepararon LUVs de EPG 1 mM mediante extrusión a presión a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras. Señalar que los resultados obtenidos fueron muy similares cuando el estudio se llevó a cabo con EPC a la misma concentración. El tamaño final de las vesículas se determinó después de centrifugar a 14.300 rpm durante 10 min mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Tabla 2).

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico de LUVs (EPG) 1 mM determinado por DLS una vez centrifugada la muestra

Fracción	Media (nm)	Std. Error	Std. Desviación
Sobrenadante	157.96	1.72	2.98
Precipitado	267.80	5.40	9.36

Los resultados obtenidos mostraron un tamaño de vesícula ligeramente superior en el precipitado. Con el objetivo de determinar cualitativamente la población de LUVs en cada una de las fracciones a partir de la luz dispersa, se recogió un espectro de absorción entre 350-700 nm (Figura 6).

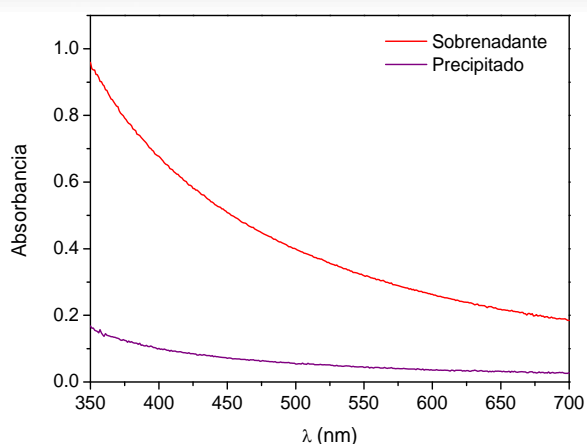


Figura 6. Determinación cualitativa de LUVs de EPG 1 mM en el sobrenadante (rojo) y precipitado (lila).

A la luz de los resultados obtenidos se concluyó que la mayoría de los LUVs no podían ser bajados por centrifugación a 14.300 rpm durante 10 min, solo aquellos con un tamaño de vesícula superior —una mínima parte— quedaban retenidos en el precipitado. Este resultado fue de gran interés ya que nos permitió, como se verá más adelante, utilizar la centrifugación como herramienta para separar vesículas con AuNPs en su interior de aquellas libres de AuNPs.

Por otro lado, para confirmar la existencia de los LUVs, se llevaron a cabo estudios de solubilización de las membranas lipídicas mediante la adición de Tritón 10% —detergente no iónico— sobre la fracción de sobrenadante (Figura 7).

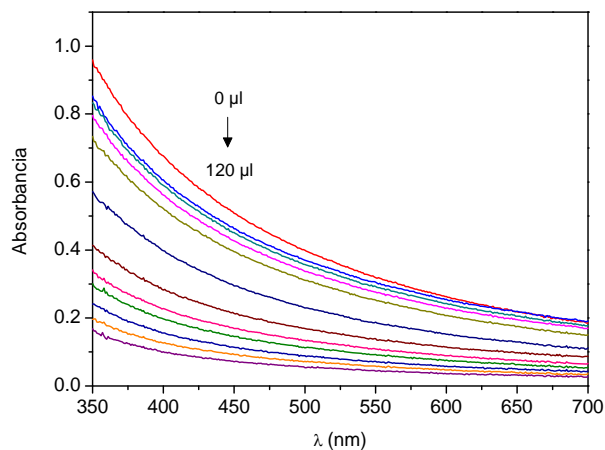


Figura 7. Adiciones crecientes de Tritón 10% sobre LUVs de EPG 1 mM.

Como se puede apreciar en la Figura 7, conforme se va adicionando Tritón 10% a la muestra, la luz dispersa disminuye lo que pone de manifiesto la ruptura de las membranas lipídicas y, por tanto, una menor concentración de liposomas, confirmando la existencia de los mismos en el sobrenadante.

- Nanopartículas metálicas de oro (AuNPs)

Las AuNPs fueron sintetizadas mediante la reducción de HAuCl_4 1 mM por $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ 38.8 mM y su tamaño se determinó, al igual que para las vesículas liposomales, mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Tabla 3).

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico de AuNPs determinado por DLS

Media (nm)	Std. Error	Std. Desviación
40.57	0.47	0.82

Por otro lado, se recogió el espectro de absorción de las AuNPs entre 400-700 nm (Figura 8), en el cual se puede apreciar la homogeneidad en cuanto al tamaño poblacional —pico relativamente estrecho— y el máximo de absorción, λ_{max} , en torno a 525 nm, que es el esperado para el tamaño medido por DLS.

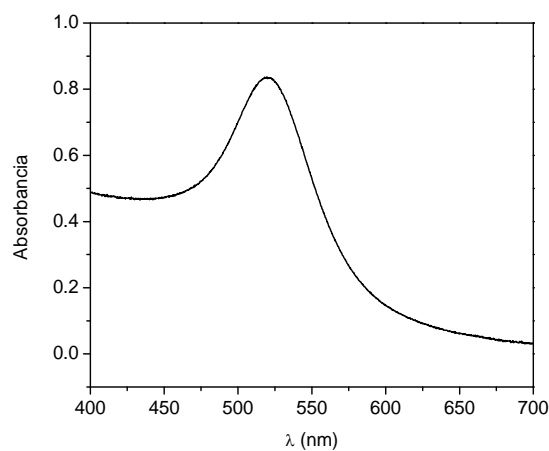


Figura 8. Espectro de absorción de las AuNPs

- Polímeros conjugados HTMA-PFP y HTMA-PFNT

En estudios previos a la realización de este trabajo [13,14], ya se comprobó que el HTMA-PFP y el HTMA-PFNT cuando se disolvían en agua se auto-ensamblaban en agregados, tal y como ocurre con el resto de los CPEs. Esta agregación está dominada por las interacciones hidrofóbicas intercatenarias y conduce a una disminución de las intensidades de emisión y al desplazamiento hacia el rojo de los espectros de absorción, excitación y emisión, al compararlos con los espectros de los CPEs en disolventes con una polaridad adecuada (como el etanol). Estos efectos observados en los polímeros al ser disueltos en agua se deben, probablemente, a la transferencia de electrones entre cadenas, lo que extiende el grado de conjugación de electrones.

En este estudio caracterizamos los espectros de los dos CPEs en agua, tampón fosfato y etanol para confirmar este comportamiento. Los espectros de absorción obtenidos para el HTMA-PFP y el HTMA-PFNT en los distintos disolventes se muestran en la Figura 9 y Figura 10 respectivamente. También se obtuvieron los espectros de emisión (Figura 11 y Figura 12) y excitación de fluorescencia¹ —similares a los de absorción.

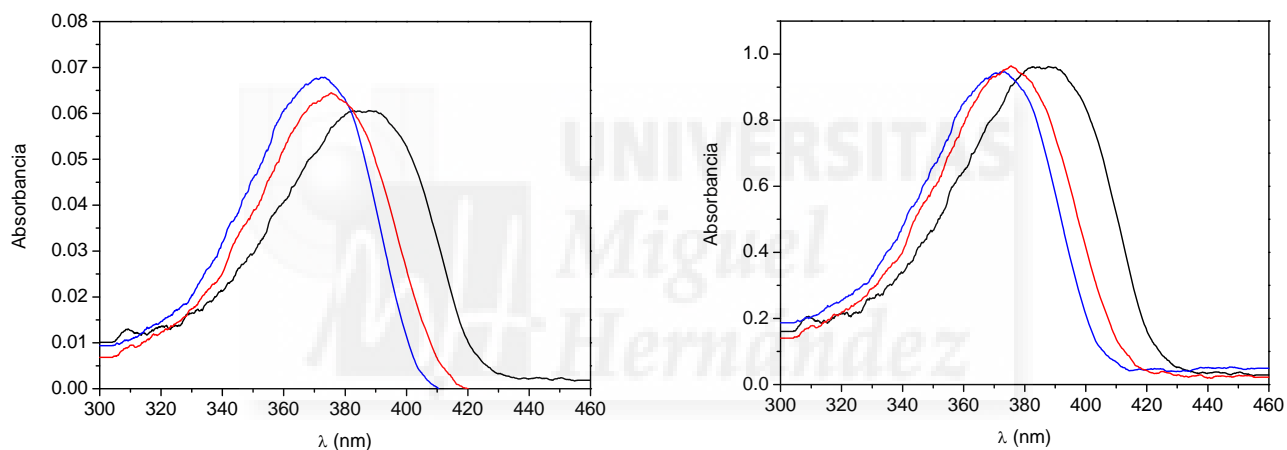


Figura 9. Espectro de absorción del HTMA-PFP 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP (negro); agua MilliQ (rojo) y etanol, EtOH (azul).

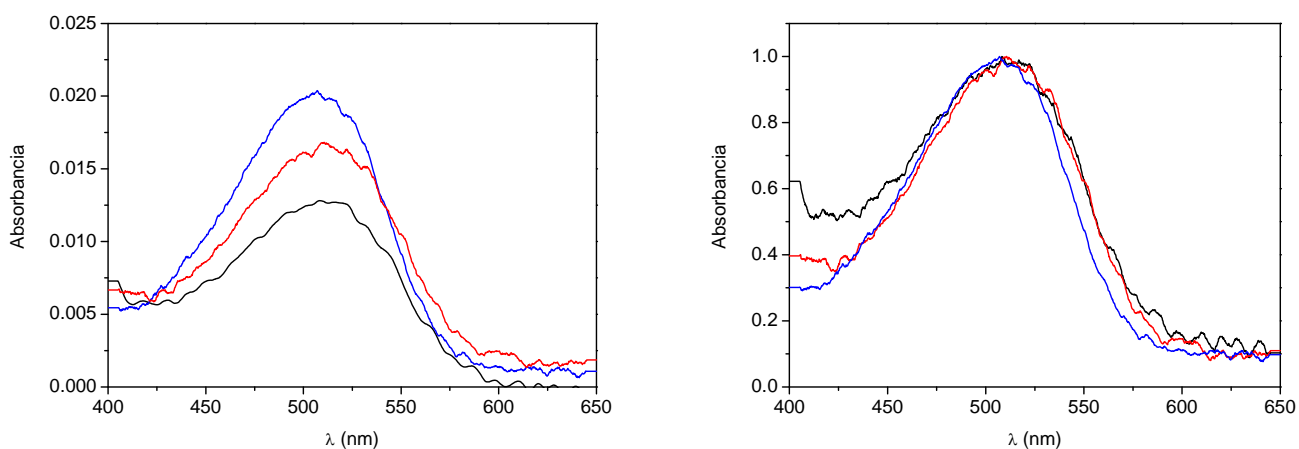


Figura 10. Espectro de absorción del HTMA-PFNT 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP (negro); agua MilliQ (rojo) y etanol, EtOH (azul).

¹ Los espectros de excitación de fluorescencia del HTMA-PFP y HTMA-PFNT se muestran en el Anexo Figura 29 y 30.

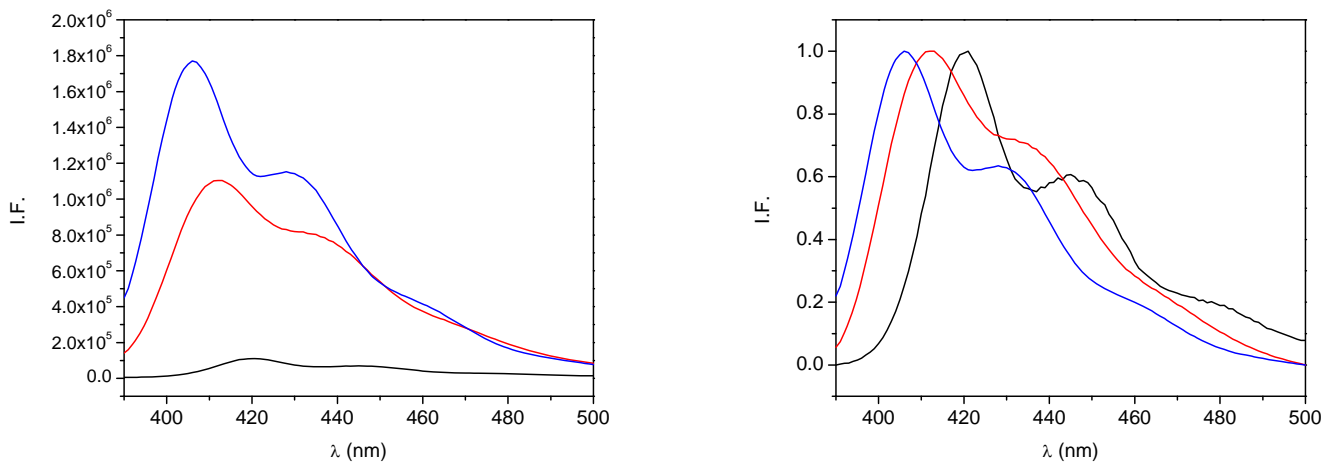


Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP (negro); agua MilliQ (rojo) y etanol, EtOH (azul).

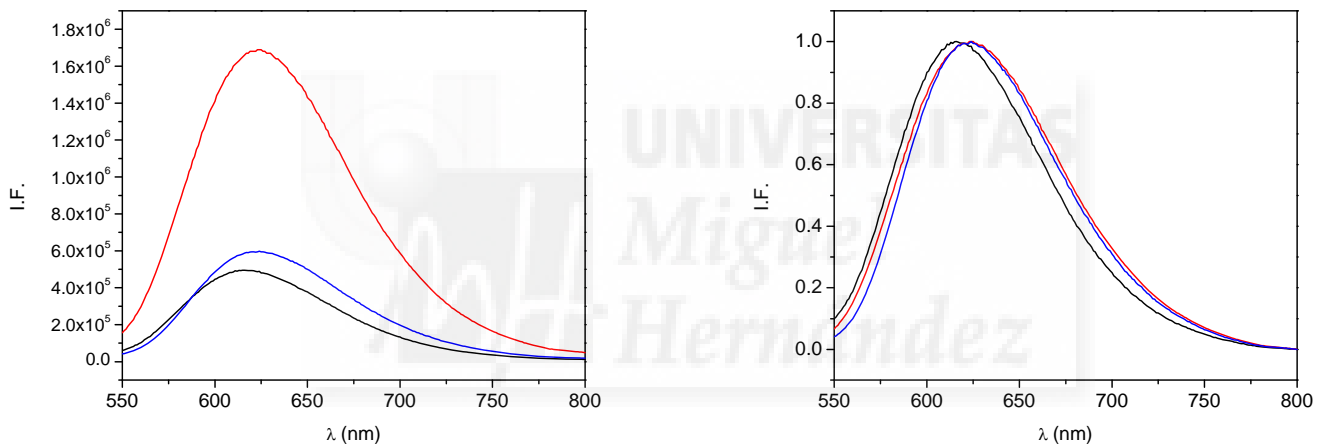


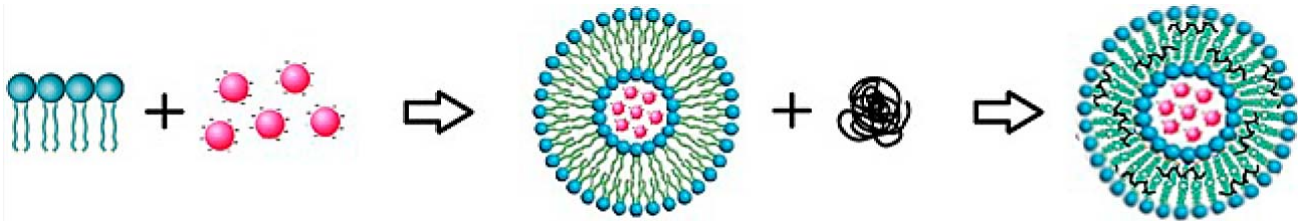
Figura 12. Espectro de emisión de fluorescencia del HTMA-PFNT 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP (negro); agua MilliQ (rojo) y etanol, EtOH (azul).

Tal y como se esperaba, los espectros registrados en agua estaban ligeramente desplazados al rojo con respecto a los registrados para el etanol, lo que sugiere la existencia de agregados del polímero en agua. En cuanto al polímero disuelto en tampón, se observó un desplazamiento adicional hacia el rojo, una mayor amplitud de la banda de excitación y una mayor resolución de la estructura vibracional del espectro de emisión. Estos efectos pueden explicarse por la existencia de interacciones electrostáticas no específicas entre los CPEs y las especies aniónicas contenidas en el tampón para producir complejos neutrales. Al neutralizarse dichas cargas, el polímero exhibe una baja solubilidad, lo que da lugar a la formación de grandes agregados. Por otro lado, destacar que la disminución en la intensidad de emisión es mayor en el caso del HTMA-PFNT posiblemente debido a que el mayor carácter hidrofóbico de la cadena principal de dicho polímero favorece la cercanía de las cadenas y, por lo tanto, la auto-desactivación de fluorescencia.

Síntesis de las nanopartículas híbridas multifuncionales

- Puesta a punto del método de encapsulación de las AuNPs

A la hora de sintetizar las nanopartículas híbridas multifuncionales se optó primero por encapsular las AuNPs en el interior de los liposomas y, una vez conseguido esto, incorporar los polielectrolitos HTMA-PFP y HTMA-PFNT, tal y como se muestra en el siguiente esquema:



Para poder encapsular las AuNPs se exploraron diferentes alternativas que se detallan a continuación. La elección se hizo basándose en los espectros de absorción de las muestras, registrados en la zona de absorción de las AuNPs, y en los espectros de emisión de fluorescencia de una sonda lipofílica (DPH) que se añadió a las muestras y que únicamente fluoresce si se intercala en las bicapas lipídicas.

1. Encapsulación espontánea

Inicialmente se comprobó si era posible encapsular las AuNPs en los liposomas resuspendiendo los lípidos directamente con las AuNPs. Este estudio se llevó a cabo con MLVs de EPC 1 mM y, como control negativo, se formaron MLVs de EPC 1 mM a los que se le añadieron posteriormente las AuNPs.

La sonda DPH se añadió en una relación molar sonda-lípido 1:250 a ambas muestras para confirmar la formación de las vesículas lipídicas. Por otro lado, para determinar los efectos del proceso de encapsulación sobre los MLVs y las AuNPs, se prepararon dos controles adicionales: MLVs en ausencia de AuNPs (a la que también se añadió DPH) y AuNPs en ausencia de MLVs.

A partir del espectro de absorbancia de las AuNPs y del espectro de emisión de fluorescencia de la sonda DPH (Figura 13), se dedujo que:

- 1) la presencia de lípidos induce la formación de AuNPs de mayor diámetro debido al ensanchamiento y desplazamiento del pico de absorción de las AuNPs hacia longitudes de onda mayores,
- 2) los MLVs se formaban correctamente dada la existencia de la señal de fluorescencia del DPH —de no haberse formado, el DPH (insoluble en agua) no presentaría señal de fluorescencia—,

- 3) la fluorescencia del DPH se ve desactivada por las AuNPs —probablemente por un fenómeno de FRET— dada la menor señal de fluorescencia en muestras de MLVs con AuNPs,
- 4) y, a simple vista, no existen diferencias entre resuspender los lípidos con la suspensión de AuNPs o añadir las AuNPs a los MLVs ya formados, dado que los espectros de absorción y fluorescencia eran similares.

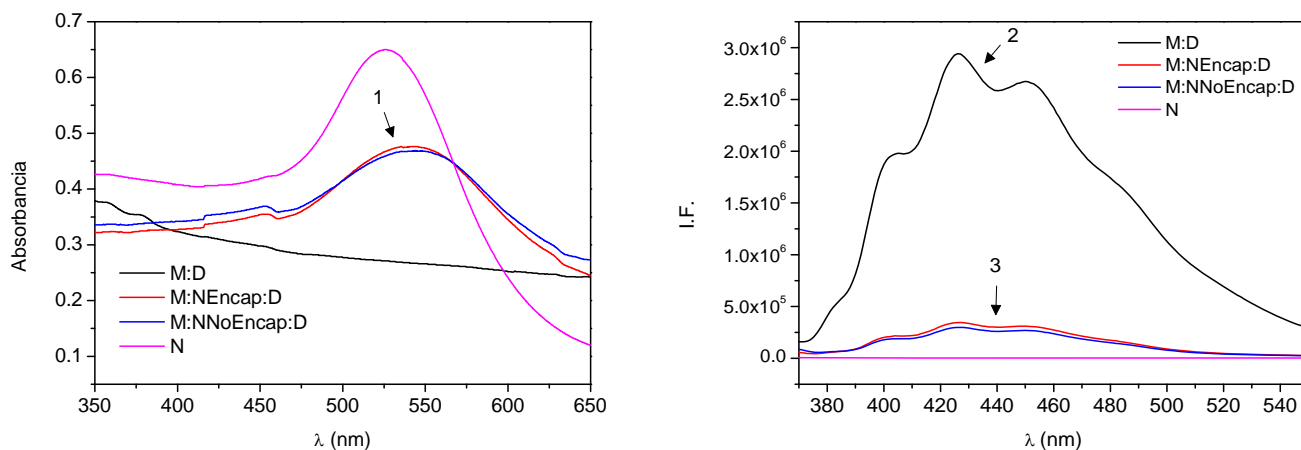


Figura 13. Espectros de absorción de las AuNPs² (izquierda) y de emisión de fluorescencia del DPH (derecha) de MLVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (M:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NEncap:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs No Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NNoEncap:D) y AuNPs (N).

Es sabido que el espectro de absorción de las AuNPs —anchura y posición— depende de su entorno. Por ello, el hecho de que los espectros recogidos, tanto en la muestra que contiene los lípidos resuspendidos con AuNPs como los MLVs a los cuales se les adicionó las AuNPs *a posteriori*, se vean afectados de la misma manera indica que las AuNPs no se están encapsulando en los liposomas por lo que este método no es efectivo.

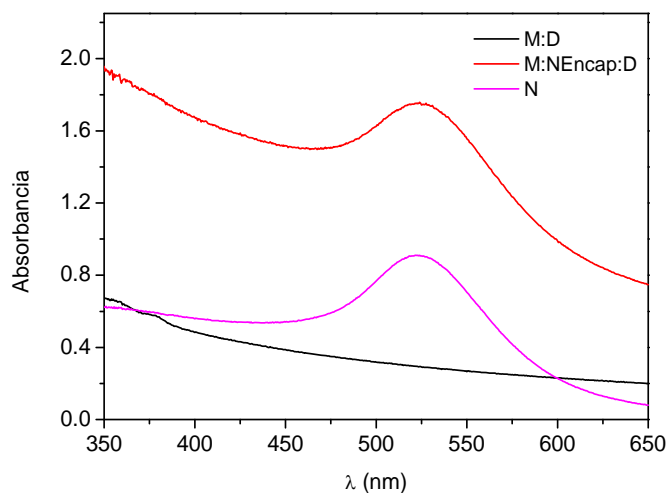
2. Ciclos de congelación-descongelación

En la literatura se ha visto que los ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido favorecen la encapsulación de componentes en el interior de los liposomas [20], por lo que se procedió a someter a los MLVs de EPC 1 mM con AuNPs a congelación-descongelación en nitrógeno líquido —5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido durante 2 minutos seguido de su descongelación en agua destilada a 37°C.

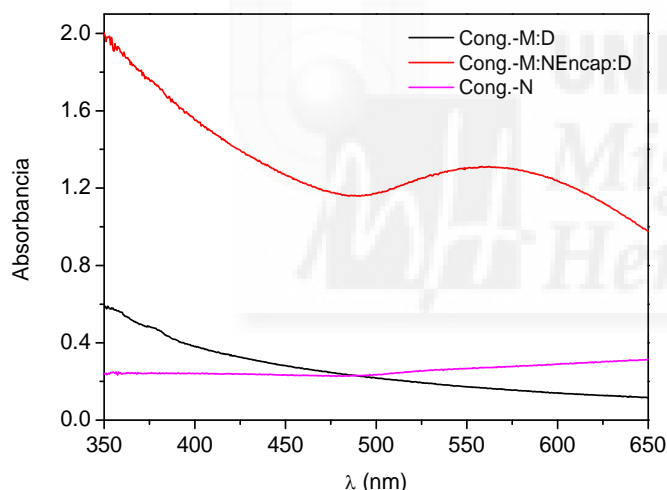
A partir de los espectros de absorbancia de las AuNPs antes y después de los ciclos de congelación-descongelación (Figura 14) se observó que las AuNPs agregaban y precipitaban tras este proceso —pérdida de la señal de absorbancia— pero en presencia de MLVs, aunque su tamaño se veía incrementado —

² El espectro absorción de las AuNPs de MLVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (M:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NEncap:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs No Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NNoEncap:D) y AuNPs (N) en bruto (Figura 31) junto con espectros de absorción de las AuNPs y de emisión de fluorescencia del DPH después de centrifugar (Figura 32) se muestran en el Anexo.

ensanchamiento y desplazamiento del pico de absorción hacia longitudes de onda mayores—, no precipitaban lo que podría indicar que quedaban encapsuladas y protegidas en el interior de los MLVs.



MLVs MLVs+AuNPs AuNPs



MLVs MLVs+AuNPs AuNPs

Figura 14. Espectros de absorción de las AuNPs y fotografías antes (arriba) y después (abajo) de los ciclos de congelación-descongelación de MLVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (M:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NEncap:D) y AuNPs (N).

El cambio de color que se aprecia a simple vista (Figura 14) pone de manifiesto el aumento de tamaño de las AuNPs en los MLVs con AuNPs —de rojo a lila oscuro— y la agregación de las AuNPs en ausencia de MLVs—de rojo a gris.

Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia del DPH antes y después de los ciclos de congelación-descongelación (Figura 15) demostraron que la integridad de las vesículas lipídicas se conserva tras este proceso. De nuevo, la señal de fluorescencia del DPH es mucho menor en presencia de las AuNPs. Como se comentó anteriormente, esto se puede explicar por un mecanismo de FRET al absorber las AuNPs en la zona en la que emite el DPH.

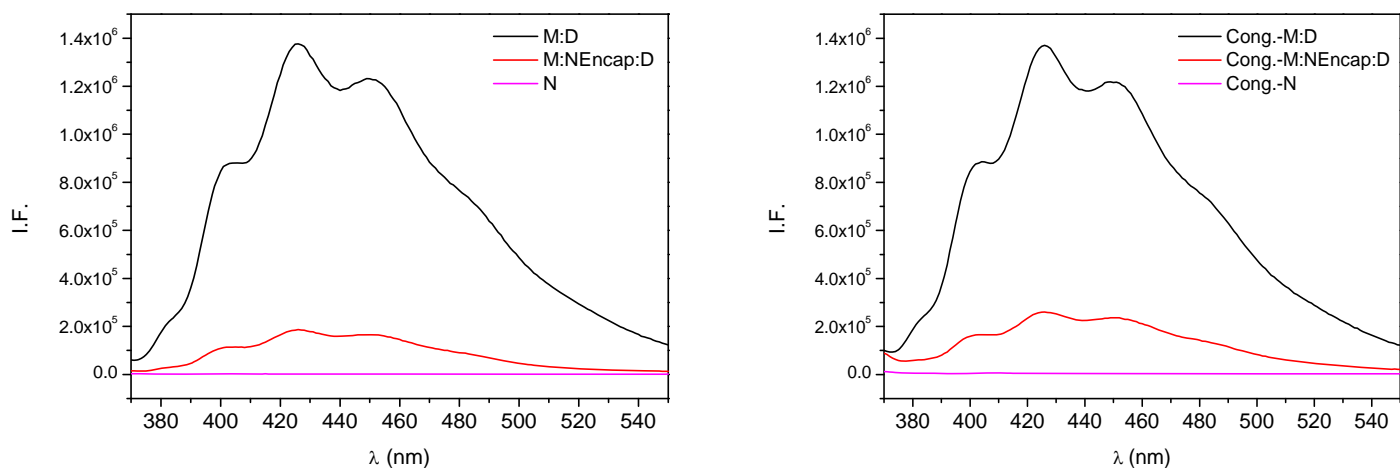


Figura 15. Espectros de emisión de fluorescencia del DPH antes (izquierda) y después (derecha) de los ciclos de congelación-descongelación en MLVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (M:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NEncap:D) y AuNPs (N).

A continuación, las muestras anteriores se pasaron por el extruder con el fin de obtener LUVs. El objetivo era poder separar mediante centrifugación los LUVs que no habían encapsulado AuNPs de los que tuvieran encapsulados las AuNPs.

Se probaron varias condiciones de centrifugación y se eligió una velocidad de 14.300 rpm durante 10 minutos, por ser capaz de retener prácticamente la mayor parte de los LUVs en el sobrenadante e inducir la precipitación de las AuNPs. Tras la centrifugación se volvieron a recoger los espectros de las muestras: sobrenadantes y precipitados resuspendidos.

De haber encapsulado con éxito las AuNPs en el interior de los liposomas, éstos precipitarían tras su centrifugación, obteniéndose el pico de absorción característico de las AuNPs entre 500-600 nm y un descenso en la señal de emisión de fluorescencia del DPH en dicho precipitado, en comparación con los LUVs que no tienen AuNPs encapsuladas en su interior. Además, como consecuencia de la bajada de dichos LUVs al precipitado, la señal de emisión de fluorescencia del DPH en el sobrenadante será menor que la obtenida en el sobrenadante de LUVs sin AuNPs.

Los espectros de absorción de las AuNPs y la señal de fluorescencia del DPH —recogida en su máximo, $\lambda_{\text{máx}}$ — correspondiente al sobrenadante y al precipitado de las muestras (Figura 16) indicaron que era posible la encapsulación de las AuNPs en el interior de los liposomas mediante ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, y que la técnica de centrifugación a 14.300 rpm durante 10 minutos permitía la separación de los liposomas con AuNPs en su interior de los que no habían encapsulado AuNPs.

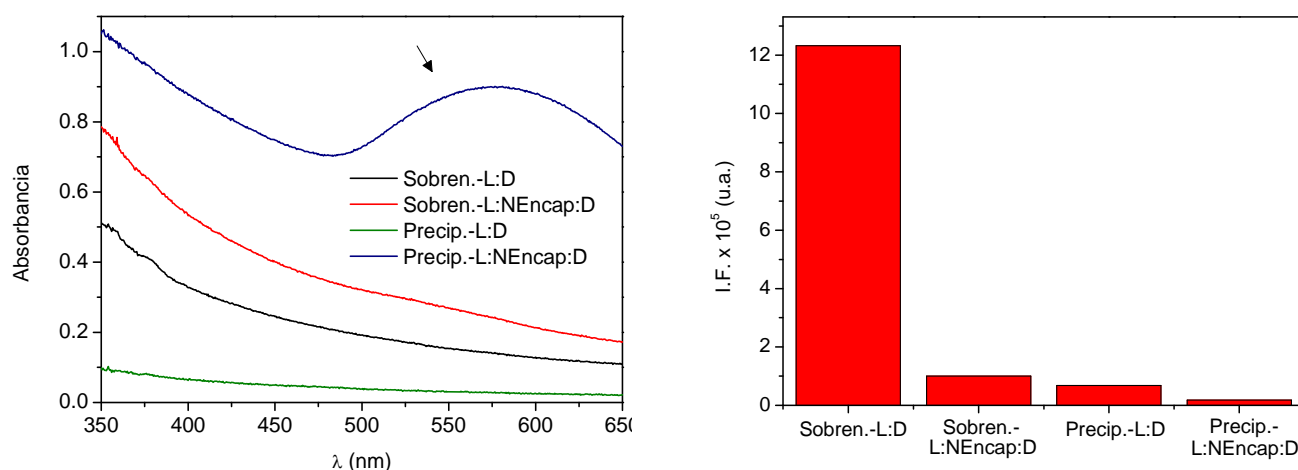


Figura 16. Espectros de absorción de las AuNPs (izquierda) e intensidades de emisión de fluorescencia del DPH λ_{max} : 426 nm (derecha) del sobrenadante y precipitado de las muestras de LUVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (L:D) y LUVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (L:NEncap:D).

- Sistema lipídico

En la literatura se ha visto que las AuNPs son capaces de absorber energía en forma de radiación electromagnética y convertirla en calor para estimular la transición de fase de los liposomas y la permeabilidad de la membrana, permitiendo así la liberación controlada [18,19]. Además, como se ha visto anteriormente, las AuNPs empleadas en este trabajo presentan un tamaño de 41 nm, lo que permite su excitación con longitudes de onda del espectro visible e infrarrojo mucho menos dañinas [19].

Una vez se consiguió encapsular las AuNPs en el interior de los liposomas de EPC —lípidos zwitteriónicos sin transición de fase— mediante los ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, el siguiente paso fue comprobar si otros lípidos zwitteriónicos y aniónicos, con y sin transición de fase, presentaban la misma capacidad de encapsulación. Para ello se siguieron los mismos pasos que en el apartado anterior, recogiendo los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de las diferentes muestras tras la centrifugación.

Los lípidos elegidos fueron: L- α -fosfatidilglicerol (sal de sodio) (EPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal de amonio (DPPG). El EPG se eligió por poseer una composición lipídica similar al EPC exceptuando la cabeza polar de glicerol, y el DPPC y el DPPG se eligieron por poseer transición de fase cercana a 45°C, lo que permite la liberación controlada del contenido del liposoma mediante la irradiación de las AuNPs encapsuladas en su interior.

A partir de los espectros de absorción (Figura 17) se concluyó que los liposomas de EPC, EPG y DPPG eran capaces de encapsular las AuNPs, ya que se mantenía el pico característico de las AuNPs tras someter a congelación-descongelación —de no encapsularse, las AuNPs hubieran precipitado y no se hubiese obtenido señal. Sin embargo, no todos ellos interactuaban con las AuNPs de la misma forma, siendo el EPG (seguido del DPPG y del EPC) el lípido que mejor conservaba la forma y tamaño de las AuNPs —pico de absorción de las AuNPs de los LUVs de EPG muy similar al de las AuNPs.

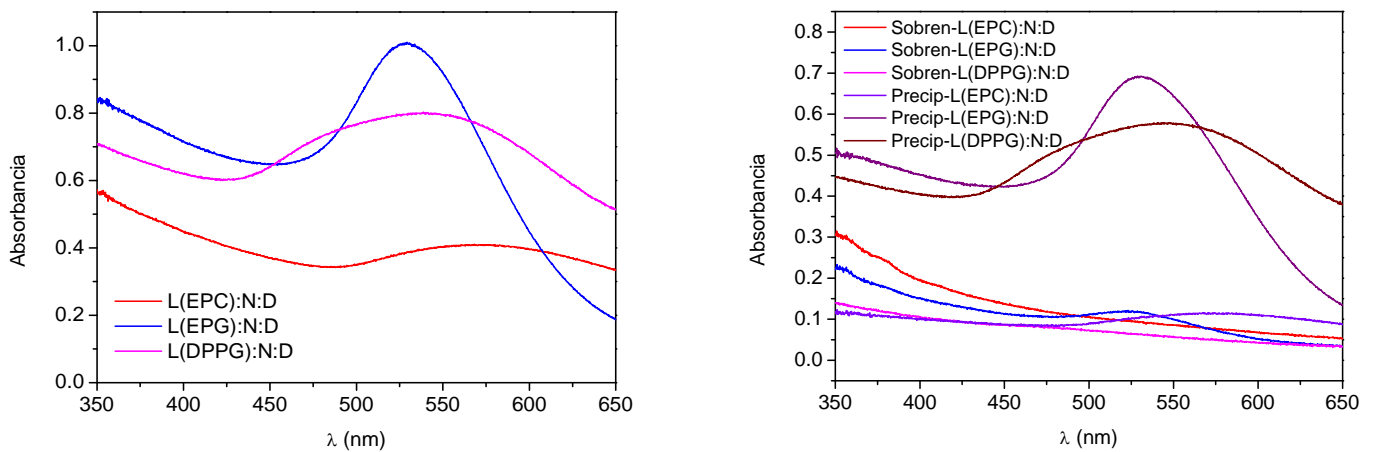


Figura 17. Espectros de absorción de las AuNPs antes (izquierda) y después (derecha) de centrifugar a 14.300 rpm durante 10 min de LUVs de EPC 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(EPC):N:D), LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(EPG):N:D) y LUVs de DPPG 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(DPPG):N:D).

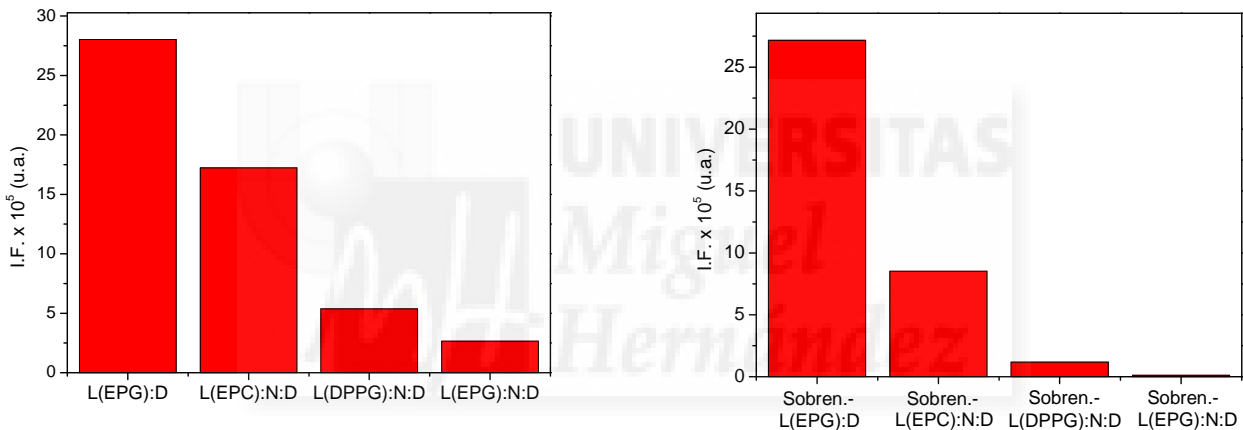


Figura 18. Intensidades de emisión de fluorescencia del DPH — λ_{max} : 426 nm— antes (izquierda) y después (derecha) de centrifugar a 14.300 rpm durante 10 min de LUVs de EPG 1 mM + DPH 1 mM (L(EPG):D), LUVs de EPC 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(EPC):N:D), LUVs de DPPG 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(DPPG):N:D) y LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(EPG):N:D).

Por otro lado, las intensidades de emisión de fluorescencia del DPH (Figura 18) mostraron una mayor encapsulación de AuNPs en el interior de los LUVs de EPG (seguida de DPPG y EPC), ya que la señal de fluorescencia obtenida antes de centrifugar es menor —mayor relación lípido-AuNPs y, consecuentemente, mayor desactivación de la fluorescencia—, y el sobrenadante de dicha muestra presenta una menor señal de fluorescencia lo que indicaba la presencia de una mayor cantidad de liposomas en el precipitado. Señalar que en el precipitado la señal de fluorescencia fue prácticamente despreciable debido a que las AuNPs están encapsuladas en los liposomas y desactivan la señal de fluorescencia del DPH completamente.

Los lípidos de DPPC³ no mostraron capacidad alguna para encapsular las AuNPs ya que en contacto con ellas las AuNPs agregaban y precipitaban —pico de las AuNPs apenas distinguible.

³ Los espectros de DPPC se muestran en el Anexo Figura 33.

- Medidas de anisotropía

Con el objetivo de comprobar si las AuNPs alteraban el orden estructural de la bicapa lipídica o el comportamiento termotrópico propio de los lípidos que la forman, se midió la anisotropía de fluorescencia del DPH en estado estacionario de los LUVs de DPPG 1 mM con y sin AuNPs.

La excitación del DPH puede producirse únicamente si el campo eléctrico de la luz se encuentra orientado en un eje de polarización particular con respecto a dicha molécula. Además, el fotón emitido también posee un plano de polarización particular en relación a la molécula. Cuando se aplica luz polarizada a un grupo de moléculas de DPH aleatoriamente orientadas, la mayor parte de las moléculas excitadas serán aquellas que se encuentren orientadas dentro de un rango particular de ángulos con respecto a la polarización aplicada. Si estas moléculas no se mueven —lípidos en fase gel—, la luz emitida poseerá también un rango particular de ángulos de polarización con respecto a la luz aplicada. Cuando dichas moléculas pueden cambiar su orientación libremente antes de reemitir fotones —lípidos en fase fluida—, el grado de polarización de la luz emitida se reduce. Una manera de cuantificar el grado de polarización es midiendo la anisotropía de fluorescencia, como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Para fosfolípidos puros la forma característica de la representación de la anisotropía de fluorescencia del DPH en estado estacionario en función de la temperatura es sinusoidal, con una transición brusca de los valores de anisotropía en un corto intervalo de temperaturas en el que el valor medio se corresponde con la T_c —en el caso del DPPG la T_c está en torno a ~ 45 °C. La forma de la curva y los valores de anisotropía son bastantes similares en ambas muestras —con y sin AuNPs—, con un marcado descenso alrededor de la T_c del DPPG evidenciando que el empaquetamiento y transición de fase de los lípidos en la bicapa se conserva tras la incorporación de las AuNPs (Figura 19). Este resultado sugiere que las AuNPs se encuentran encapsuladas en el interior acuoso de la vesícula y no en la bicapa lipídica.

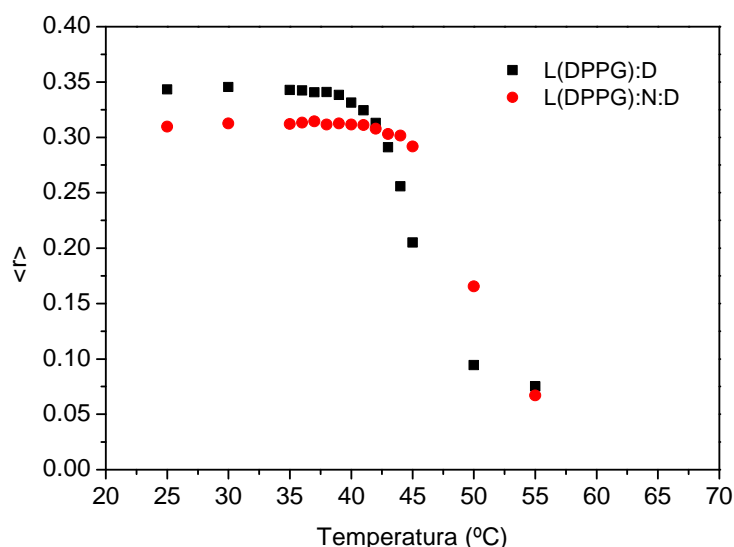


Figura 19. Medidas de anisotropía de fluorescencia del DPH en estado estacionario— λ_{exc} : 360 nm, λ_{emi} : 430 nm y r. 0.75-1.25/3.0-3.5— en función de la temperatura de LUVs de DPPG 1 mM + DPH 1 mM (L(DPPG):D) y LUVs de DPPG 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(DPPG):N:D).

Incorporación de los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT

Una vez encapsuladas las AuNPs en el interior de los liposomas tanto con —DPPG— como sin transición de fase —EPC y EPG— mediante ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, y de haber comprobado que la integridad de las vesículas se conserva tras la encapsulación, se procedió a incorporar los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT con objeto de hacer las nanopartículas híbridas fluorescentes. Señalar que el DPH no puede ejercer esta función dado que, por un lado, las AuNPs desactivan su fluorescencia completamente y, por otro lado, sufre de “*photobleaching*” y no puede ser utilizado como sonda en bioimagen.

- Efectos sobre la centrifugación

Inicialmente se comprobó si los LUVs marcados con HTMA-PFP y HTMA-PFNT y libres de AuNPs quedaban retenidos en el precipitado durante el proceso de centrifugación o si, por el contrario, permanecían en el sobrenadante, siendo así capaces de separar la fracción de liposomas con AuNPs y polímero de la de liposomas solo con polímero. Para ello se prepararon LUVs de EPG 1 mM a los cuales se le añadió el polímero azul HTMA-PFP, concretamente 1.5 μM de polímero para 1 mM de lípido. Una vez añadido el polímero se dejó incubar durante 20 minutos y, transcurrido dicho tiempo, se recogió su espectro de emisión de fluorescencia antes y después de centrifugar tanto el sobrenadante como en el precipitado.

Como se puede observar en la Figura 20, la señal de fluorescencia del HTMA-PFP antes de centrifugar y en el sobrenadante es bastante similar, mientras que en el precipitado es apenas apreciable. A partir de los resultados obtenidos, se dedujo que polímero HTMA-PFP —y de igual modo el polímero rojo HTMA-PFNT ya que presentan un peso molecular similar— presente en los liposomas no era capaz de inducir su precipitación durante la centrifugación, quedando estos retenidos en el sobrenadante.

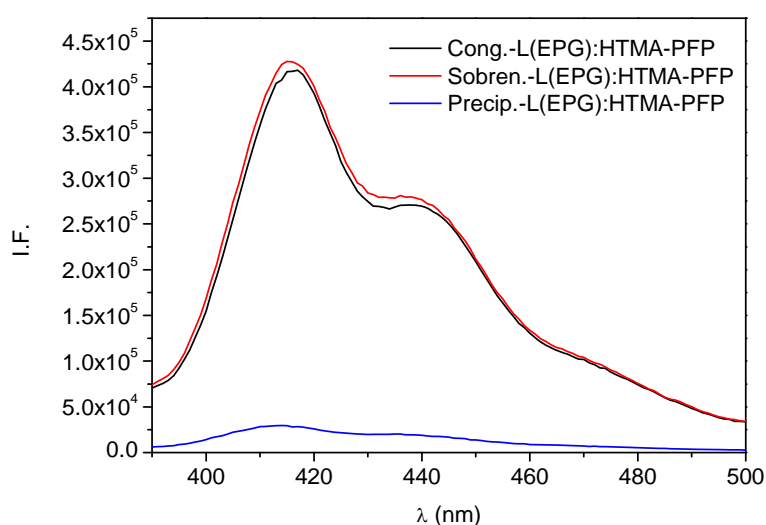


Figura 20. Espectro de emisión de fluorescencia del polímero azul HTMA-PFP de LUVs de EPG 1 mM + HTMA-PFP 1.5 μM (L(EPG):HTMA-PFP) antes de centrifugar (negro) y después de centrifugar: en el sobrenadante (rojo) y en el precipitado (azul).

Pese a las pruebas realizadas, se decidió incorporar el polímero a *posteriori*, es decir, al precipitado resuspendido una vez centrifugada la muestra. De esta forma nos aseguramos de que los liposomas marcados eran únicamente los que contenían AuNPs y evitábamos malgastar polímero marcando liposomas que no habían encapsulado AuNPs.

- Adición de los polímeros a los liposomas con AuNPs

El último paso en la síntesis de estas nanopartículas híbridas fue la adición del polímero HTMA-PFP o HTMA-PFNT a los liposomas con AuNPs encapsuladas en su interior. En trabajos previos [13,14] se ha visto que la concentración óptima de polímero por cada 1 mM de lípido es de 1.5 μM , sin embargo, dados los posibles fenómenos de transferencia de energía (FRET) entre los polímeros (donador) y las AuNPs (aceptor) y, por lo tanto, de pérdida de fluorescencia, se optó por incrementar la cantidad de polímero a adicionar.

Un exceso de polímero implicaría que parte de éste podría no incorporarse al liposoma, quedando en el disolvente en forma de agregados, con una intensidad de emisión de fluorescencia menor y un desplazamiento del espectro hacia el rojo, lo que se traduce en inestabilidad en la señal de emisión de fluorescencia. Para comprobar cuál era la concentración de polímero óptima que minimizaba este inconveniente se prepararon LUVs de EPG 1 mM, con y sin AuNPs encapsuladas en su interior, a cuyo precipitado se le adicionaron 3 μM y 6 μM de polímero azul HTMA-PFP y se recogieron sus espectros de emisión (Figura 21).

En los espectros de emisión de fluorescencia del polímero azul HTMA-PFP recogidos se observó una gran diferencia entre las intensidades de fluorescencia en LUVs sin y con AuNPs, siendo en este último caso mucho menor la señal: se confirma la existencia de fenómenos de transferencia de energía entre el polímero HTMA-PFP y las AuNPs dado que, al igual que el DPH, el polímero azul emite donde absorben las AuNPs. Por otro lado, se observó una gran estabilidad en la señal de fluorescencia del HTMA-PFP 3 μM , mientras que para una concentración de 6 μM se observaron ligeras fluctuaciones (Figura 21). Se escogió, por lo tanto, la relación de 3 μM de polímero por cada 1 mM de lípido, a pesar de la menor señal fluorescente. Sin embargo, dicha señal seguía siendo elevada dado que la intensidad de partida, en ausencia de AuNPs, era muy alta.

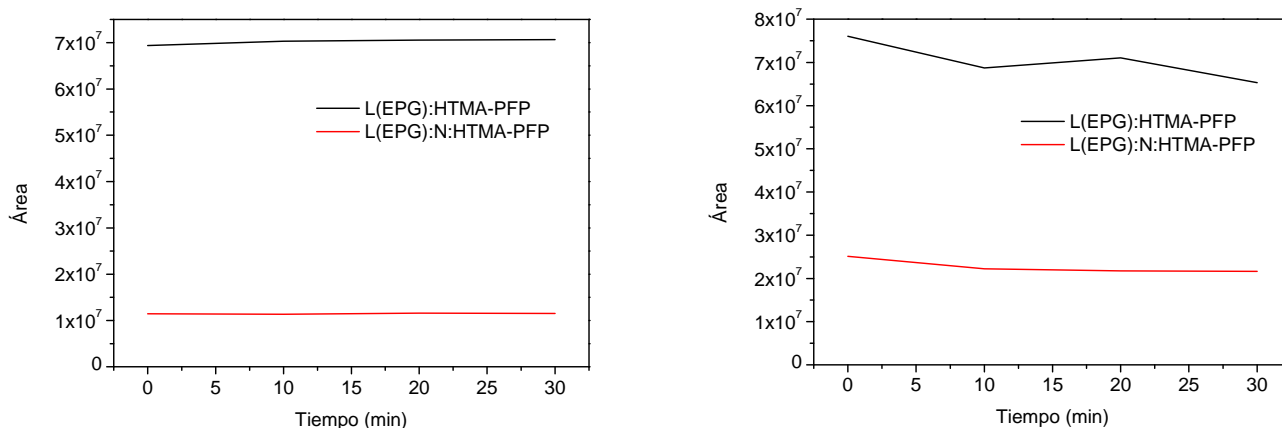


Figura 21. Área bajo el espectro de emisión del HTMA-PFP 3 μM (izquierda) y 6 μM (derecha) de LUVs de EPG 1 mM + HTMA-PFP (L(EPG):HTMA-PFP) y LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP (L(EPG):N:HTMA-PFP) en función del tiempo.

Por otro lado, en trabajos anteriores [13,14] se ha comprobado que los polímeros HTMA-PFP y HTMA-PFNT son capaces de sentir los cambios estructurales que tienen lugar en la bicapa lipídica de los liposomas durante la transición de fase —conforme la temperatura aumenta, el espectro de emisión de los polímeros se ve desplazado hacia el azul. Sin embargo, desconocíamos si este comportamiento se conservaba en presencia de las AuNPs, por ello se sintetizaron LUVs de DPPG 1 mM con AuNPs encapsuladas en su interior a cuyo precipitado resuspendido se le adicionaron 3 μ M de HTMA-PFP y se llevó a cabo un barrido del espectro de emisión del polímero en función de la temperatura (Figura 22). Para mayor precisión a la hora de extraer conclusiones, se representó la longitud de onda del máximo de emisión.

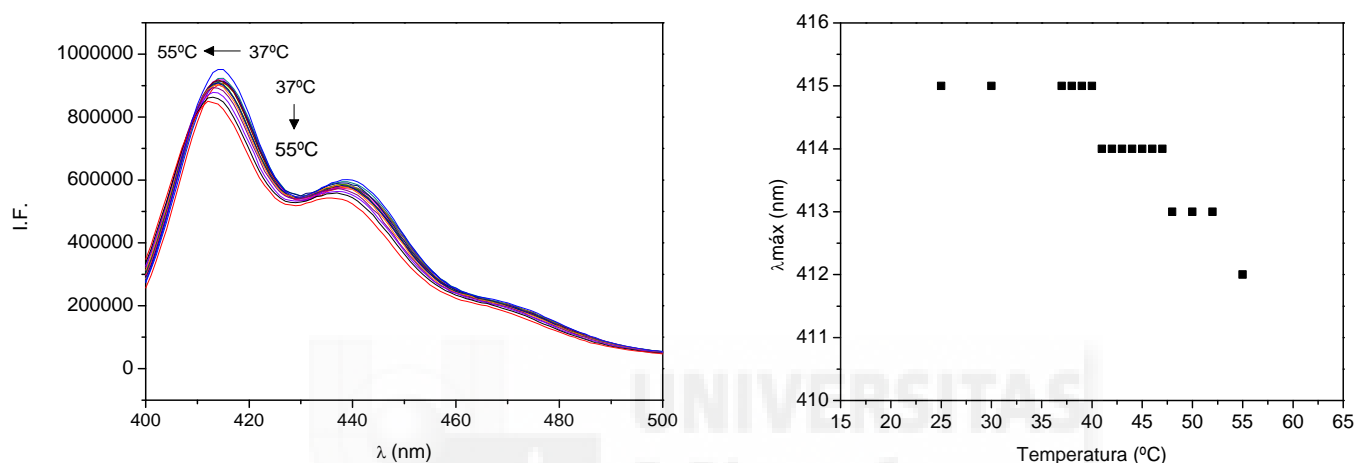


Figura 22. Barrido del espectro de emisión de fluorescencia del polímero azul HTMA-PFP (izquierda) y representación de la $\lambda_{\text{máx}}$ (derecha) de LUVs de DPPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP 3 μ M en función de la temperatura.

Como se puede apreciar en la Figura 22, conforme la temperatura aumenta el espectro de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP se desplaza hacia el azul —415 a 412 nm. El cambio de $\lambda_{\text{máx}}$ indica que el polielectrolito es sensible a los cambios físicos que tienen lugar en la bicapa lipídica aun en presencia de AuNPs. Esto confirma la incorporación del polímero en la bicapa lipídica, intercalado entre las cadenas de ácidos grasos. Por otro lado, cabe señalar que los cambios observados en estos experimentos fueron reversibles, ya que al enfriar la muestra se recuperó la forma e intensidad del espectro de emisión de fluorescencia inicial.

El hecho de que el espectro de emisión del HTMA-PFP en la fase fluida tenga su máximo de emisión, $\lambda_{\text{máx}}$, desplazado hacia el azul mientras que en la fase gel este localizado hacia el rojo, y la reversibilidad de este proceso, sugieren que el firme empaquetamiento de las cadenas por debajo de la temperatura de transición fuerza al polímero a adoptar una conformación aplanada de anillos fenilo extendiendo la conjugación π . Por el contrario, en la fase fluida, el polímero puede girar adoptando diferentes conformaciones evitando la deslocalización de los electrones π sobre toda la cadena.

Finalmente, mediante el empleo del microscopio electrónico de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM) se obtuvieron imágenes de alta resolución de las nanopartículas híbridas multifuncionales sintetizadas a partir de liposomas, AuNPs y CPEs basados en anillos de polifluoreno (Figura 23). Señalar que no fue necesaria la tinción de la muestra ya que las nanopartículas de oro ejercieron la función de contraste de fase. Las

imágenes confirman la encapsulación de las AuNPs en el interior de los LUVs, que ya había sido demostrada de forma indirecta mediante espectroscopía de absorción y fluorescencia.

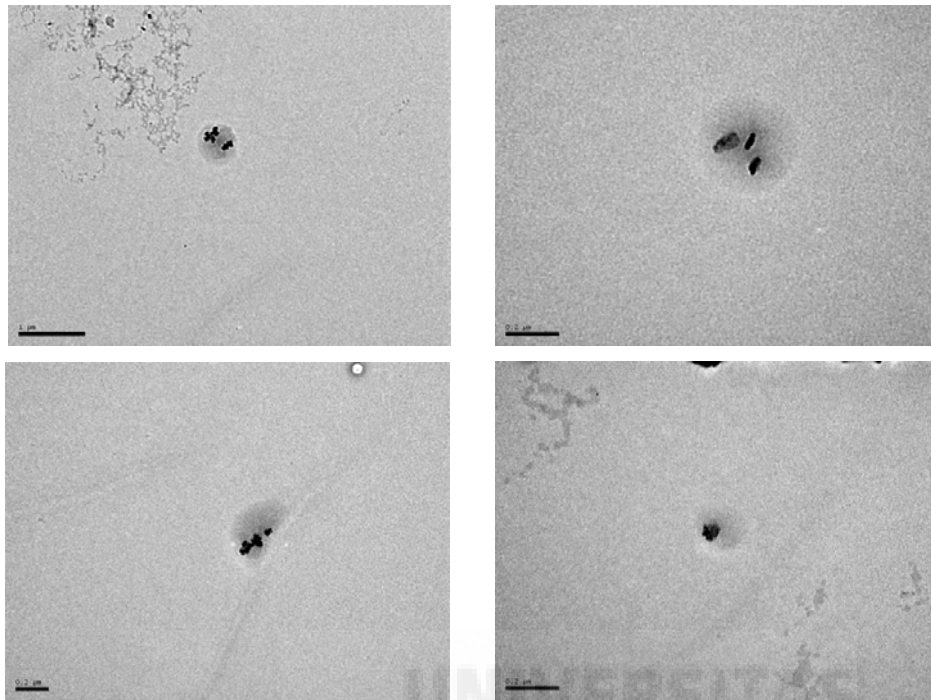


Figura 23. Imágenes de TEM de LUVs de DPPG 1 mM con nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) encapsuladas en su interior y polímero azul HTMA-PFP 3 μM en la bicapa lipídica.

- Bioimagen: marcaje de modelos celulares

En trabajos anteriores [13,14] se ha demostrado que los polielectrolitos conjugados HTMA-PFP y HTMA-PFNT son capaces de interactuar tanto con vesículas lipídicas gigantes (GUVs) que simulan la célula, como con células reales (línea celular de queratinocitos humanos, HaCaT), marcando la membrana y permitiendo su visualización mediante microscopía óptica. Dicha interacción es inespecífica, lo que en algunos casos puede ser una desventaja cuando se quiere visualizar únicamente un sistema concreto.

Con el propósito de determinar la capacidad de nuestras nanopartículas de marcar biomembranas se formaron GUVs 1 mM constituidos bien por EPC puro o por una mezcla de EPC y EPG (3:1) mediante electroformación a los cuales se les administraron las nanopartículas híbridas. Los resultados obtenidos fueron similares para ambos sistemas. Como se puede apreciar en la Figura 24, ni las nanopartículas azules (con HTMA-PFP) ni las rojas (con HTMA-PFNT) marcaron las membranas lipídicas de los GUVs —independientemente de si la composición de dichas nanopartículas era zwitteriónica (EPC) o aniónica (EPG). Sin embargo, la adición directa de los polímeros HTMA-PFP o HTMA-PFNT 6 μM, sí marcaba las membranas lipídicas de los GUVs.

El hecho de que las nanopartículas híbridas sean incapaces de marcar a los GUVs pone de manifiesto la gran estabilidad de las mismas. Ello sugiere que dichas nanopartículas serán incapaces de marcar las células a no ser que se las direcciona mediante la incorporación de un elemento de reconocimiento (anticuerpo, etc...).

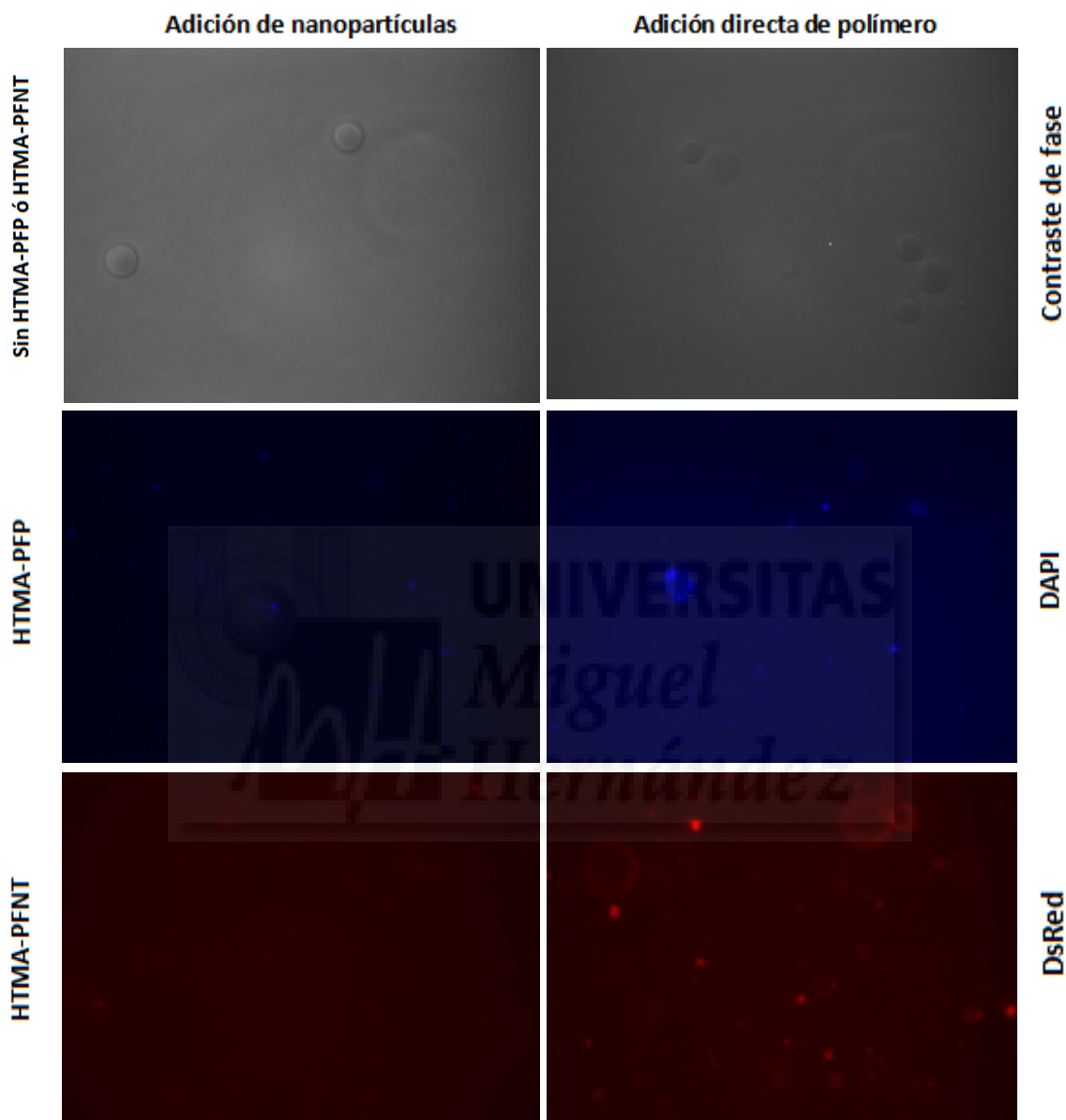


Figura 24. Imágenes de microscopía óptica de GUVs 1 μ m. De arriba abajo: contraste de fase, excitación en el UV (DAPI) y excitación en el visible (DsRed). A la izquierda tras la adición de las nanopartículas azules (con HTMA-PFP) y rojas (con HTMA-PFNT) y a la derecha tras la adición directa del polielectrolito HTMA-PFP o HTMA-PFNT.

Estudios de estabilidad

Un aspecto realmente importante en la síntesis de una nueva plataforma nanométrica multifuncional como la que hemos desarrollado en este trabajo son los estudios de estabilidad. Por ello, una vez sintetizadas y

caracterizadas, se procedió a estudiar la estabilidad de estas nuevas nanopartículas multifuncionales bajo diferentes condiciones.

Para este estudio se prepararon LUVs de EPG 1 mM con AuNPs encapsuladas en su interior y polímero HTMA-PFP 3 μ M. Inicialmente se examinó la estabilidad a corto plazo, siguiendo la evolución del espectro de absorción de las nanopartículas híbridas recogido a diferentes tiempos. La señal fue muy estable como puede apreciarse en la Figura 25, indicando que no existen procesos de agregación o fusión entre nanopartículas.

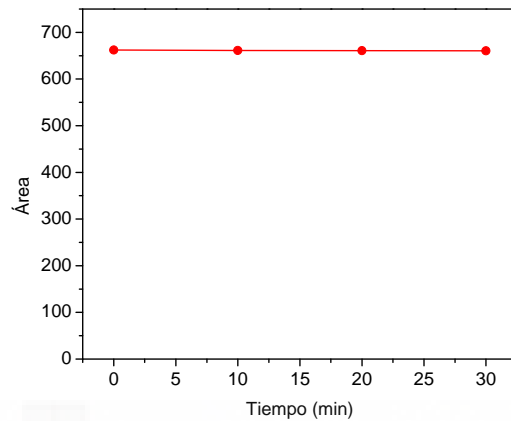


Figura 25. Área bajo el espectro de absorción de las nanopartículas híbridas (NPs) de LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP 3 μ M en función del tiempo.

La estabilidad a tiempos largos (días) se exploró recogiendo los espectros de fluorescencia de las nanopartículas híbridas de una misma muestra durante dos semanas. De igual manera se estudió cómo afectaba la temperatura a las nanopartículas. Los resultados confirmaron que las nanopartículas eran bastante estables a lo largo del tiempo y bajo la acción de diferentes temperaturas —apenas existe desplazamiento en el espectro de emisión de los polímeros y la disminución de intensidad es mínima (Figura 26 y 27). La bajada observada con la temperatura es reversible y es consecuencia de otros caminos de desactivación (conversión interna, etc.) que se activan con la temperatura.

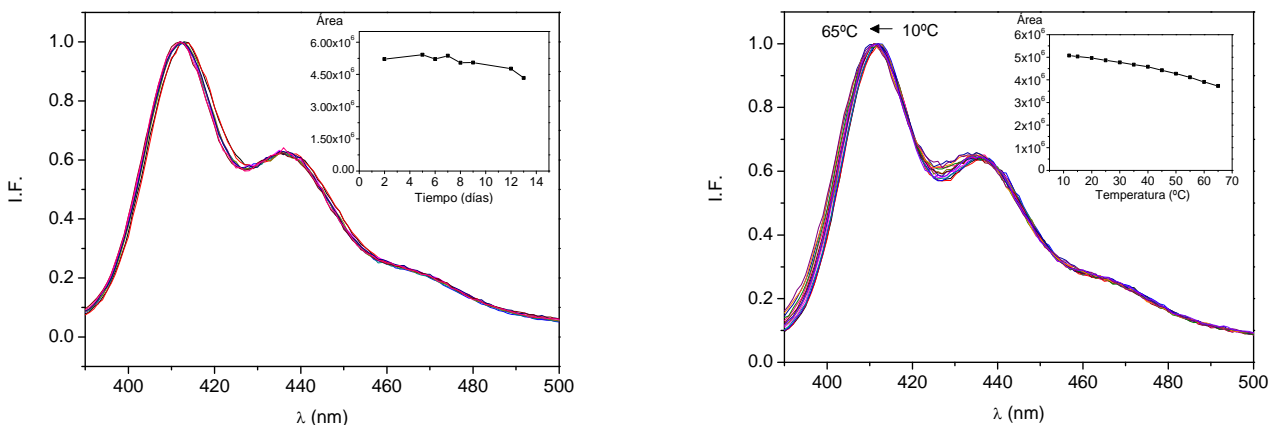


Figura 26. Espectros de emisión de fluorescencia del polímero azul HTMA-PFP normalizado de LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP 3 μ M en el tiempo (izquierda) y bajo la acción de diferentes temperaturas (derecha). Insertados en estos gráficos aparece la representación del área bajo el espectro de emisión en función del tiempo y la temperatura respectivamente.

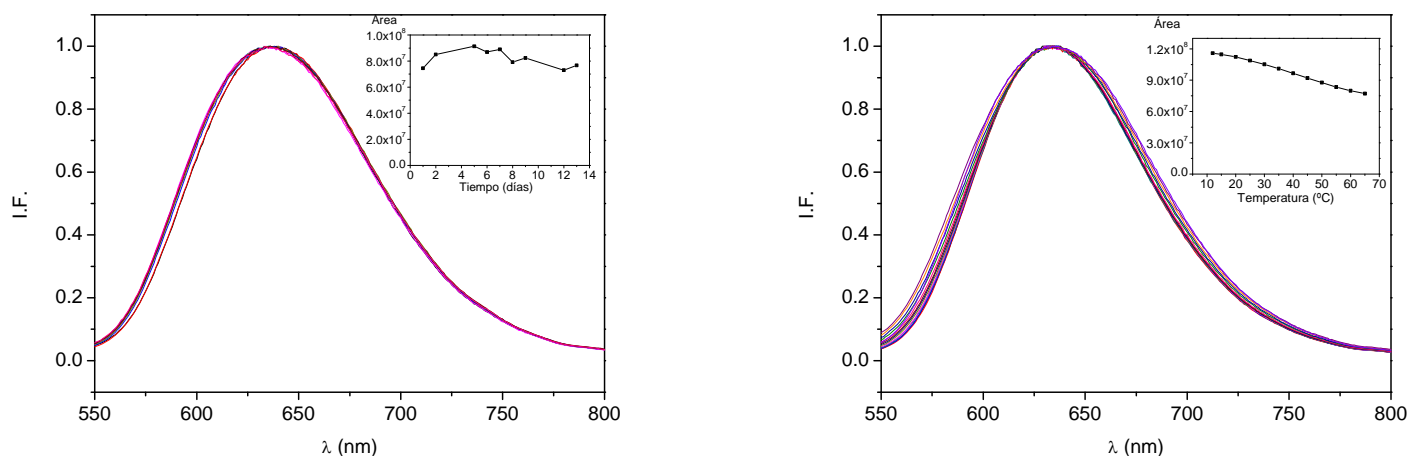


Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia del polímero rojo HTMA-PFNT normalizado de LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP 3 μ M en el tiempo (izquierda) y bajo la acción de diferentes temperaturas (derecha). Insertados en estos gráficos aparece la representación del área bajo el espectro de emisión en función del tiempo y la temperatura respectivamente.

Finalmente, se comprobó la estabilidad de las nanopartículas en tampón fosfato 50 mM y pH 7.36, ya que éste debe ser el disolvente donde vayan disueltas para amortiguar posibles cambios en el medio. Para comprobar el efecto que tenía dicho tampón, se formaron nanopartículas en agua MilliQ mediante el protocolo habitual, se centrifugaron a 14.300 rpm durante 10 minutos y se resuspendió el precipitado con tampón.

En la figura 28 a la izquierda aparecen recogidos los espectros de absorbancia de las nanopartículas en tampón fosfato (TP) y agua MilliQ, donde se puede apreciar que el hecho de resuspender en tampón no afecta a las mismas, con lo cual pueden utilizarse también en este medio. Señalar que la síntesis de AuNPs sí que debe hacerse en agua MilliQ dado que en tampón no se forman (Figura 28 derecha). Por ello se emplea agua MilliQ como disolvente inicial y, una vez encapsuladas las AuNPs, se resuspende en TP el precipitado obtenido tras la centrifugación.

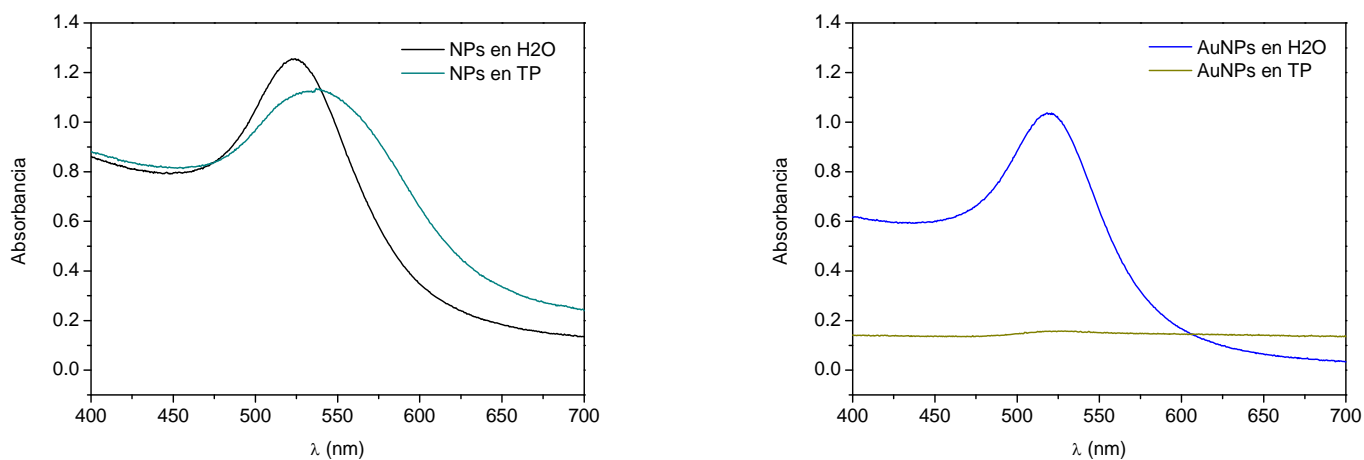


Figura 28. Espectros de absorbancia en agua MilliQ (H₂O) y tampón fosfato (TP) de las nanopartículas híbridas multifuncionales (NPs) de LUVs de EPG 1 mM + AuNPs + HTMA-PFP 3 μ M (a la izquierda) y de las AuNPs (a la derecha).

Aplicaciones biotecnológicas

Una vez puesta a punto y caracterizada la síntesis de esta nueva nanopartícula híbrida multifuncional, es posible evaluar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Por un lado, el hecho de que la vesícula lipídica no se altere tras la incorporación de los otros componentes (AuNPs y polielectrolitos), indica que esta nueva plataforma nanométrica se podría emplear para el transporte y liberación de fármacos, tanto de naturaleza hidrofóbica —retenidos en el interior de la bicapa de los liposomas— como de naturaleza hidrofílica —atrapados en el núcleo acuoso del liposoma o bien en la superficie de éstos. La incorporación de fármacos hidrofílicos en el interior de las nanopartículas se llevaría a cabo mediante los ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno, disolviendo el fármaco junto con las AuNPs. Por el contrario, los fármacos hidrofóbicos se disolverían en cloroformo para después ser resuspendidos junto a los lípidos durante la formación de las vesículas lipídicas. Si el fármaco fuera muy lipofílico, también podría incorporarse espontáneamente a las nanopartículas una vez formadas. Como ejemplo de esta alternativa tenemos a la sonda DPH. Este compuesto se ha conseguido incorporar a la bicapa lipídica de las nanopartículas simplemente incubándolo en una suspensión de las mismas, por encima de la temperatura de transición lipídica.

Por otro lado, el empleo de lípidos con transición de fase como el DPPG, y el hecho de que no se vea afectada la transición tras la incorporación de polielectrolito y AuNPs en la vesícula, permitiría la liberación controlada de fármacos mediante la irradiación de las AuNPs con la longitud de onda apropiada: preferiblemente de la región visible e infrarrojo —700-900 nm— mucho menos dañina y más efectiva.

Y, finalmente, podría monitorizarse mediante bioimagen dicha administración, transporte y liberación, siempre y cuando las nanopartículas sean direccionadas con algún elemento de reconocimiento (anticuerpos, etc...). La alta estabilidad de las nanopartículas sugiere además, que esta plataforma va a ser muy resistente a los macrófagos (a diferencia de los liposomas convencionales) en caso de que se administre en el torrente sanguíneo, de forma que el fármaco solo será liberado una vez llegado a su lugar de acción e irradiado convenientemente.

Conclusión y proyección futura

En este trabajo se lleva a cabo la síntesis de una nueva plataforma nanométrica multifuncional, en la cual se integran las funciones de transporte de fármacos, liberación controlada y bioimagen, utilizando liposomas, AuNPs y CPEs.

En primer lugar, se ha puesto a punto una metodología para la obtención de nanopartículas híbridas mediante la encapsulación de AuNPs en vesículas lipídicas de diferente composición. Concretamente, las AuNPs han sido encapsuladas en el núcleo hidrofílico de liposomas mediante ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, lo que se debe fundamentalmente a los cambios físicos y estructurales acontecidos sobre las membranas lipídicas durante dicho proceso. Además, en función del sistema lipídico empleado —lípidos zwitteriónicos o aniónicos con o sin transición de fase—, las AuNPs son encapsuladas con una mayor o menor alteración en su forma y tamaño: el EPG presenta mejores resultados seguido del DPPG y EPC.

En el caso de emplear lípidos con transición de fase —DPPG—, el orden estructural y comportamiento termotrópico propio de lípidos de transición se conserva tras la incorporación de las AuNPs, lo que permite su potencial utilización como sistema de liberación controlada a 45 °C mediante la irradiación de las AuNPs.

A continuación, se han incorporado los CPEs en las nanopartículas desarrolladas con objeto de obtener nanopartículas híbridas fluorescentes. Concretamente, la relación óptima polímero-lípido para obtener nanopartículas fluorescentes estables con una buena señal de fluorescencia es de 3 μM de polielectrolito por cada 1 mM de lípido a diferencia de la relación 1,5:1 de trabajos anteriores [13,14]. Este incremento es debido al fenómeno de transferencia de energía (FRET) que tiene lugar entre el polielectrolito y las AuNPs.

Los estudios de marcaje de GUVs, empleados como modelos celulares, han demostrado que las nanopartículas son incapaces de marcar las biomembranas a no ser que se las direcciona mediante la incorporación de un elemento de reconocimiento (anticuerpo, etc), lo que permitiría su monitorización y seguimiento.

Por otro lado, los estudios de estabilidad realizados han puesto de manifiesto la gran estabilidad de estas nanopartículas híbridas bajo la acción de diferentes temperaturas, el paso del tiempo o acción de diferentes disolventes acuosos.

En cuanto a las potenciales aplicaciones biotecnológicas de estas nanopartículas, decir que recientemente se han llevado a cabo las primeras pruebas de encapsulación de doxorrubicina, como modelo de fármaco hidrofílico, e ibuprofeno, como modelo de fármaco lipofílico, además de estar previstos los experimentos de liberación controlada.

Se concluye que esta nueva plataforma nanométrica multifuncional que integra la elevada sensibilidad de fluorescencia de los CPEs [8,9,12], la biocompatibilidad y mínima toxicidad de las AuNPs [6] y la disminución de los efectos secundarios de los liposomas como vehículos de transporte [20], promete ser de gran utilidad como vehículo de transporte, liberación controlada y monitorización mediante bioimagen.

Bibliografía

1. Chih-Jen Wen, Calvin T Sung, Ibrahim A Aljuffali, Yu-Jie Huang and Jia-You Fang. Nanocomposite liposomes containing quantum dots and anticancer drugs for bioimaging and therapeutic delivery: a comparison of cationic, PEGylated and deformable liposomes. *Nanotechnology* 2013, 24(32).
2. Xiaomei Lu, Rongcui Jiang, Minhua Yang, Quli Fan, Wenbo Hu, Lei Zhang, Zhen Yang, Weixing Deng, Qingming Shen, Yanqin Huang, Xingfen Liua and Wei Huang. Monodispersed grafted conjugated polyelectrolyte-stabilized magnetic nanoparticles as multifunctional platform for cellular imaging and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2014, 2, 376-386.
3. Bin Du, Shuping Han, Hongyan Li, Feifei Zhao, Xiangjie Su, Xiaohui Caoa and Zhenzhong Zhang. Multi-functional liposomes showing radiofrequency-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor multi-mechanism therapy. *Nanoscale* 2015, 7(12), 5.411-5.426.
4. Lanio, M.E.; Luzardo, M.C.; Laborde, R.; Sánchez, O.; Cruz-Leal, Y.; Pazos, F.; Tejuca, M.; Alonso, M.E.; Fernández, L.E.; Álvarez, C. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev.Cub.Física* 2009, 26, 23-30.
5. Juan D. Sabín Fernández. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis doctoral, Enero 2007, USC.
6. L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* 2011, 3(2), 34-55.
7. Muhammad Iqbal, Gisele Usanase, Kafia Oulmi, Fairouz Aberkane, Tahar Bendaikha, Hatem Fessi, Nadia Zine, Géraldine Agusti, El-Salhi Errachid, Abdelhamid Elaissar. Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods. *Materials Research Bulletin* 2016, 79, 97-104.
8. Duarte, A.; Pu K. Y.; Liu B.; Bazan, G.C. Recent advances in conjugated polyelectrolytes for emerging optoelectronic applications. *Chemistry of Materials* 2011, 23,501-515.
9. Pu, K.Y.; Liu, B. Fluorescent Conjugated Polyelectrolytes for Bioimaging. *Advanced Functional Materials* 2011, 21(18), 3408-3423.
10. Herland, A.; Inganäs, O. Conjugated Polymers as Optical Probes for Protein Interactions and Protein Conformations. *Macromolecular Rapid Communications* 2007, 28(17), 1703-1713.
11. Zhu, C.; Liu, L.; Yang, Q.; Lv, F.; Wang, S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy. *Chemical Reviews* 2012, 112(8), 4.687-4.735.
12. Nilsson, K.P.R.; Hammarström, P. Luminescent Conjugated Polymers: Illuminating the Dark Matters of Biology and Pathology. *Advanced Materials* 2008, 20(13), 2639-2645.
13. Kahveci Z, Martínez-Tomé MJ, Mallavia R, Mateo CR. Use of the conjugated polyelectrolyte poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl]-fluorene-phenylene} bromide (HTMA-PFP) as a fluorescent membrane marker. *Biomacromolecules* 2013, 14, 1990-1998.

14. Kahveci Z, Vázquez-Guilló R, Martínez-Tomé MJ, Mallavia R, Mateo CR. New Red-Emitting Conjugated Polyelectrolyte: Stabilization by Interaction with Biomolecules and Potential Use as Drug Carriers and Bioimaging Probes. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 8, 1958-1969.
15. Kahveci Z, Martínez-Tomé MJ, Esquembre R, Mallavia R, Mateo CR. Selective Interaction of a Cationic Polyfluorene with Model Lipid Membranes: Anionic versus Zwitterionic Lipids. *Materials* 2014, 7, 2120-2140.
16. Josimar Oliveira Eloya, Marina Claro de Souza, Raquel Petrilli, Juliana Palma Abriata Barcellos, Robert J. Lee, Juliana Maldonado Marchetti. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Coloides Surf B Biointerfaces* 2014, 123, 345-363.
17. Mohsen Mahmoud Mady, Mohamed Mahmoud Fathy, Tareq Youssef, Wafaa Mohamed Khalil. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Physica Medica* 2012, 28(4), 288-295.
18. Lauri Paasonen, Timo Laaksonen, Christoffer Johans, Marjo Yliperttul, Kyösti Kontturi, Arto Urtti. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. *Journal of controlled release* 2007, 122(1), 86-93.
19. Tatu Lajunen, Lauri Viitala, Leena-Stiina Kontturi, Timo Laaksonen, Huamin Liang, Elina Vuorimaa-Laukkanen, Tapani Viitala, Xavier Le Guével, Marjo Yliperttula, Lasse Murtomäki, Arto Urtti. Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles. *Journal of controlled release* 2015, 203, 85-98.
20. Antonio P. Costa, Xiaoming Xu, Diane J. Burgess. Freeze-Anneal-Thaw Cycling of Unilamellar Liposomes: Effect on Encapsulation Efficiency. *Pharmaceutical Research* 2014, 31(1), 97-103.

Anexo

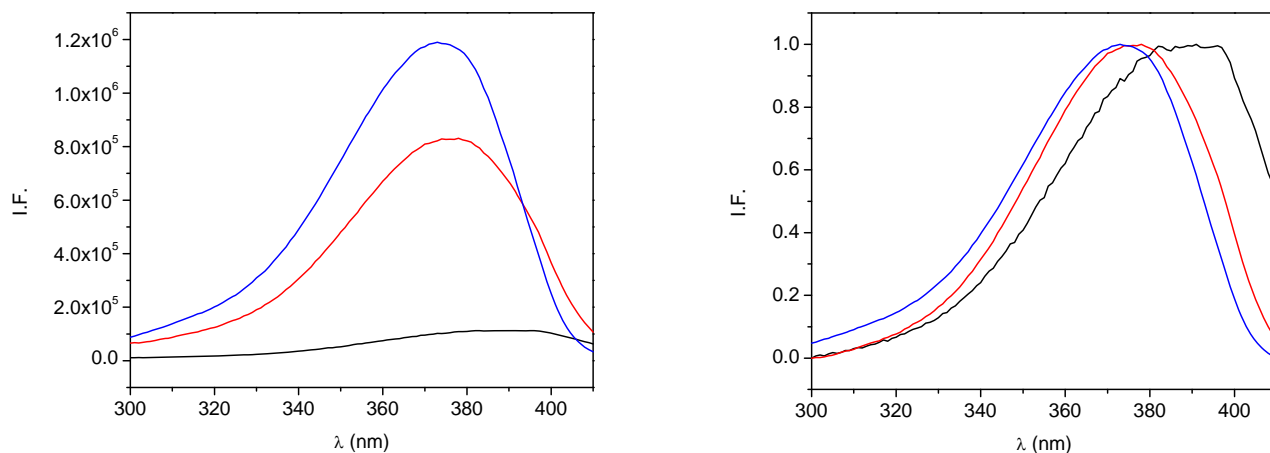


Figura 29. Espectro de excitación de fluorescencia no corregidos del HTMA-PFP 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP; agua MilliQ y etanol, EtOH.

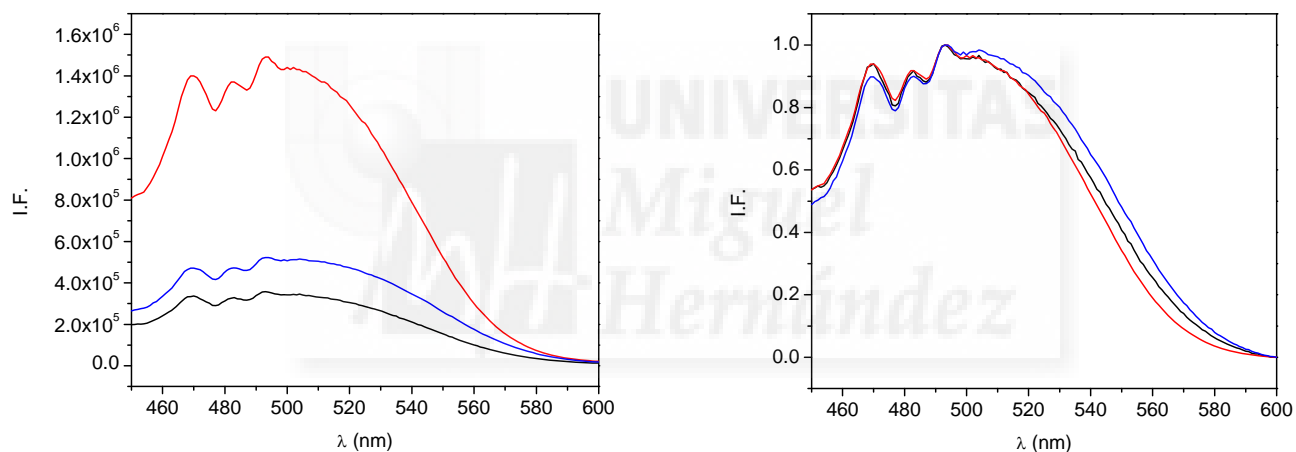


Figura 30. Espectro de excitación de fluorescencia no corregidos del HTMA-PFNT 3 μM (izquierda) y normalizado (derecha) en diferentes disolventes: tampón fosfato, TP; agua MilliQ y etanol, EtOH.

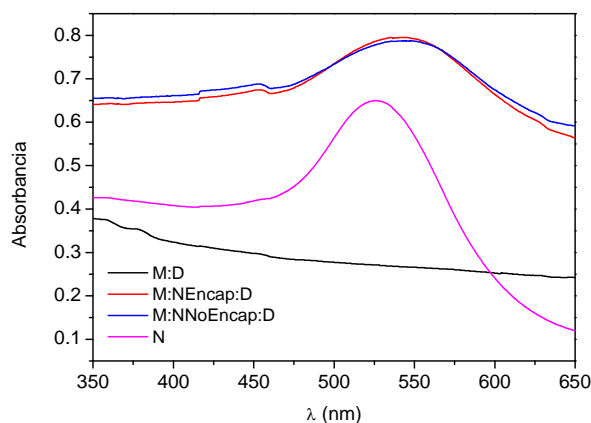


Figura 31. Espectro de absorción en bruto de las AuNPs de MLVs de EPC 1mM + DPH 1mM (M:D), MLVs de EPC 1mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1mM (M:NEncap:D), MLVs de EPC 1mM + AuNPs No Encapsuladas + DPH 1mM (M:NNoEncap:D) y AuNPs (N).

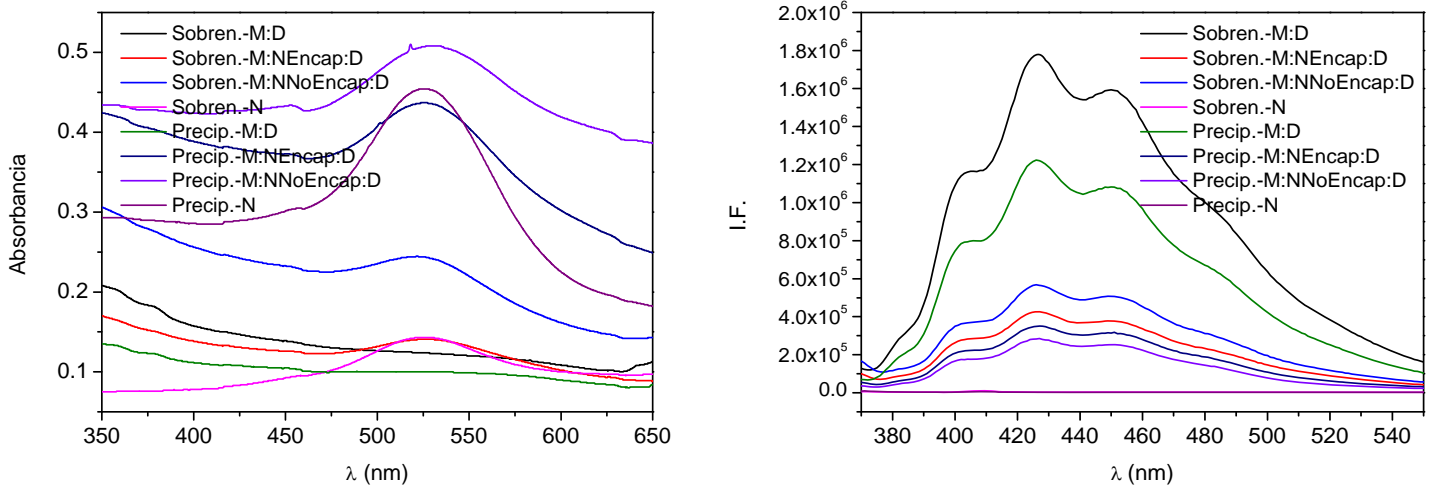


Figura 32: Espectros de absorción de las AuNPs (izquierda) y de emisión de fluorescencia del DPH (derecha) del sobrenadante y precipitado de las muestras de MLVs de EPC 1 mM + DPH 1 mM (M:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NEncap:D), MLVs de EPC 1 mM + AuNPs No Encapsuladas + DPH 1 mM (M:NNoEncap:D) y AuNPs (N).

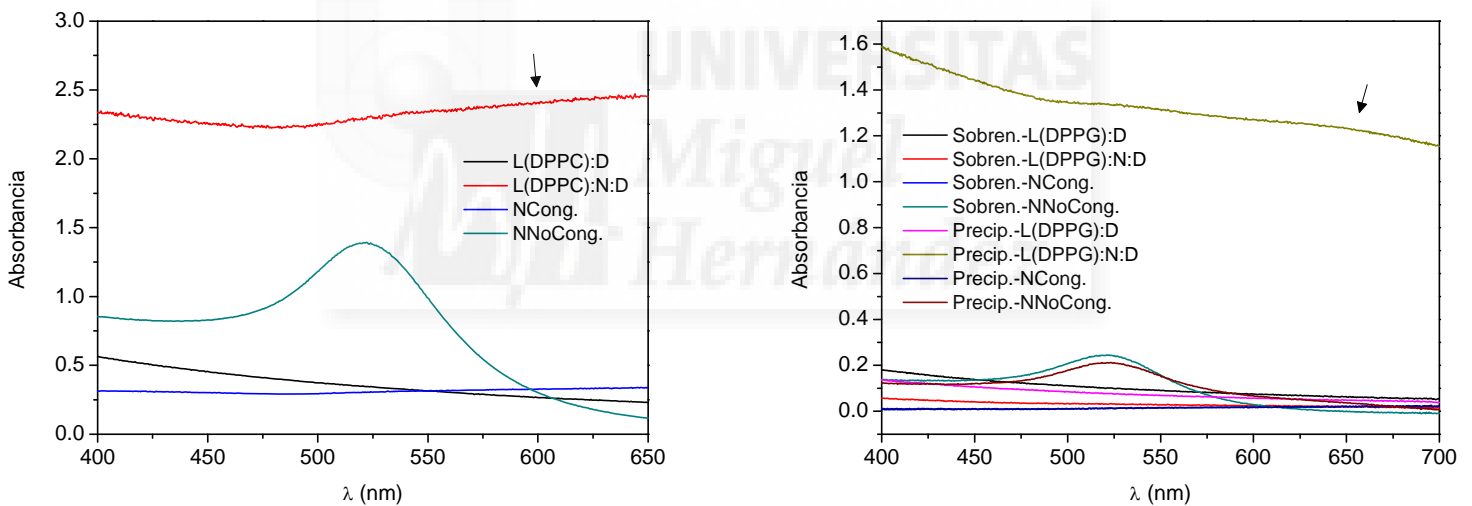


Figura 33. Espectros⁴ de absorción de las AuNPs antes (izquierda) y después (derecha) de centrifugar a 14.300 rpm durante 10' de LUVs de DPPC 1 mM + DPH 1 mM (L(DPPC):D), LUVs de DPPC 1 mM + AuNPs + DPH 1 mM (L(DPPC):N:D), AuNPs congeladas (NCong.) y AuNPs sin congelar (NNoCong.).

⁴ El alto valor de la absorbancia indica la gran dispersión inducida por estos agregados.