

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOHÍBRIDOS  
PLASMÓNICOS MULTIFUNCIONALES BASADOS EN  
LIPOSOMAS**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Curso académico 2023/2024

**PABLO MARINO MARTÍN**

*Tutora: Carmen Reyes Mateo Martínez*

*Cotutora: Marta Rubio Camacho*

**Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente**

**Área de Química-Física**

**Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de  
Elche (IDiBE)**

**Título:** Síntesis y caracterización de nanohíbridos plasmónicos multifuncionales basados en liposomas.

**Resumen:** En la presente investigación se han sintetizado nanohíbridos multifuncionales basados en liposomas compuestos por un lípido zwitteriónico (DPPC), nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) y una amina grasa insaturada (oleilamina). Este estudio se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas como la espectrometría UV-visible, para confirmar su formación, así como un analizador de tamaño de partícula (DLS) para estudiar su morfología y tamaño, con el que también se midió su potencial Z (ZP) para evaluar así su estabilidad. Finalmente, se ha podido visualizar la morfología de los nanohíbridos utilizando un microscopio electrónico FESEM en modo de transmisión de barrido (STEM). Por otro lado, los resultados revelan la correcta incorporación de oleilamina y de las AuNPs en las vesículas liposomales con objeto de dotar a los nanohíbridos de propiedades fototérmicas y quimioterapéuticas. A la luz de estos resultados, es posible proponer el uso potencial de estos nanohíbridos multifuncionales basados en liposomas como vehículo de transporte y liberación controlada de fármacos, que además presentan la posibilidad de usarse como terapia fototérmica plasmónica cuando las NPs son irradiadas con láser.

**Palabras clave:** liposomas, nanopartículas metálicas de oro, oleilamina, nanohíbridos multifuncionales, propiedades fototérmicas y quimioterapéuticas.

**Title:** Synthesis and characterization of multifunctional plasmonic nanohybrids based on liposomes.

**Abstract:** In the present research, multifunctional nanohybrids based on liposomes composed of a zwitterionic lipid (DPPC), metallic gold nanoparticles (AuNPs) and an unsaturated fatty amine (oleylamine) have been synthesized. This study was carried out using different techniques such as UV-visible spectrometry, to confirm its formation, as well as a particle size analyzer (DLS) to study its morphology and size, with which its Z potential (ZP) was also measured to evaluate its stability. Finally, the morphology of the nanohybrids has been visualized using a FESEM electron microscope in scanning transmission mode (STEM). On the other hand, the results reveal the correct incorporation of oleylamine and the AuNPs in the liposomal vesicles in order to provide the nanohybrids with photothermal and chemotherapy properties. In light of these results, it is possible to propose the potential use of these multifunctional nanohybrids based on liposomes as a transport and controlled release vehicle for drugs, which also has the possibility of being used as photothermal therapy when the NPs are irradiated with a laser.

**Keywords:** Liposomes, metallic gold nanoparticles, oleylamine, multifunctional nanohybrids, photothermal and chemotherapy properties.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1 Antecedentes históricos.....	4
1.2 Nanopartículas de oro (AuNPs).....	5
1.2.1 Resonancia de plasmón superficial (SPR) .....	7
1.2.2 Terapia fototérmica plasmónica .....	8
1.3 Liposomas .....	8
1.3.1 Liposomas termosensibles (TSLs) .....	10
2. Antecedentes .....	11
2.1 Nanohíbridos multifuncionales .....	11
2.2 Antecedentes del grupo de investigación .....	12
3. Objetivos.....	13
4. Materiales y métodos .....	13
4.1 Materiales .....	13
4.2 Métodos .....	13
5. Resultados y discusión .....	17
5.1 Caracterización de AuNPs.....	18
5.2 Caracterización de TSLs.....	21
5.2.1 TSLs de DPPC .....	21
5.2.2 TSLs de DPPC y oleilamina.....	24
5.3 Análisis de la interacción entre vesículas liposomales de DPPC y AuNPs .....	26
5.3.1 Análisis la interacción entre vesículas de DPPC y AuNPs “ex situ” .....	26
5.3.2 Análisis de la interacción entre vesículas de DPPC y AuNPs_3 “in situ” .....	31
5.4 Conversión fototérmica .....	35
6. Conclusiones y proyección futura.....	36
7. Bibliografía .....	38

# Abreviaturas

- **DPPC**      1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
- **AuNPs**      Nanopartículas metálicas de oro
- **AgNPs**      Nanopartículas metálicas de plata
- **MLVs**      Vesículas multilamelares (del inglés *multilamellar vesicles*)
- **LUVs**      Vesículas unilamelares grandes (del inglés *large unilamellar vesicles*)
- **T<sub>c</sub>**      Temperatura de transición de fase
- **SPR**      Resonancia de plasmón superficial (del inglés *surface plasmon resonance*)
- **ZP**      Potencial Z
- **TSLs**      Liposomas termosensibles (del inglés *thermosensitive liposomes*)
- **FESEM**      Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
- **STEM**      Microscopio electrónico de transmisión de barrido
- **DLS**      Dispersión dinámica de la luz (del inglés *dynamic light scattering*)
- **NPs**      Nanopartículas
- **NIR**      Región del infrarrojo cercano

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes históricos

El físico Richard Feynman presentó por primera vez en 1959 los fundamentos conceptuales de la nanotecnología. Feynman describió un proceso con el que poder manipular átomos y moléculas individuales, empleando herramientas de precisión para construir y operar a nanoescala. Sin embargo, no fue hasta 1974 cuando Norio Taniguchi utilizó el término “nanotecnología” en una conferencia para describir los procesos de: producción, separación, consolidación y deformación a escala nanométrica de materiales átomo por átomo, molécula por molécula.

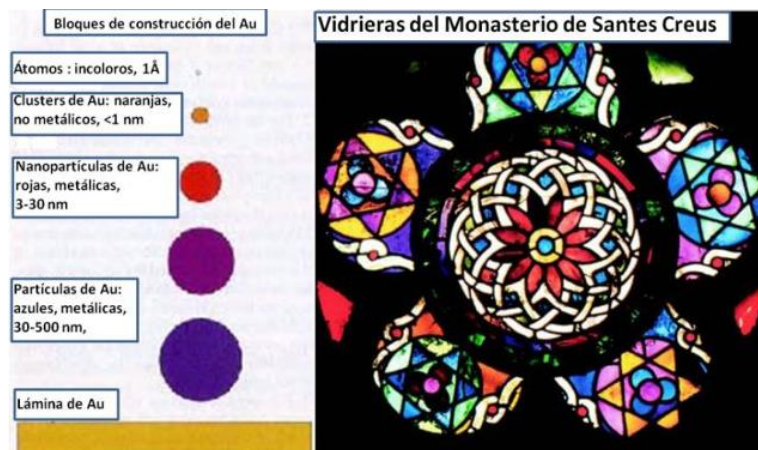
A partir de entonces, la nanotecnología y la nanociencia tuvieron una notable presencia, fundamentalmente con la invención, a inicios de la década de 1980, del microscopio de efecto túnel y el microscopio de fuerza atómica, que permitieron por primera vez manipular los átomos de forma voluntaria. Como consecuencia de ello, durante las siguientes décadas la nanociencia comenzó su desarrollo aplicado de forma exponencial, impulsando diversas áreas de la tecnología como la industria, la electrónica, el sector energético y, sobre todo, la medicina.

Una de las áreas de investigación más importantes en la nanociencia se ha centrado en la creación y análisis de nanopartículas (NPs). En el ámbito de la nanotecnología, una nanopartícula se describe como un objeto diminuto que actúa como una unidad integral en términos de transporte y propiedades, con un tamaño que varía entre 1 y 100 nanómetros de diámetro. Las NPs despiertan un gran interés científico porque actúan como un enlace entre los materiales macroscópicos y las estructuras atómicas o moleculares. Las propiedades de los materiales cambian a medida que su tamaño se reduce a la nanoescala y el porcentaje de átomos en la superficie se vuelve significativo. Frecuentemente, estos materiales exhiben propiedades ópticas inesperadas, ya que su pequeño tamaño permite confinar los electrones y generar efectos cuánticos.

Uno de los ejemplos más característicos de estos nanomateriales son las nanopartículas metálicas de oro (AuNPs), que serán detalladas más adelante. Aunque sus interesantes propiedades ópticas no tuvieron una explicación física hasta muchos años después, se sabe que fueron utilizadas durante siglos. Por ejemplo, los primeros datos sobre el oro coloidal se pueden encontrar en los tratados de científicos chinos, árabes e indios, que lograron obtener oro coloidal ya en los siglos V-IV a.C. Lo utilizaban con fines medicinales (“solución dorada” china y “oro líquido” indio), entre otros usos (Dykman y col., 2011). Además, uno de los objetos más antiguos registrados que contiene nanomateriales es la copa que representa la muerte del Rey Licurgo elaborada por los romanos en el siglo IV d.C. con una mezcla de vidrio de sosa y cal en la cual destaca la presencia de AuNPs y nanopartículas de plata (AgNPs). Debido a la presencia de estas NPs, el color de la copa varía de verde a rojo intenso cuando se introduce una fuente luminosa en su interior (Freestone y col., 2007).

También destacan algunas vidrieras de las catedrales europeas medievales, donde empleaban nanopartículas metálicas durante su fabricación con el fin de modificar sus propiedades de color, en las que dependiendo del

tamaño de las AuNPs utilizadas se producían distintas tonalidades de color en las vidrieras de estas catedrales (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto del tamaño de las AuNPs en el color de las vidrieras del Monasterio de Santes Creus, Cataluña. Datan del siglo XIII.

Otro ejemplo de estos nanomateriales, en este caso de naturaleza orgánica, serían los liposomas, los cuales fueron descritos por primera vez en 1965 de la mano de *Banghman y col.* (1965) en el Instituto Babraham, Universidad de Cambridge, y desde entonces ha habido innumerables estudios relacionados con ellos y con sus aplicaciones, sobre todo aquellas relacionadas con sistemas de transporte y liberación de fármacos. De hecho, los liposomas fueron el primer tipo de sistema de liberación de fármacos de base nanotecnológica, reportado en los años 70 del siglo pasado. Entre otras cuestiones, los liposomas destacan como herramientas muy versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina, ya que presentan importantes ventajas con respecto a otros sistemas de transporte.

## 1.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Actualmente, el interés por las AuNPs está en aumento, debido a que presentan excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas (intrínsecas a su escala nanométrica) que pueden ser controladas mediante parámetros como su tamaño, morfología y composición (Chávez-Sandoval y col., 2021). Concretamente, las AuNPs presentan una gran cantidad de ventajas —facilidad para modificar su superficie, biocompatibilidad, naturaleza inerte químicamente y mínima toxicidad— que las convierten en las candidatas ideales para aplicaciones biomédicas (Dykman y col., 2011). Pero no solo se han aplicado al sector de la medicina, estas nanoestructuras de oro han sido usadas ampliamente en diversas aplicaciones como la catálisis, fotónica, electrónica, optoelectrónica, diagnóstico, detección química, biológica, biomédica y terapia fototérmica. La mayoría de estas aplicaciones son consecuencia del efecto de resonancia de plasmón superficial, un fenómeno físico característico de las nanoestructuras metálicas que será descrito en el apartado siguiente.

En el ámbito de la biomedicina, el tamaño de las NPs y la distribución de tamaño pueden influir en la capacidad de carga y la liberación del fármaco, también en el destino biológico (biodistribución) y la toxicidad (Bawarski y col., 2008). La relación existente entre el área superficial y el volumen es mayor cuanto más pequeña es la partícula. Un inconveniente de las AuNPs en comparación con las NPs de naturaleza orgánica, como los liposomas o las nanopartículas poliméricas, es que solo tienen capacidad para llevar el fármaco unido a su superficie, por lo que no son especialmente indicadas para esta aplicación (Moddaresi y col., 2010). Sin embargo, cabe señalar que las AuNPs pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) (Al-Qadi y Remuñán-López, 2009).

Otra característica importante es la carga superficial de las NPs, la cual puede ser caracterizada por el potencial Z (ZP), siendo el potencial eléctrico de las partículas dependiente de multitud de factores como son la composición de la partícula, el medio en el que se dispersa y su recubrimiento. Conociendo este potencial se puede determinar la estabilidad de las nanopartículas en suspensión como veremos más adelante. El recubrimiento de la superficie es además fundamental para proporcionar una alta solubilidad acuosa y evitar la agregación de las nanopartículas.

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 para disminuir el tamaño de los materiales hasta la obtención de NPs; y de abajo hacia arriba (del inglés bottom-up), el cual consiste en la unión de átomos o moléculas individuales hasta llegar a la formación de NPs (Abid y col., 2022).

El método Bottom-up es el más empleado para la obtención de NPs. Dentro de este, una de las técnicas más comunes para sintetizar AuNPs es el método de Turkevich-Frens (Kimling y col., 2006). Este se realiza en una solución acuosa donde tiene lugar la reducción del trihidrato de ácido tetracloráurico (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ) con citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) a 100 °C. Este último actúa como agente reductor y estabilizante en la reacción, y son precisamente los grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) del citrato los responsables de que las AuNPs obtenidas mediante esta estrategia presenten carga negativa.

Debido a los agentes tóxicos, las altas temperaturas del proceso y el impacto ambiental que genera este método de síntesis, se están buscando alternativas más respetuosas con el medio ambiente que son conocidas como rutas o métodos “verdes”. Un ejemplo sería el uso del ácido ascórbico como agente reductor, este es capaz de transformar los iones de oro (III) ( $\text{Au}^{3+}$ ) en nanopartículas de oro elemental o metálico ( $\text{Au}^0$ ). A diferencia del primer método, este no necesita altas temperaturas, ni surfactantes tóxicos o ambientes químicos agresivos, además el ácido ascórbico es una molécula biocompatible, lo que hace que las AuNPs sintetizadas mediante este método sean adecuadas para aplicaciones biomédicas, incluyendo la entrega de fármacos y las terapias contra el cáncer.

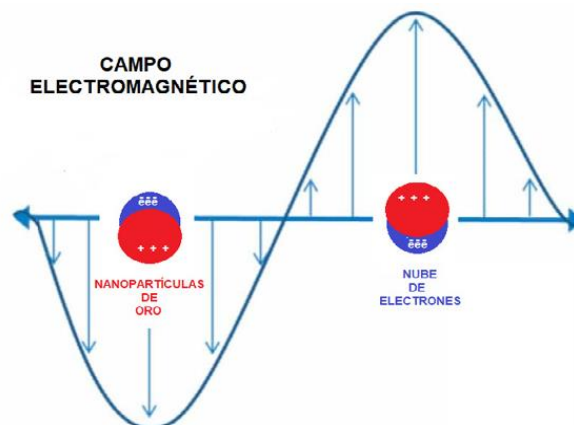
### 1.2.1 Resonancia de plasmón superficial (SPR)

Las nanopartículas de metales nobles, conocidas también como nanopartículas plasmónicas, se caracterizan por su fenómeno de Resonancia del Plasmón Superficial (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance) causante de las propiedades ópticas y fototérmicas de las AuNPs. La SPR consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción dentro de las NPs cuando éstas son excitadas con luz (radiación electromagnética). Para que este fenómeno ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente.

Las propiedades ópticas de la SPR en NPs esféricas se puede explicar con base en la teoría de Mie (Bohren & Huffman, 1998), de forma que cuando una partícula metálica es expuesta a la luz, el campo electromagnético alternante de la luz incidente interacciona con la partícula e induce una oscilación colectiva de los electrones libres del metal (electrones de la banda de conducción) con una cierta frecuencia, lo que se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las NPs en una determinada zona del espectro. Además, este fenómeno es altamente dependiente de la forma, tamaño, cristalinidad, agregación y naturaleza química de las NPs, y también de las condiciones físicas y químicas del medio circundante alrededor de ellas (Cruz y col., 2012).

La SPR genera dos efectos:

1. El fenómeno de la dispersión de luz, este se produce por el desplazamiento de los electrones libres de carga negativa respecto al núcleo del metal de carga positiva, generando un dipolo oscilante que emite radiación electromagnética a la misma frecuencia de la oscilación según se observa en la (Figura 2) (Anaya y col., 2019).
2. El fenómeno de absorción, mediante el cual se produce el calentamiento de las AuNPs cuando estas son irradiadas por un haz de luz a una determinada  $\lambda$ .



**Figura 2.** Resonancia de plasmón superficial (SPR) (Anaya y col., 2019).

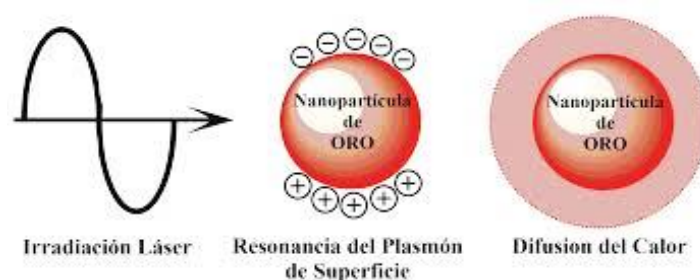


La banda plasmónica de las AuNPs con morfología esférica presenta un máximo de absorción en longitudes de onda que van desde los 450 nm a los 600 nm, en el que evidentemente influirá el tamaño de las NPs, de forma que cuanto mayor es el diámetro de la nanopartícula, el pico de máxima absorción se desplaza hacia mayores longitudes de onda (Link & El-Sayed, 1999).

Además, existen diferentes estrategias que permiten desplazar esta banda de absorción de las AuNPs esféricas hacia la región del infrarrojo cercano (NIR) que va desde los 800 a los 2500 nm. El desarrollo de estas nanoestructuras es de interés en el campo de la biomedicina, haciendo posible uso en terapia fototérmica para la eliminación específica de células tumorales mediante ablación térmica (Gutiérrez-Cruz y col., 2022).

### 1.2.2 Terapia fototérmica plasmónica

El avance sintético en la última década ha generado gran cantidad de AuNPs anisotrópicas de diferentes formas y tamaños, entre las que destacan los nanorods, nanoprismas, nanovarillas, etc. Estas NPs presentan la peculiaridad de poseer la banda plasmónica desplazada hacia el NIR, algo especialmente útil si se quiere desarrollar una terapia fototérmica contra el cáncer, ya que, si irradiamos estas AuNPs con luz infrarroja, en torno a 800 nm o longitudes de onda superiores, las NPs absorberán energía y desprenderán calor a través de varios procesos no reactivos (Figura 3). Y, dado que la hipertermia suave ( $>43^{\circ}\text{C}$ ) es un complemento perfecto de la radioterapia y quimioterapia convencional, si el aumento de temperatura se produce en el mismo tumor, el calor generado provocaría la necrosis de las células tumorales. Gracias a este plasmón desplazado hacia el infrarrojo, la absorción de los componentes biológicos es limitada y los tejidos sanos no se verían afectados (Khan y col., 2022). De hecho, la terapia fototérmica plasmónica basada en NPs ya se ha probado en ensayos clínicos con resultados bastante prometedores (Amini, 2019; Rengan y col., 2015; Rastinehad y col., 2019).



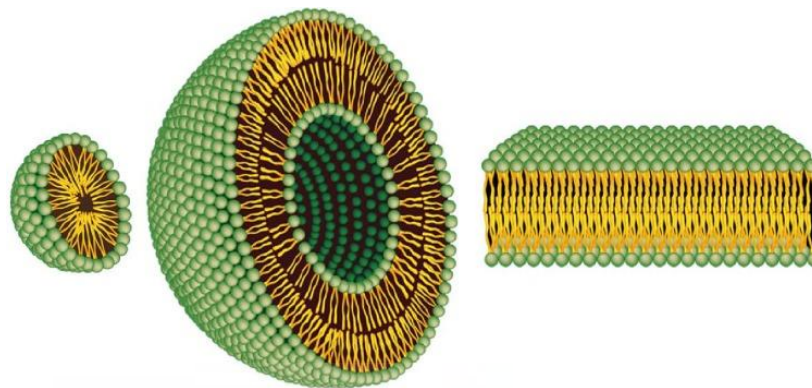
**Figura 3.** Principio en el que se basa la terapia fototérmica plasmónica.

### 1.3 Liposomas

Los liposomas (Figura 4) son vesículas esféricas que están compuestas de bicapas lipídicas concéntricas (simples o múltiples) que encapsulan un compartimento acuoso en su núcleo. Permiten adsorber y transportar sustancias hidrosolubles (en su interior) y liposolubles (en la bicapa lipídica).

En los últimos años, el interés por la utilización de estas estructuras como sistemas de transporte va en aumento, desde el sector farmacéutico al cosmético. Actualmente se considera el mejor portador de fármacos gracias a que son biológicamente inertes, no inmunogénicos, biodegradables y de toxicidad limitada. Además, presentan una estructura similar a la de las membranas celulares (Bozzuto & Molinari, 2015).

En cuanto a la localización de los fármacos, y siguiendo el principio que hemos comentado anteriormente, 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 (Villanueva, 2020).

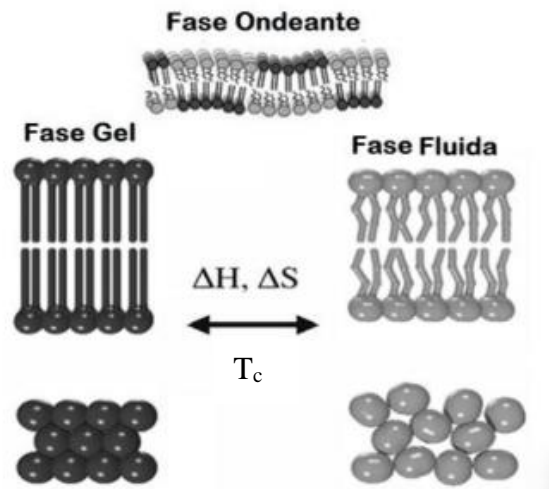


**Figura 4.** Representación de la estructura de una micela (izquierda), un liposoma (centro) y una bicapa lipídica (derecha) (Bozzuto & Molinari, 2015).

En lo que respecta a las características estructurales, los liposomas se pueden clasificar según el tamaño y el número de capas de la membrana de fosfolípidos (Akbarzadeh y col. 2013). Aquellos que poseen una serie de bicapas lipídicas concéntricas separadas por una fase acuosa se denominan vesículas multilamelares (MLVs, del inglés multilamellar vesicles). Si estos sufren un proceso de extrusión pasarán a llamarse vesículas unilamelares grandes (LUVs, del inglés large unilamellar vesicles), estas últimas están compuestas por una única bicapa lipídica que rodea el compartimento acuoso y miden entre 100-250 nm, con lo que pueden ser consideradas NPs. Además, los LUVs son el tipo de liposomas más utilizado en aplicaciones biomédicas para el transporte de fármacos.

A su vez, la bicapa lipídica posee fluidez y movilidad, las cuales dependen mayoritariamente de la temperatura. A bajas temperaturas, los lípidos se encuentran en estado *gel cristalino*, con una estructura rígida y la movilidad reducida. Al ir aumentando la temperatura, tiene lugar una pretransición de fase que tiene que ver con el aumento en la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y la aparición de ondulaciones en la superficie de los liposomas. Y, finalmente, cuando la temperatura supera la temperatura de transición de fase ( $T_c$ ), que es la temperatura a la cual las cadenas de ácidos grasos se funden, este sufre una transición termotrópica hacia un estado gel líquido o *fase fluida*, donde la fluidez de la bicapa aumenta debido a una mayor libertad rotacional de las colas de los fosfolípidos (Figura 5) (Sabín Fernández, 2007). La formación de liposomas se produce a una

temperatura superior a la  $T_c$  de los lípidos que los constituyen y de ahí la importancia de conocer esta temperatura.



*Figura 5. Esquema de una transición de fase lipídica.*

### 1.3.1 Liposomas termosensibles (TSLs)

Los TSLs son un tipo concreto de liposomas que responden aumentando la fluidez de su bicapa lipídica (haciéndola más permeable) frente a un aumento de temperatura. Generalmente, los TSLs están constituidos por lípidos con  $T_c$  por encima de la temperatura ambiente. Desde su descubrimiento en 1978, los TSLs se han convertido en una de las herramientas más estudiadas para el transporte y liberación de fármacos (Yatvin y col., 1978). En la literatura encontramos la aplicación de diferentes tipos de liposomas compuestos por lípidos aniónicos, zwitteriónicos o una mezcla de ambos, con  $T_c$  superiores a los  $37^\circ\text{C}$  (por encima de la temperatura corporal) con el objetivo de poder controlar la liberación del fármaco contenido en su interior (Riske y col., 2009; Pippa y col., 2015).

Un ejemplo de estos lípidos, sería el 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac(1-glicerol, también conocido como DPPG, un fosfolípido sintético aniónico que posee una cabeza polar hidrofílica de fosfatidil glicerol cargada negativamente (PG) y dos cadenas de ácido palmítico (ácido graso saturado de 16 carbonos) unidas a un glicerol. Su  $T_c$  ocurre entre  $41-42^\circ\text{C}$ , aunque puede desplazarse a temperaturas superiores dependiendo del tampón utilizado (Riske y col., 2009).

Otro ejemplo sería el 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), un lípido zwitteriónico que posee una cabeza polar de fosfocolina y también dos cadenas de ácido palmítico. La presencia de grupos funcionales tanto con carga positiva (colina) como negativa (fosfato) dentro de la misma molécula, provoca que no tenga carga neta. Además, el DPPC posee una  $T_c \approx 41^\circ\text{C}$  que a diferencia del DPPG no depende del pH ni de la fuerza iónica del medio (Pentak, 2014). Por ello los liposomas constituidos por este lípido se pueden considerar

termosensibles, y existen numerosos estudios publicados donde son utilizados como medio de transporte y liberación de fármacos, ya que pueden transportarlos a temperaturas fisiológicas y liberarlos en el sitio de acción al elevar la temperatura unos pocos grados (Ta & Porter, 2013).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Nanohíbridos multifuncionales**

En los últimos años, la investigación en nanociencia ha evolucionado desde la síntesis y aplicación de nanomateriales con características propias, a la combinación de nanoestructuras que poseen propiedades diferentes, con objeto de crear sistemas integrados inteligentes, cuya funcionalidad es consecuencia de la sinergia de las propiedades de sus diferentes componentes y de cómo se conectan entre ellos. Con este objetivo, dentro del campo de la biomedicina se están combinando y acoplado nanoestructuras tanto orgánicas (poliméricas, lipídicas, etc) como inorgánicas (NPs metálicas, quantum dots, etc) dando lugar así a nanohíbridos multifuncionales (Meins y col., 2013).

Un ejemplo de nanohíbrido multifuncional es el acoplamiento de AuNPs con TSLs. Esta combinación puede ser de gran utilidad en el tratamiento del cáncer, ya que permite obtener nanoestructuras plasmónicas capaces de transportar fármacos y liberarlos de forma controlada. Así, al irradiar los nanohíbridos a la longitud de onda donde se encuentre su plasmón o pico de máxima absorción, estos absorberán energía y desprenderán calor que puede utilizarse para estimular la transición de fase del liposoma controlando la liberación y la salida del fármaco hacia el exterior de forma sencilla y efectiva. Un ejemplo de ello serían los estudios de liposomas funcionalizados con AuNPs para liberación controlada de doxorubicina y su aplicación en diversos tratamientos contra el cáncer (García y col., 2021; Simón y col., 2023). Como se comentó en el punto 1.2.2, también se pueden emplear liposomas para transportar las AuNPs hasta su sitio de acción e irradiarlas posteriormente, el calor generado por las NPs puede matar las células cancerígenas de forma selectiva, es lo que conocemos como terapia fototérmica plasmónica de la que existen numerosos estudios publicados (Amini, 2019; Rastinehad y col., 2019; Rengan y col., 2015).

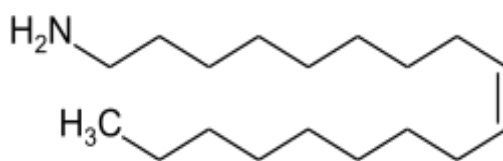
Además, como las AuNPs son agentes de contraste multimodales muy eficaces en la toma de imágenes mediante resonancia magnética, los nanohíbridos podrían utilizarse también para el diagnóstico del cáncer. Es lo que se conoce como teragnosis, un nuevo enfoque médico que combina el diagnóstico y la terapia en una única plataforma, generalmente a través de nanopartículas u otras tecnologías avanzadas. Este método permite identificar y tratar enfermedades de manera simultánea y personalizada, mejorando la precisión y la eficacia de los tratamientos (Mhanna y col., 2023).

En resumen, el desarrollo de nanohíbridos multifuncionales permite aunar las excelentes características de transporte y liberación de fármacos de los TSLs con las propiedades fototérmicas y de imagen de las AuNPs, permitiendo integrar la quimioterapia, la terapia fototérmica y la detección en una sola nanoestructura.

## 2.2 Antecedentes del grupo de investigación

El grupo en el que se ha llevado a cabo este trabajo de fin de grado tiene, entre sus líneas de investigación, el desarrollo de nanohíbridos multifuncionales enfocados al transporte y liberación controlada de fármacos. Recientemente, el grupo ha desarrollado TSLs de DPPG a los que incorporó nanopartículas fluorescentes, con objeto de incluir la capacidad de bioimagen a estas nanoestructuras que podían liberar fármacos mediante hipertermia (Rubio-Camacho y col., 2019). Siguiendo con esta línea, actualmente están trabajando en el desarrollo de nanohíbridos plasmónicos con absorción en el visible y en el NIR, acoplando liposomas a AuNPs, con el fin de controlar la liberación del fármaco mediante hipertermia fotoinducida. Dado que el desplazamiento del plasmón hacia el infrarrojo puede llevarse a cabo modificando la morfología de la nanopartícula, una opción para crear nanohíbridos con banda de plasmón en el NIR es sintetizar nanoprismas de oro y unirlos covalentemente a TSLs. Esta primera estrategia está siendo investigada por el grupo, pero tiene la desventaja de que la síntesis de nanoprismas y posterior unión al liposoma es muy costosa y no es sostenible medioambientalmente.

Otra estrategia es intentar acoplar las AuNPs a los TSLs a través de uniones no covalentes, facilitando la interacción electrostática entre ambos componentes. Las AuNPs podrían quedar unidas a la superficie de forma individual o formando clústers que desplazarían el plasmón hacia el NIR (Rubio-Camacho y col., 2023). El trabajo de fin de grado que aquí presento se encuentra encuadrado dentro de este objetivo. Dado que la mayoría de las AuNPs tienen carga negativa, es necesario trabajar con TSLs cargados positivamente, o al menos de naturaleza zwitteriónica, como el DPPC. Es por ello por lo que parte del estudio que se ha llevado a cabo incluye la formación y caracterización de liposomas catiónicos, para lo que se ha utilizado una estrategia novedosa que consiste en incorporar la molécula oleilamina a la bicapa lipídica de los liposomas. Se ha seleccionado este compuesto por ser una amina grasa insaturada que está cargada positivamente debido a la presencia de un grupo amino en su estructura (*Figura 6*). De esta forma, la inclusión de la oleilamina, permitiría dotar al DPPC de carga positiva, lo que debería mejorar su interacción con las AuNPs además de, probablemente, desplazar la banda de plasmón superficial hacia el NIR.



**Figura 6.** Estructura molecular Oleilamina.

### 3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo preparar nanohíbridos multifuncionales que integren las funciones de transporte de fármacos, liberación controlada y terapia fototérmica, utilizando TSLs, AuNPs y oleilamina como base para ello. El lípido elegido para la fabricación de TSLs es el DPPC, ya que es un lípido zwitteriónico (sin carga neta) y su temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) es ligeramente superior a la temperatura corporal. La oleilamina se ha seleccionado por su capacidad de dotar al liposoma de DPPC de carga positiva, esto debería mejorar su interacción con las AuNPs.

Específicamente, este estudio persigue los siguientes objetivos:

- Síntesis y caracterización de distintos tipos de AuNPs.
- Síntesis y caracterización de TSLs con diferentes porcentajes de oleilamina.
- Análisis de la interacción entre los TSLs y las AuNPs previamente fabricadas y/o compradas con el objetivo de desarrollar nanopartículas multifuncionales (termosensibles y fotosensibles).
- Evaluación de las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichos nanohíbridos.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Materiales

Para la formación de los liposomas se ha utilizado el fosfolípido sintético 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), el cual se adquirió de Merck Life Science, y la amina grasa insaturada oleilamina ( $C_{18}H_{37}N$ ), adquirida en Acros Organics.

Los reactivos químicos tetracloroaurato ( $HAuCl_4$ ), citrato sódico ( $Na_3C_6H_7O_9$ ) y ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ) para la síntesis en el laboratorio de algunas de las AuNPs (citrato sódico y ácido ascórbico) se adquirieron de Merck Life Science. El resto de AuNPs utilizadas en este estudio han sido comerciales, como los Nanorods o las AuNPs de 10 y 30 nm de diámetro, estas se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

#### 4.2 Métodos

**Determinación de la banda plasmónica de las AuNPs:** Las mediciones de absorción se llevaron a cabo a temperatura ambiente en cubetas de poliestireno desechables de 1cm x 1cm con un espectrofotómetro UV-1603 Shimadzu (Tokio, Japón).

**Determinación de la temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) de los TSLs:** Las mediciones de luz dispersa, recogidas para determinar la  $T_c$  de los TSLs, se realizaron en un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (Nueva Jersey, EE.UU) equipado con una celda Peltier para controlar la temperatura. Todas las muestras se analizaron en cubetas de cuarzo de 10 mm x 10 mm.

Notar que el espectro que se recoge mediante esta técnica no es una verdadera emisión de fluorescencia, sino la propia luz de excitación que atraviesa la muestra y es dispersada por los liposomas alcanzando el detector. Las rendijas y longitudes de onda de emisión y de excitación que se han utilizado en este trabajo se muestran en la *Tabla 1*.

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

	DPPC	DPPC/oleilamina	DPPC/oleilamina/AuNPs
	$\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$
Espectro de emisión	$\lambda_{emi} = 425\text{-}435 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 425\text{-}435 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 425\text{-}435 \text{ nm}$
	Rendijas: 0,17-0,30	Rendijas: 0,18-0,32	Rendijas: 0,22-0,38

**Determinación de la morfología:** Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) en modo STEM (microscopio electrónico de transmisión de barrido) modelo SIGMA 300 VP de ZEISS (*Figura 7*) (Jena, Alemania). Para preparar las muestras, se depositaron 3  $\mu\text{L}$  de estas sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón Formvar/carbon 300-Mesh de Electron Microscopy Science (Hatfield, EE.UU). La gota se deja secar al aire o en su defecto en una estufa a 43°C toda la noche. A las muestras conteniendo únicamente liposomas se les añadió una gota de solución de citrato de plomo como agente de tinción, para incrementar su contraste y mejorar su observación.



**Figura 7.** Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) modelo SIGMA 300 VP de ZEISS.



**Determinación del tamaño y polidispersión:** El tamaño y polidispersión de las partículas se estudió mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), utilizando un Zetasizer Nano-ZS de Malvern (Worcestershire, Reino Unido) equipado con un láser monocromático de Helio-Neón 4 mW ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) como fuente de luz, con un ángulo de dispersión de  $173^\circ$ . Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y en cubetas desechables de poliestireno.

**Determinación de la estabilidad coloidal/carga:** La estabilidad coloidal de las partículas se ha determinado mediante medidas del potencial Z utilizando un Zetasizer Nano-ZS de Malvern (Worcestershire, Reino Unido) equipado con un láser monocromático de Helio-Neón 4 mW ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) como fuente de luz, el mismo instrumento con el que se estableció el tamaño de las partículas. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente en celdas capilares plegadas DTS1070.

Este parámetro nos da una idea de la estabilidad de la partícula analizada a través de la medida de su carga superficial. Para que las partículas sean consideradas como estables el valor del potencial debe ser inferior a, aproximadamente,  $-20 \text{ mV}$  o superior a  $+20 \text{ mV}$ . El signo del potencial nos proporciona información sobre cuál es la carga de su superficie.

**Estudio de la conversión fototérmica:** Para los experimentos de conversión fototérmica se utilizó un equipo diseñado y recién montado en el propio laboratorio, que consta de un diodo láser con emisión a  $520 \text{ nm}$  (CNI Optoelectronic Technology, Changchun, China) acoplado a un portamuestras (Figura 8). La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo que tiene adherida a su pared externa un termopar y se irradió durante 7 minutos a una potencia de láser de  $1,2 \text{ W}$ . Finalmente, se representó en una gráfica el incremento de temperatura frente al tiempo de irradiación.



**Figura 8.** Esquema del montaje del equipo de irradiación de nanopartículas.

**Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) con citrato sódico como reductor y estabilizante:** En primer lugar, se prepararon las disoluciones  $\text{HAuCl}_4$   $1 \text{ mM}$  y  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$   $38,8 \text{ mM}$  con agua Milli-Q. A continuación, se calentaron  $20 \text{ ml}$  de  $\text{HAuCl}_4$  hasta llevarlo a ebullición y en agitación constante. Seguidamente, se añadieron  $2 \text{ ml}$  de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$  y se dejó hirviendo y en agitación durante  $10 \text{ min}$  hasta que la disolución adquirió un profundo color rojo. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente.



**Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) con ácido ascórbico como reductor y estabilizante:** En este caso, se prepararon las disoluciones  $\text{HAuCl}_4$  50 mM y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  10 mM con agua Milli-Q. A continuación, se midieron 1940  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q con una pipeta y se introdujeron en un vial con agitación constante. Por último, se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  y 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$ . A los 2 minutos se paró la agitación.

**Formación de vesículas unilamelares grandes (LUVs):** En primer lugar, se disolvieron los lípidos de DPPC en cloroformo y se dejó secar el disolvente al aire libre o bien con argón (Ar), formándose una fina capa lipídica en el fondo del vial. A continuación, se resuspendió la capa de lípidos con 1 ml de agua Milli-Q por encima de la  $T_c$  del lípido (aproximadamente a 48-50°C), se agitó en el vórtex para favorecer la resuspensión y se adicionaron 1,2 ml más de agua Milli-Q hasta alcanzar una concentración final de 1 mM de DPPC. Por último, y a partir de estos MLVs 1 mM de DPPC formados, se prepararon LUVs por extrusión a presión haciendo pasar la disolución de MLVs a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras (Nucleopore, Cambridge, MA, USA) (Figura 9). De nuevo, este proceso de extrusión también debe hacerse por encima de la  $T_c$  del lípido.



**Figura 9.** Sistema de extrusión de lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc.

**Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs) con oleilamina:** Inicialmente, se disolvieron los lípidos de DPPC con una disolución de oleilamina  $9,17 \cdot 10^{-2} M$  (el volumen añadido varía dependiendo de la concentración final de oleilamina requerida) diluida en cloroformo y se dejó secar el disolvente. A partir de aquí, se siguió el procedimiento de formación de LUVs anteriormente comentado.

**Formación “ex situ” de los nanohíbridos:** Este protocolo de formación se ha denominado “ex situ” dado que las AuNPs se preparan previamente, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, y después se añaden a la muestra de LUVs, con y sin oleilamina. Se mezclaron 1,8 ml de la disolución de AuNPs con 0,2 ml de la suspensión de LUVs de DPPC, con y sin oleilamina, y se resuspendió.

**Formación “in situ” de los nanohíbridos:** En este caso, se sintetizaron las AuNPs (con ácido ascórbico como reductor y estabilizante) directamente sobre la suspensión de vesículas lipídicas, por eso se ha denominado protocolo de formación “in situ”. Se mezclaron 1940  $\mu\text{L}$  de la suspensión de LUVs de DPPC (con oleilamina y sin oleilamina) con 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  10 mM y 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  50 mM.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se comentó en el apartado 3 la finalidad de este trabajo es obtener nanohíbridos multifuncionales acoplando nanopartículas de oro a TSLs, de forma que la nanoestructura final pueda tener, entre otras, la capacidad de transportar fármacos, liberarlos de forma controlada e incrementar la temperatura del entorno. Para ello, se han seleccionado 5 tipos de AuNPs, que se definirán a partir de ahora de la siguiente manera:

**AuNPs\_1:** nanopartículas comerciales de 10 nm de diámetro.

**AuNPs\_2:** nanopartículas comerciales de 30 nm de diámetro.

**AuNPs\_3:** nanopartículas preparadas en el laboratorio mediante un método verde que utiliza en el ácido ascórbico como agente reductor.

**AuNPs\_4:** nanopartículas preparadas en el laboratorio utilizando el método de Turkevich-Frens, mediante reducción con citrato.

**AuNanoRods:** nanopartículas comerciales con morfología cilíndrica.

El DPPC ha sido seleccionado como base para fabricar los TSLs y se ha explorado la capacidad de aumentar la carga positiva en su superficie, y así favorecer la interacción con las AuNPs, mediante la incorporación del compuesto catiónico oleilamina.

El orden seguido a la hora de presentar los resultados es muy similar al orden propuesto en el apartado 3. Inicialmente se mostrarán los correspondientes a la caracterización de los componentes por separado: tamaño, carga, estabilidad coloidal, morfología, localización del plasmón en el caso de las AuNPs y determinación de la temperatura de transición en el caso de los TSLs, tanto sin como con oleilamina.

A continuación, se presentarán los resultados correspondientes a la capacidad de cada una de estas AuNPs para unirse a los TSLs y formar nanohíbridos. Estos experimentos se llevaron a cabo, en la mayoría de los casos, añadiendo las diferentes AuNPs a una suspensión de TSLs, en ausencia y presencia de oleilamina. Es lo que se ha denominado protocolo “ex situ”, como se describe en apartado 4.2. Además, se exploró la posibilidad de fabricar las propias AuNPs directamente sobre una suspensión de TSLs. Esta estrategia, a la que hemos denominado “in situ” en el apartado 4.2, solo se ha podido llevar a cabo mediante el método verde, dado que el método de Turkevich-Frens requiere temperaturas de 100°C para su preparación, que son nocivas para los liposomas.

Finalmente, se muestran los resultados preliminares de conversión de luz en calor de algunas de estas nanopartículas, con objeto de demostrar su potencial uso en terapia fototérmica. Se ha decidido discutir los experimentos conforme se van presentando, en vez de separar los apartados de *Resultados y Discusión*, al considerar que de esta manera se facilita el seguimiento del trabajo.

## 5.1 Caracterización de AuNPs

### - Caracterización del tamaño

El tamaño de estas AuNPs y más concretamente el diámetro hidrodinámico ( $d$ ), se determinó mediante las medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS), las cuales se recogen en la *Tabla 2*.

**Tabla 2.** Diámetro hidrodinámico ( $d$ ), potencial Z (ZP) y pico de máx. absorción de las disoluciones de AuNPs.

AuNPs	PDI	d				ZP	Pico máx.
		Pico 1 $\pm$ sd (nm)	%	Pico 2 $\pm$ sd (nm)	%	Pico $\pm$ sd (mV)	$\lambda$ (nm)
AuNPs_1	0,485	10,1 $\pm$ 2,1	52,6	57,2 $\pm$ 6,8	47,4	- 35,2 $\pm$ 8,6	524
AuNPs_2	0,112	42,6 $\pm$ 16,5	100	--	--	- 44,3 $\pm$ 4,9	526
AuNPs_3	0,137	52,8 $\pm$ 17,3	100	--	--	- 20,8 $\pm$ 7,1	522
AuNPs_4	0,149	56,4 $\pm$ 29,1	100	--	--	- 31,1 $\pm$ 5,6	525
AuNanoRods	0,264	1,7 $\pm$ 0,6	56,4	51,8 $\pm$ 16,2	43,6	30,2 $\pm$ 5,8	802

Primeramente, de los resultados obtenidos se dedujo una posible agregación o precipitación en la muestra de AuNPs\_1 debido a la que casi la mitad (47%) de estas NPs presentaban un diámetro hidrodinámico de 57 nm y a que la polidispersión de la muestra era elevada (índice de polidispersión  $PDI > 0,15$ ), lo que sugirió la existencia de poblaciones heterogéneas de NPs que variaban en tamaño. La causa de esta situación pudo ser la antigüedad de dichas NPs, ya que llevaban bastante tiempo en el laboratorio.

Por otra parte, destacar la presencia de dos picos en el caso de los AuNanoRods. Al ser AuNPs cilíndricas era lo esperado, el pico situado en torno a 1,7 nm se corresponde con la parte transversal del cilindro, mientras que el pico de 51,8 nm se corresponde con la parte longitudinal del mismo.

El resto de AuNPs del estudio (AuNPs\_2, AuNPs\_3 y AuNPs\_4) presentaron el tamaño hidrodinámico que cabría esperar, además los resultados de polidispersión indicaron que las muestras eran monodispersas ( $PDI < 0,15$ ) y, por ende, bastante homogéneas en cuanto a tamaño.

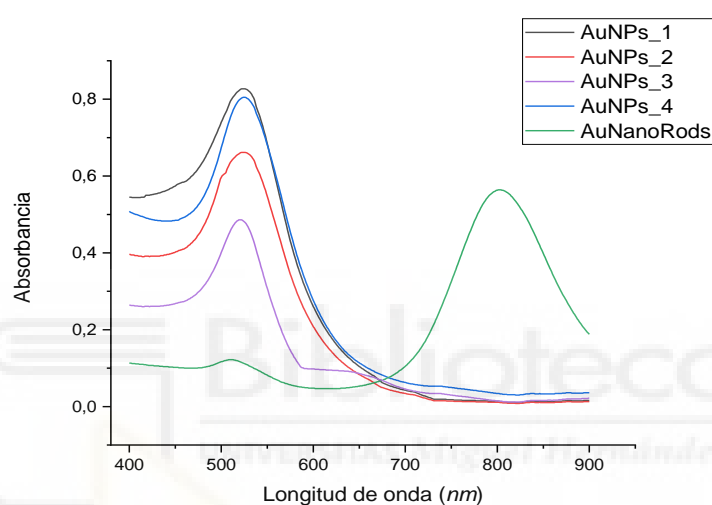
### - Determinación de la estabilidad coloidal

La estabilidad coloidal de las AuNPs se determinó mediante medidas de potencial Z. Dichas NPs han sido consideradas como estables cuando el valor de este potencial es inferior a, aproximadamente, -20 mV o superior a +20 mV, tal y como se mencionó en el apartado 4.2. Según los valores de potencial Z de las AuNPs recogidos en la *Tabla 2*, se concluyó que todas las NPs fueron coloidalmente estables. El hecho de que los AuNanoRods presentasen carga positiva, posiblemente se deba al uso de ciertos surfactantes durante su síntesis como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), el cual puede llegar a conferir carga positiva a las AuNPs debido a la presencia de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) que se adhieren a la superficie de las NPs.

### - Determinación de la banda plasmónica

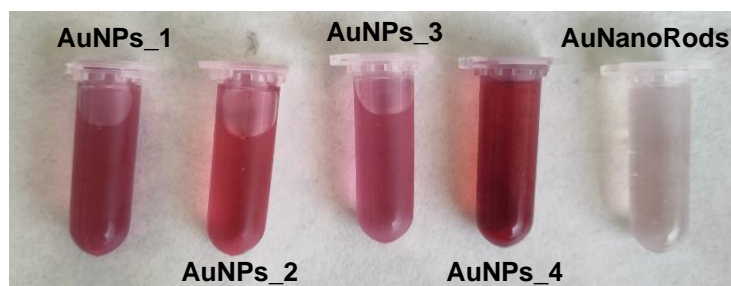
Para determinar la banda plasmónica de las AuNPs, se recogió su espectro de absorción desde los 400 hasta los 900 nm (*Figura 10*). Los espectros obtenidos sugieren cierta homogeneidad y monodispersión en cuanto al tamaño poblacional de las NPs —pico relativamente estrecho— y el máximo de absorción de estas —aproximadamente a 525 nm, propio de las AuNPs esféricas— se refiere.

Por otro lado, analizando el espectro de absorción de los nanorods, se observó la presencia de dos bandas de absorción: la banda de mayor intensidad está situada a una  $\lambda_{\max}$  en torno a los 800 nm, la cual se asocia con la banda de plasmón longitudinal del nanorod. La segunda banda de menor absorción se situó alrededor de los 520 nm y se asocia con la banda transversal del mismo.



**Figura 10.** Espectros de absorción de las distintas AuNPs.

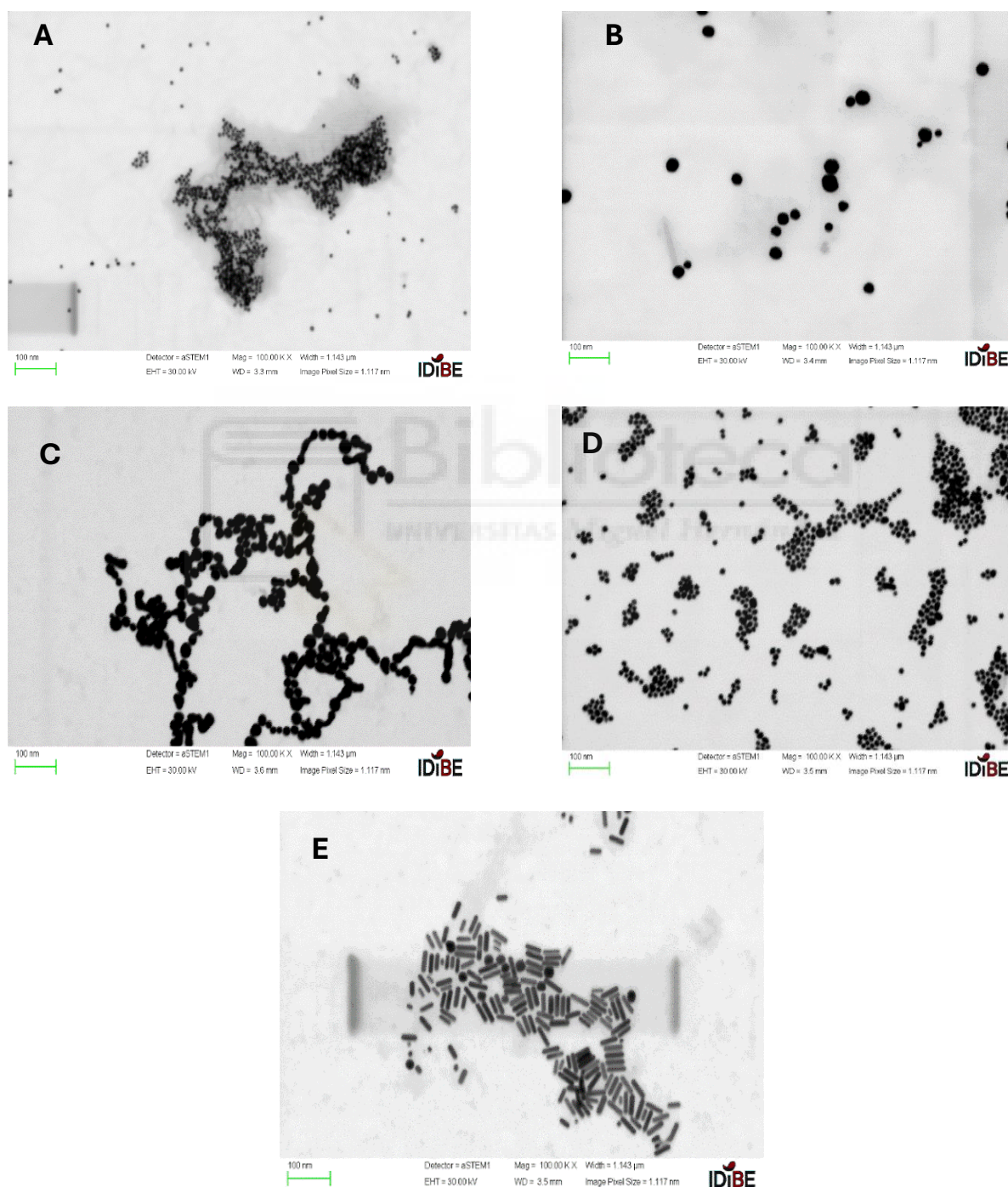
Precisamente, una de las características más importantes de las AuNPs son sus propiedades ópticas, que vienen determinadas entre otros factores por la  $\lambda_{\max}$  y su tamaño. Generalmente, las disoluciones de AuNPs suelen presentar un tono rojizo cuando estas son esféricas, como las primeras cuatro muestras de la *Figura 11*. Sin embargo, cuando se añade anisotropía a las nanopartículas, estas adquieren diferente relación de longitud y anchura, creando soluciones de diferente color como consecuencia de los cambios de su interacción con la luz, como es el caso de los nanorods donde predominaba, más bien, un tono marrón claro.



**Figura 11.** Disoluciones de las distintas AuNPs caracterizadas. De izquierda a derecha: AuNPs\_1 - AuNPs\_2 - AuNPs\_3 - AuNPs\_4 - AuNanoRods.

- **Caracterización de la morfología**

Finalmente, mediante el empleo del FESEM en modo STEM se obtuvieron imágenes de alta resolución de las AuNPs (*Figura 12*) que corroboraron los resultados de tamaño obtenidos por DLS y proporcionaron más información acerca de la morfología y de la heterogeneidad poblacional de las NPs. En este caso, es reseñable el hecho de que no fue necesaria la tinción de las muestras, ya que las AuNPs ejercieron la función de contraste de fase. Además, y para facilitar su comparación, todas las imágenes fueron tomadas con 100000 aumentos.



**Figura 12.** Imágenes obtenidas mediante FESEM en modo STEM de las distintas disoluciones de AuNPs: **A)** AuNPs\_1, **B)** AuNPs\_2, **C)** AuNPs\_3, **D)** AuNPs\_4 y **E)** AuNanoRods.

Gracias a los resultados que arrojó el FESEM en modo STEM, se pudo corroborar la agregación y/o precipitación de las AuNPs\_1 (*Figura 12 A*), tal y como sugerían los valores obtenidos previamente mediante DLS, es por ello por lo que se decidió descartar esta muestra de AuNPs en experimentos posteriores.

También fue destacable la presencia de NPs esféricas en la muestra de AuNanoRods (*Figura 12E*). Estos pueden llegar a formar estructuras esféricas espontáneamente, principalmente debido a la tendencia del sistema a minimizar la energía superficial total, lo que puede ser facilitado por la difusión atómica, la relajación de tensiones internas y las condiciones ambientales o químicas específicas de la muestra.

Gracias al FESEM también se corroboró que el resto de AuNPs del estudio presentaba una morfología esférica, tal y como parecían sugerir los espectros de absorción y el color de las disoluciones mencionados anteriormente.

Además, hemos de tener en cuenta que los valores de diámetro hidrodinámico proporcionados por la técnica de DLS suelen ser más elevados que los observados en el FESEM, debido a que la dispersión dinámica de la luz también tiene en cuenta otros factores (además del tamaño) como son el entorno de la NP, o la conductividad eléctrica del fluido que la contiene.

## 5.2 Caracterización de TSLs

### 5.2.1 TSLs de DPPC

La primera etapa de este estudio consistió en la selección del lípido más adecuado para utilizarlo como base en la fabricación de los híbridos multifuncionales. Uno de los requisitos que debía cumplir el lípido es que su  $T_c$  fuera ligeramente superior a la temperatura del organismo. Por ello, se escogió el DPPC, un lípido zwitteriónico, con  $T_c$  cercanas a los 41-42 °C.

La segunda etapa del estudio se basó en la caracterización del tamaño y la morfología de los LUVs sintetizados, además se determinó su estabilidad coloidal y, por último, se llevó a cabo un estudio de transición de fase de las vesículas lipídicas de DPPC.

#### - **Caracterización del tamaño**

Se prepararon LUVs de DPPC 1 mM mediante extrusión a presión a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras tal y como se ha descrito en el apartado 4.2. Señalar que el diámetro hidrodinámico ( $d$ ) de las vesículas lipídicas y su potencial Z (ZP) se determinó a través de medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) (*Tabla 3*).



**Tabla 3.** Diámetro hidrodinámico (*d*), potencial Z (ZP) y temperatura de transición de fase (*T<sub>c</sub>*) de la suspensión de LUVs (DPPC) 1 mM.

		d	ZP	T <sub>c</sub>
LUVs DPPC	PDI	Pico ± sd (nm)	Pico ± sd (mV)	T (°C)
LUVs DPPC 1 mM	0,071	122,2 ± 41,4	-12,2 ± 7,7	42,0

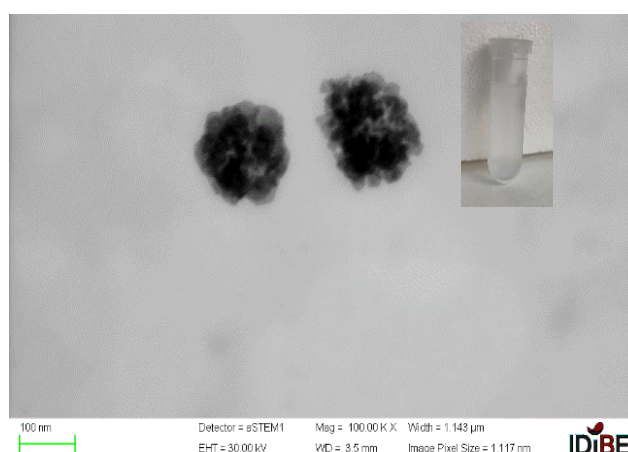
A la luz de los resultados obtenidos se concluyó que el tamaño medio de los liposomas de DPPC era de 122,2 nm. Además, la muestra en cuestión era monodispersa (*PDI* < 0,15), lo que sugiere que se sintetizaron LUVs de un único tamaño hidrodinámico.

#### - Determinación de la estabilidad coloidal

El valor del potencial Z obtenido y recogido en la *Tabla 3* (-12,2 ± 7,7 mV), indica que la suspensión de estas vesículas lipídicas no era coloidalmente estable. Esto es algo que cabría esperar, puesto que los lípidos de DPPC son zwitteriónicos y, por ende, no presentan carga neta, siendo propensos a fusionarse o agregar con el tiempo.

#### - Caracterización de la morfología

Dado que todos los experimentos realizados han sido estimaciones indirectas acerca de la formación de las vesículas liposomales, se procedió a captar imágenes haciendo uso nuevamente del FESEM a fin de verificar que realmente se están formando las vesículas lipídicas de DPPC, confirmar su tamaño y caracterizar su morfología. La imagen de la *Figura 13* corroboró el resultado de tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS. En ella también se observa que la suspensión era ligeramente turbia y no presentaba ninguna coloración.



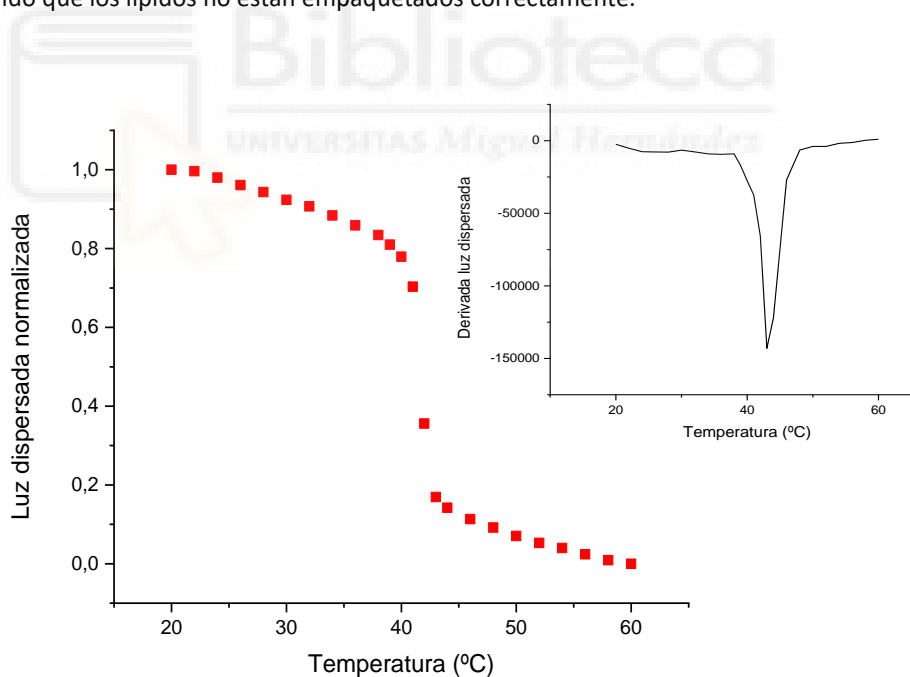
**Figura 13.** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC 1 mM previamente teñida con citrato de plomo. Insertada se muestra la imagen de la suspensión.

- **Estudio de la transición de fase**

Actualmente, existen diversas técnicas que permiten verificar la transición de fase de los lípidos y entre las cuales destacan la calorimetría diferencial de barrido, la anisotropía de fluorescencia o los barridos de luz dispersa. En este estudio se hizo uso de esta última técnica, en la que empleando un fluorímetro, se recogió la luz dispersada por los LUVs de DPPC a diferentes temperaturas (20-60°C) tras irradiarlos a una longitud de onda de 430 nm en la que no hay absorción de luz por parte de la muestra.

La bicapa lipídica en fase gel es mucho más compacta que en fase fluida, por lo que dispersa mucho más la luz. Este hecho es el responsable de que al cambiar de fase (como consecuencia de un aumento de temperatura) se observe una clara disminución de la luz dispersada, precisamente cuando el lípido se encuentra en fase fluida.

Podemos ver dicho experimento representado en la *Figura 14* en el cual también se representa la primera derivada de la curva obtenida. En ambas gráficas se observó claramente una bajada brusca de la luz dispersada en torno a 42°C, coincidiendo con la  $T_c$  esperada para el DPPC y sugiriendo que la transición de fase del liposoma había sido cooperativa. Dicha cooperatividad es un indicador del grado de empaquetamiento de los lípidos. Si la transición es cooperativa, la mayoría de los lípidos estarán empaquetados adecuadamente y sufrirán una transición de fase de manera simultánea. De lo contrario, la bajada de luz dispersa sería menos pronunciada, indicando que los lípidos no están empaquetados correctamente.



**Figura 14.** Luz dispersada normalizada de los LUVs de DPPC 1 mM en función de la temperatura. Inserto: primera derivada de la luz dispersada.



### 5.2.2 TSLs de DPPC y oleilamina

Al igual que en el anterior apartado, se prepararon LUVs de DPPC 1 mM mediante extrusión a presión a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras, la única diferencia es que el lípido se disolvió previamente en una disolución de oleilamina con cloroformo. La incorporación de oleilamina en la membrana lipídica de los TSLs de DPPC, tenía como objetivo dotar al liposoma de carga positiva debido a la presencia del grupo amino protonado ( $-NH_3^+$ ) de esta amina grasa insaturada, lo que debería mejorar la interacción de las vesículas lipídicas de DPPC con las AuNPs de carga negativa, tal y como se mencionó en el apartado 2.2.

Seguidamente se procedió a la caracterización del tamaño y la estabilidad coloidal, así como de la transición de fase, de las vesículas lipídicas de DPPC con diferentes cantidades de oleilamina.

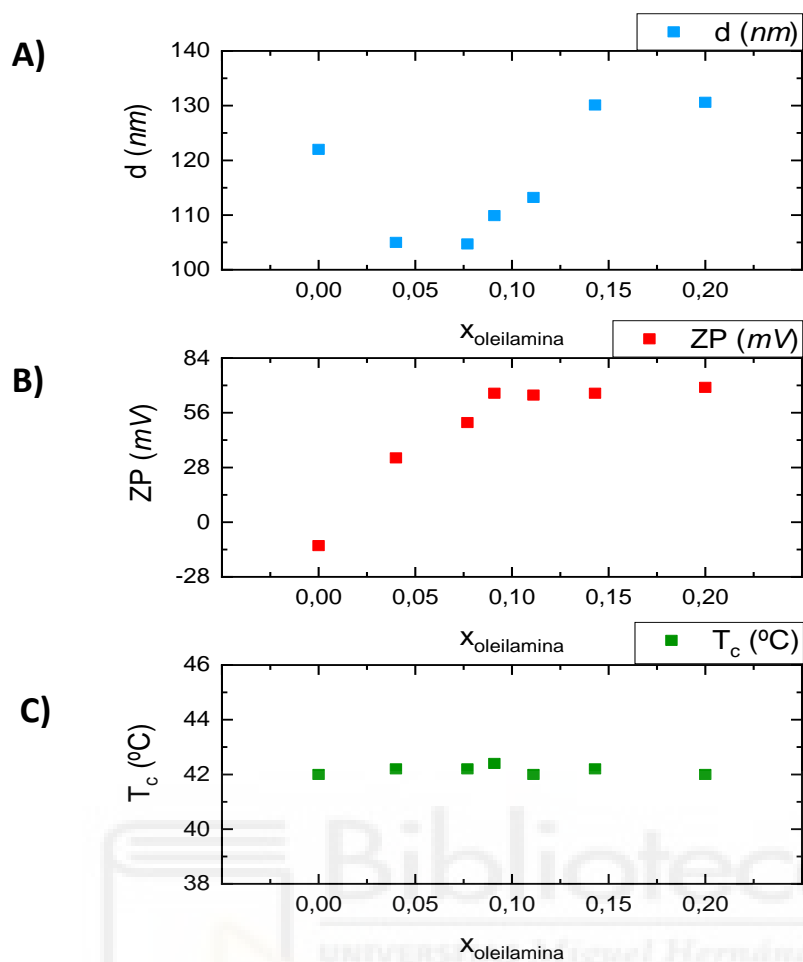
#### - Caracterización del tamaño

Para dilucidar el efecto de añadir diferentes porcentajes de oleilamina a la suspensión de LUVs, se eligieron seis concentraciones crecientes de esta amina grasa insaturada. Estas concentraciones se encuentran expresadas en forma de relación molar oleilamina/DPPC ( $X_{oleilamina}$ ) en la *Tabla 4* junto con el diámetro hidrodinámico (d), el potencial Z (ZP) y la temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) de los TSLs.

**Tabla 4.** Diámetro hidrodinámico (d), relación molar oleilamina/DPPC ( $X_{oleilamina}$ ), potencial Z (ZP) y temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) de las suspensiones de LUVs de DPPC con diferentes porcentajes de oleilamina.

LUVs DPPC	$X_{oleilamina}$	d	ZP	$T_c$
		Pico $\pm$ sd (nm)	Pico $\pm$ sd (mV)	T ( $^{\circ}$ C)
LUVs sin oleilamina	0	122,2 $\pm$ 41,4	-12,2 $\pm$ 7,7	42,0
LUVs + 42 $\mu$ M oleilamina	0,040	105,0 $\pm$ 44,2	32,1 $\pm$ 8,1	42,1
LUVs + 83,18 $\mu$ M oleilamina	0,077	104,9 $\pm$ 51,6	49,8 $\pm$ 9,2	42,1
LUVs + 100 $\mu$ M oleilamina	0,091	109,9 $\pm$ 72,9	66,2 $\pm$ 9,4	42,2
LUVs + 125 $\mu$ M oleilamina	0,111	113,2 $\pm$ 53,9	65,3 $\pm$ 8,8	42,0
LUVs + 166,67 $\mu$ M oleilamina	0,143	130,1 $\pm$ 68,2	65,5 $\pm$ 9,2	42,1
LUVs + 250 $\mu$ M oleilamina	0,200	130,6 $\pm$ 57,2	68,9 $\pm$ 7,6	42,0

Todos los datos de esta tabla se pueden visualizar e interpretar mejor a partir de la *Figura 15*, donde se encuentran representados el tamaño hidrodinámico, el potencial Z y la  $T_c$  frente a la relación molar oleilamina/DPPC ( $X_{oleilamina}$ ).



**Figura 15. A)** Tamaño ( $d$ ), **B)** potencial Z ( $ZP$ ) y **C)** temperatura de transición ( $T_c$ ) de los LUVs de DPPC frente a la relación molar oleilamina/DPPC.

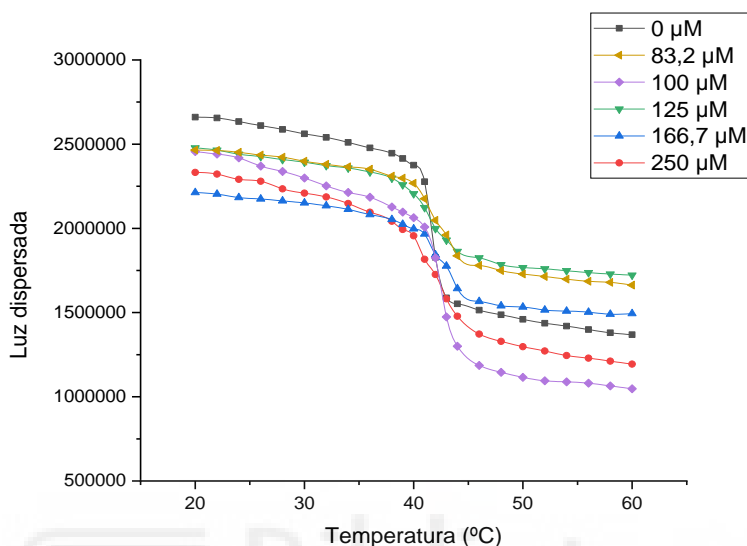
Tal y como se puede observar en la *Figura 15A*, cuanto mayor es la cantidad de oleilamina empleada en la formación de LUVs, mayor es el tamaño hidrodinámico de las vesículas. El único valor que parece alejarse de lo esperado es la muestra de LUVs sin oleilamina, este hecho puede explicarse debido a que la estabilidad coloidal de la muestra es baja, por eso los LUVs empiezan a fusionarse rápidamente, a pesar de haber sido extruidos por un filtro de 100 nm.

#### - Determinación de la estabilidad coloidal

Los valores de potencial Z obtenidos y recogidos en la *Tabla 4*, indican que todas las muestras presentaban una gran estabilidad coloidal a excepción de la muestra de LUVs sin oleilamina, ya que esta presentó un valor de potencial Z dentro del intervalo de inestabilidad previamente comentado. Por otro lado, y como sugiere la representación de la *Figura 15B*, cuanto mayor es la cantidad de oleilamina empleada en la formación de los LUVs, más positivo es el potencial Z de estos hasta un punto en el que por mucho que se aumente la cantidad de oleilamina, el potencial no varía. Es decir, a partir de  $X_{oleilamina}$  igual o mayor a 0,091 parece que el potencial Z de las vesículas lipídicas se vuelve más o menos constante.

## - Estudio de la transición de fase

Por último, para terminar de caracterizar los LUVs de DPPC con concentraciones crecientes de oleilamina, se recurrió nuevamente al estudio de la transición de fase mediante barridos de luz dispersa. En concreto, este experimento se encuentra recogido en la *Figura 16*, donde se representa la intensidad de luz dispersada en función de la temperatura para cada una de las muestras.



**Figura 16.** Luz dispersada normalizada de los LUVs de DPPC con concentraciones crecientes de oleilamina en función de la temperatura.

Los resultados obtenidos muestran una bajada brusca de la luz dispersada alrededor de 42°C en todos los casos estudiados, coincidiendo con la  $T_c$  esperada para el DPPC. Asimismo, se trata de bajadas más o menos pronunciadas de la luz dispersada, lo que parece indicar que la transición de fase continuó siendo cooperativa.

Los resultados de la  $T_c$  obtenida para cada una de las muestras se encuentran recogidos en la *Tabla 4* y en la *Figura 15C*. Como se puede apreciar, la  $T_c$  parece ser independiente de la concentración de oleilamina empleada en la formación de LUVs (al menos en ese rango).

## 5.3 Análisis de la interacción entre vesículas liposomales de DPPC y AuNPs

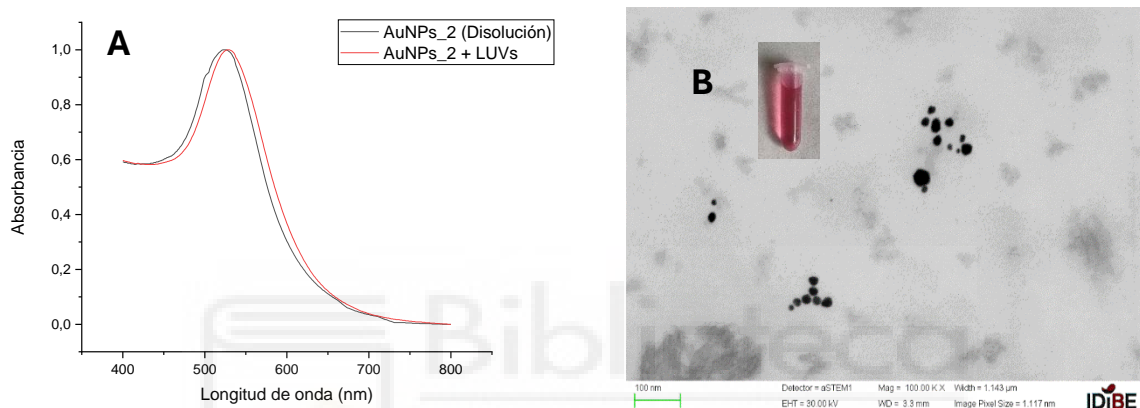
### 5.3.1 Análisis la interacción entre vesículas de DPPC y AuNPs “ex situ”

Una vez caracterizados los distintos componentes del nanohíbrido multifuncional por separado, se llevó a cabo el análisis de interacción entre los lípidos de DPPC y las AuNPs. En primer lugar, se exploró la posibilidad de que las AuNPs se unieran de manera espontánea a los liposomas. Esta estrategia, tal y como se explicó en apartado 4.2, se denominó “ex situ” ya que las AuNPs se preparan previamente, para después ser añadidas a la muestra de LUVs. Recordar que la muestra de AuNPs\_1 se descartó anteriormente debido a la agregación que presentaban dichas NPs.

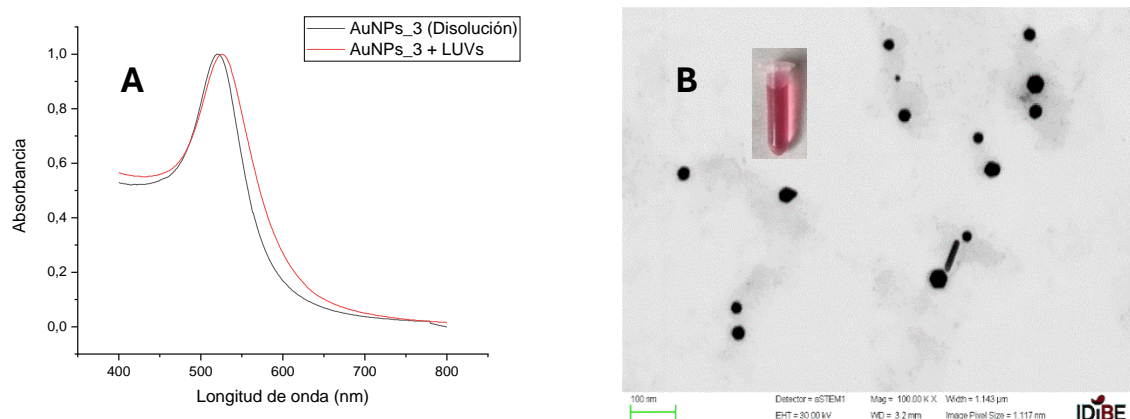
Una vez dicho esto, se procedió a caracterizar la morfología de estas NPs, además de determinar si la banda plasmónica de las AuNPs había sufrido alguna variación. Estos ensayos fueron necesarios para determinar si había existido algún tipo de interacción entre estas NPs.

- **Caracterización de la morfología y determinación de la banda plasmónica**

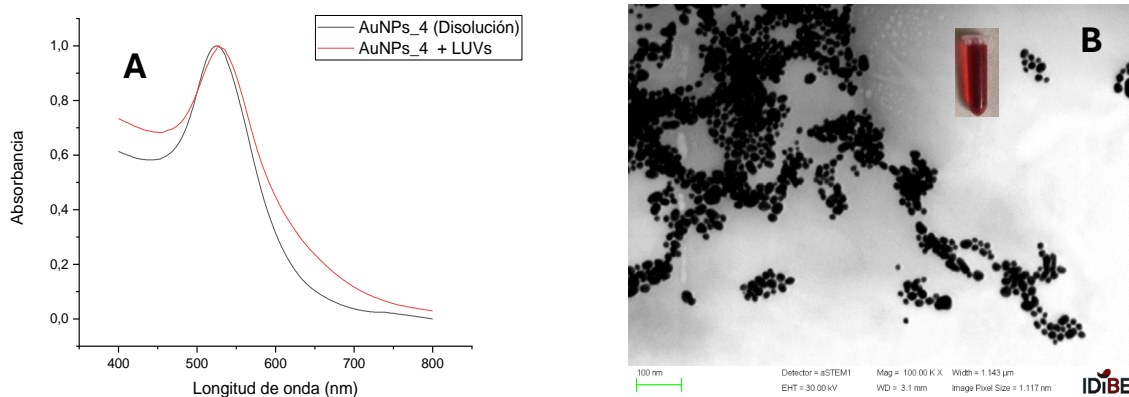
Los estudios de caracterización de la morfología y determinación de la banda plasmónica de las NPs se llevaron a cabo de forma simultánea (Figuras 17, 18, 19 y 20) para determinar con seguridad si existía algún tipo de interacción entre las AuNPs y los LUVs de DPPC.



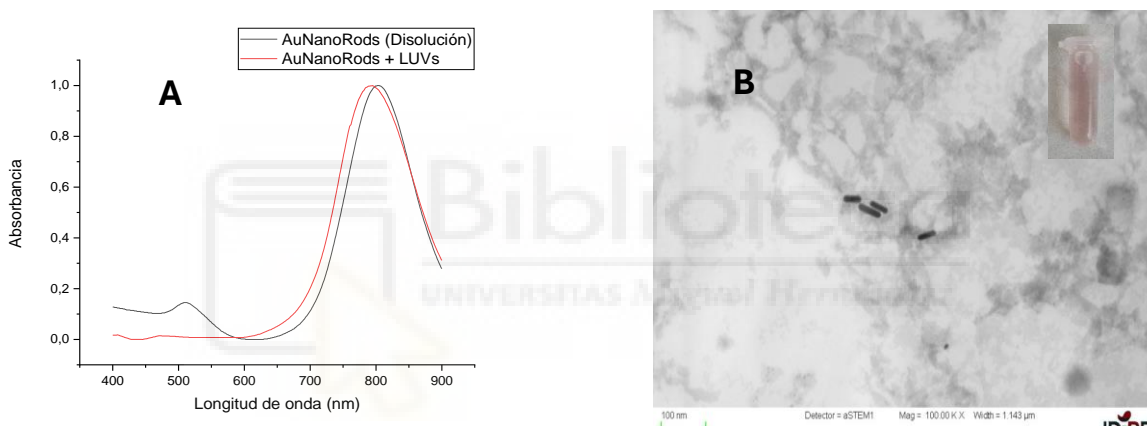
**Figura 17. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs<sub>2</sub> (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC + AuNPs<sub>2</sub> “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.



**Figura 18. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs<sub>3</sub> (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC + AuNPs<sub>3</sub> “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.



**Figura 19. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs<sub>4</sub> (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC + AuNPs<sub>4</sub> “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.



**Figura 20. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de AuNanoRods (negro) y de la suspensión de estas AuNPs con LUVs de DPPC “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC + AuNanoRods “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.

A la luz de los resultados obtenidos, se pudo concluir casi con total seguridad, que ninguna de las AuNPs parecía interactuar de forma directa con las vesículas lipídicas de DPPC, ya que la banda plasmónica propia de las AuNPs no se vio prácticamente modificada, ni en la posición ni en la forma, en ninguna de las muestras. Además, el color de las disoluciones tampoco mostró ninguna variación, como tampoco se vio ningún tipo de interacción entre ambas NPs en las imágenes del FESEM obtenidas.

Por otro lado, el hecho de que el pico de máxima absorción de las AuNPs en presencia de LUVs se ensanchase ligeramente respecto a las AuNPs en disolución, parece indicar que la suspensión presentaba un tamaño poblacional algo más heterogéneo.

En vista de los anteriores resultados y dado que ambas NPs parecen no unirse de forma espontánea, esta vez se analizó la posible interacción entre los LUVs de DPPC a los cuales se les había incorporado diferentes cantidades de oleilamina y las AuNPs “ex situ”. La adición de oleilamina, permitiría dotar a las vesículas lipídicas de carga positiva a fin de intentar mejorar y favorecer su interacción con las AuNPs cargadas negativamente mediante atracción electrostática. En este sentido, se descartaron los AuNanoRods en esta parte del estudio ya que, como se evidenció en el apartado 5.1, estos presentaban carga positiva lo que induciría la repulsión electrostática con los TSLs.

Gracias a los estudios previos presentados en el apartado 5.2.2, más concretamente en la *Figura 15B*, se escogió la relación molar oleilamina/DPPC ( $X_{\text{oleilamina}}$ ) de 0,091 para continuar con las siguientes partes del estudio, debido principalmente a que el potencial Z de las vesículas lipídicas alcanzó un plató a partir del cual la carga neta de la nanopartícula no aumentaba más.

Seguidamente se procedió a la caracterización del tamaño y la morfología de dichas NPs, además de estudiar si la banda plasmónica de las AuNPs presentaba alguna variación o se había desplazado.

#### - Caracterización del tamaño

El tamaño hidrodinámico (d) de la suspensión de LUVs con oleilamina y AuNPs se determinó mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS), las cuales se recogen en la *Tabla 5*.

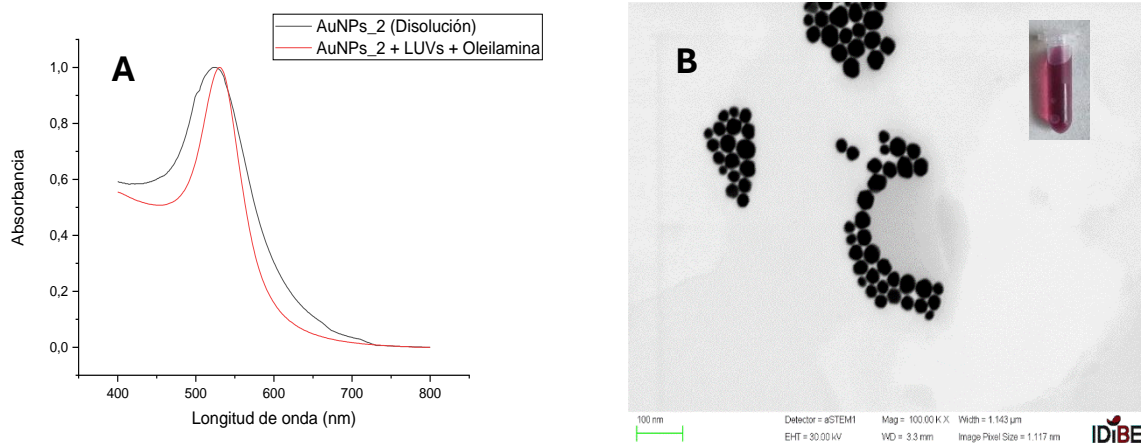
**Tabla 5.** Diámetro hidrodinámico (d) y pico de máx. absorción de las disoluciones de AuNPs y de las suspensiones de estas AuNPs con LUVs de DPPC y oleilamina “ex situ”.

AuNPs, LUVs y oleilamina	d		Pico máx.
	Pico 1 ± sd (nm)	%	λ (nm)
AuNPs_2 (Disolución)	42,6 ± 16,5	100	526
AuNPs_2 + LUVs + Oleilamina	137,1 ± 37,6	100	529
AuNPs_3 (Disolución)	52,8 ± 17,3	100	522
AuNPs_3 + LUVs + Oleilamina	159,4 ± 44,8	100	523
AuNPs_4 (Disolución)	56,4 ± 29,1	100	525
AuNPs_4 + LUVs + Oleilamina	162,1 ± 63,4	100	526

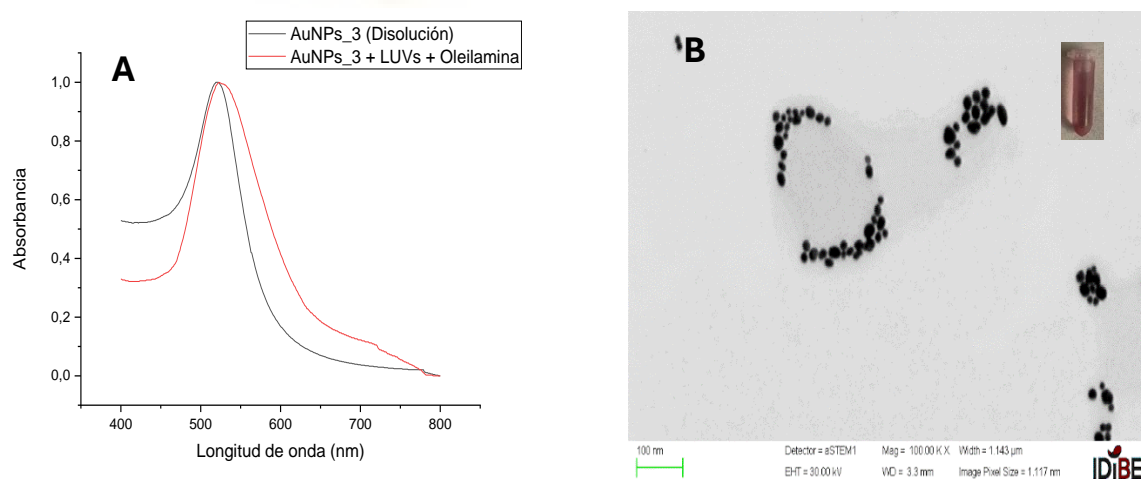
En este caso, se compararon dichos valores con los obtenidos para cada una de las AuNPs en disolución. Los resultados parecen indicar la síntesis de los LUVs de DPPC (d > 100 nm) y la presencia de solo un pico sugiere una posible interacción entre las AuNPs y los LUVs, ya que las mediciones apuntan a la existencia de una única población de NPs de tamaño similar y superior al de los LUVs por separado.

- **Caracterización de la morfología y determinación de la banda plasmónica**

Los estudios de caracterización de la morfología y determinación de la banda plasmónica de las NPs se realizaron de forma conjunta (Figuras 21, 22, 23) con el fin de determinar si existía algún tipo de interacción entre las AuNPs y los LUVs de DPPC con oleilamina.

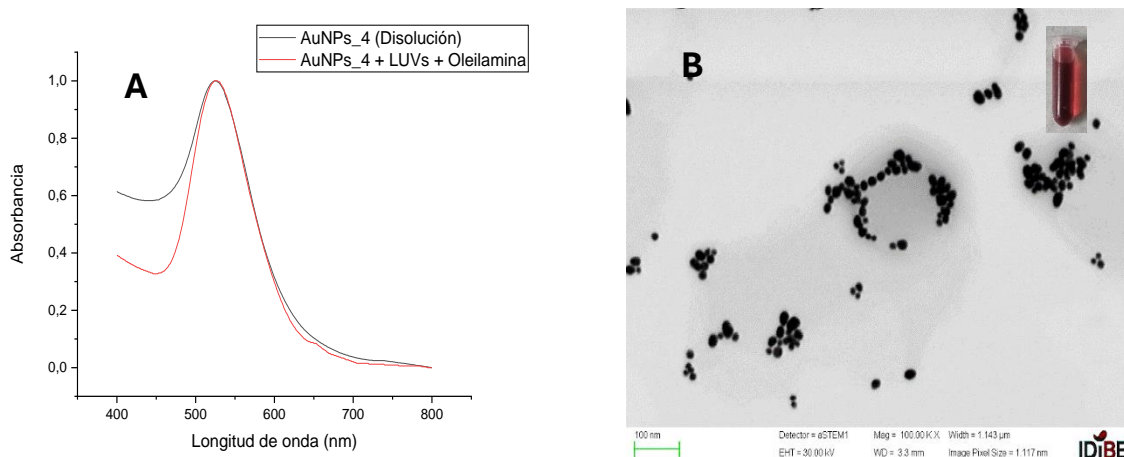


**Figura 21. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs<sub>2</sub> (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC y oleilamina “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC con oleilamina + AuNPs<sub>2</sub> “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.



**Figura 22. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs<sub>3</sub> (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC y oleilamina “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC con oleilamina + AuNPs<sub>3</sub> “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.





**Figura 23. A)** Espectros de absorción normalizados de la disolución de las AuNPs\_4 (negro) y de la suspensión de estas NPs con LUVs de DPPC y oleilamina “ex situ” (rojo). **B)** Imagen obtenida mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC con oleilamina + AuNPs\_4 “ex situ”. Insertada se muestra la coloración de la suspensión.

Finalmente, tras la valoración de los resultados obtenidos, se concluyó que todas las AuNPs sometidas a estudio parecían interactuar de forma directa con las vesículas lipídicas de DPPC con oleilamina. Las imágenes del FESEM en modo STEM mostraron como las AuNPs se disponían alrededor de los LUVs (con una localización próxima a la superficie de la bicapa) en todos los casos, confirmando así la formación de los nanohíbridos multifuncionales con potencial capacidad de ser termosensibles y fotosensibles. Además, el color de las disoluciones varió ligeramente.

Los espectros de absorción recogidos mostraron que la banda plasmónica de los nanohíbridos se mantiene en el rango visible, no desplazándose hacia el NIR, probablemente porque las AuNPs seguían manteniendo su morfología esférica tras unirse a los LUVs.

### 5.3.2 Análisis de la interacción entre vesículas de DPPC y AuNPs\_3 “in situ”

Una vez que los resultados de interacción “ex situ” de las AuNPs con los LUVs en presencia de oleilamina fueron positivos, se procedió a explorar una estrategia que permitiera desplazar la banda plasmónica de los nanohíbridos hacia el NIR para mejorar sus prestaciones. Como se indicó en la introducción de este trabajo, es recomendable que las AuNPs presenten la banda plasmónica en el NIR para que el nanohíbrido pueda utilizarse en aplicaciones biomédicas relacionadas con la terapia fototérmica y quimioterapia, ya que el uso de longitudes de onda cercanas al UV puede ser peligroso para los tejidos, en cambio, trabajando en longitudes de onda cercanas al infrarrojo, la absorción de los componentes biológicos es limitada y los tejidos sanos no se verían afectados (ver apartado 1.2.2). De esta forma e idealmente, se podría modificar la banda plasmónica del nanohíbrido en función de las necesidades del momento. Es por ello, por lo que se decidió probar a sintetizar



“in situ” las AuNPs<sub>3</sub> (producidas mediante métodos verdes) para evitar así cualquier daño que se pudiera producir en los liposomas. La síntesis se hizo sobre LUVs, tanto en ausencia como en presencia de oleilamina.

Tras la formación de estos nanohíbridos multifuncionales se caracterizó su tamaño hidrodinámico, su morfología, su estabilidad coloidal y, por último, se llevó a cabo un estudio de transición de fase de las vesículas lipídicas con el propósito de determinar si esta había sido afectada por la presencia de las AuNPs generadas in situ.

- **Caracterización del tamaño y determinación de la estabilidad**

El tamaño hidrodinámico (d) y el potencial Z (ZP) de los nanohíbridos fue determinado mediante DLS, los datos resultantes se encuentran recogidos en la *Tabla 6*.

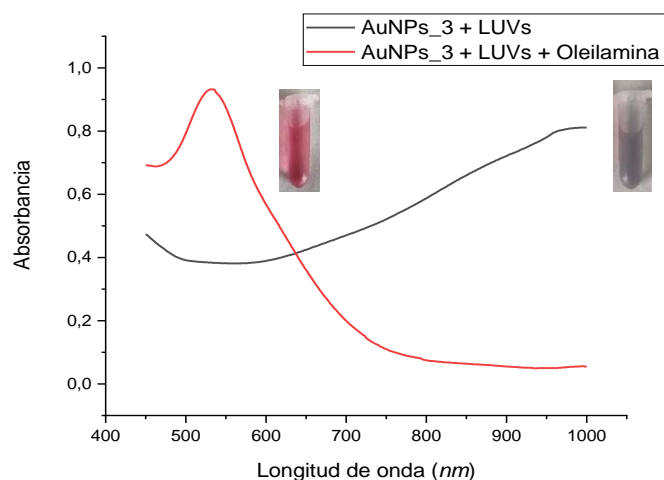
**Tabla 6.** *Diámetro hidrodinámico (d), potencial Z (ZP) y pico de máx. absorción de las suspensiones de LUVs DPPC con y sin oleilamina sobre los cuales se sintetizaron AuNPs “in situ”.*

	d		ZP	Pico máx.
	Pico 1 ± sd (nm)	%	Pico ± sd (mV)	λ (nm)
AuNPs <sub>3</sub> + LUVs	159,6 ± 30,7	100	29,1 ± 4,8	529
AuNPs <sub>3</sub> + LUVs + Oleilamina	147,5 ± 47,2	100	52,9 ± 8,9	1000

Comparando este resultado con los obtenidos para los mismos liposomas en ausencia de AuNPs, se observa que el diámetro aumenta, de 122 nm a ~160 nm en ausencia de oleilamina y de 110 nm a ~148 nm, en presencia de oleilamina, lo que sugiere que efectivamente se han conseguido sintetizar AuNPs sobre su superficie. Por otro lado, los valores de potencial Z mostraron que, en ambos casos, las nanoestructuras formadas eran bastante estables, siendo el ZP de los nanohíbridos con oleilamina significativamente más positivo y estable (52,9 mV) que la muestra control (29,1 mV).

- **Determinación de la banda plasmónica**

Inicialmente, se exploró si la banda plasmónica de los nanohíbridos había sufrido algún cambio o desplazamiento. Para ello, se recogieron los espectros de absorción de ambas muestras desde los 450 hasta los 1000 nm, ambos se encuentran representados en la *Figura 24*.

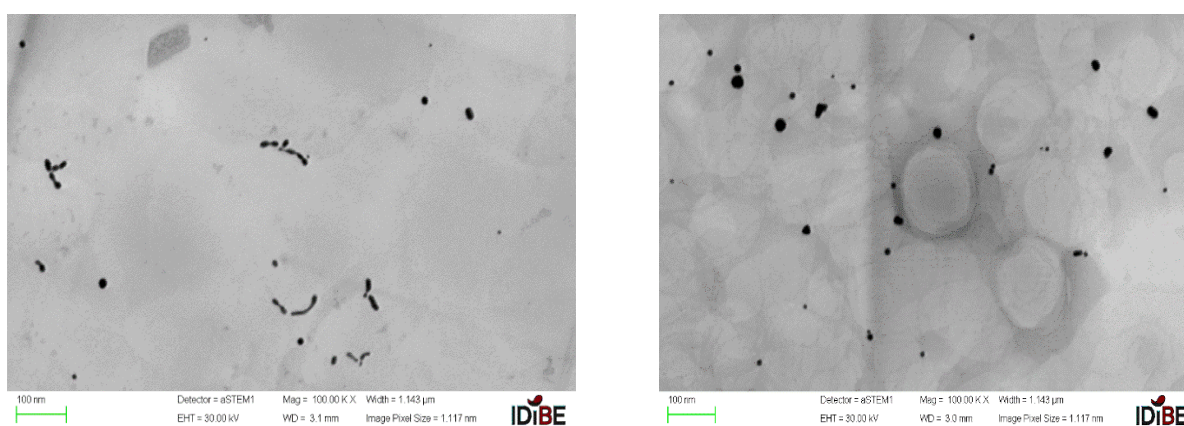


**Figura 24.** Espectros de absorción de LUVs de DPPC sin y con oleilamina sobre los cuales se han sintetizado AuNPs “in situ”. Insertos: Imagen mostrando la coloración de ambas suspensiones: sin oleilamina (izquierda) y con oleilamina (derecha).

Los resultados obtenidos parecen indicar que la formación de nanohíbridos sintetizando las AuNPs\_3 “in situ” sobre LUVs de DPPC con oleilamina consigue desplazar la banda plasmónica desde los 525 nm hasta los 1000 nm, logrando así uno de los objetivos perseguidos en este estudio. El cambio de color que se ve en los insertos de la *Figura 24*, donde la disolución pasó de tener un tono rojizo a un color más bien grisáceo, también apoyó esta teoría.

#### - Caracterización de la morfología

Aunque los resultados anteriores sugieren la interacción de las AuNPs con los LUVs de DPPC y, por ende, la formación de NPs fotosensibles y fototérmicas, son los experimentos del FESEM (recogidos en la *Figura 25*) los que confirmaron esta hipótesis.



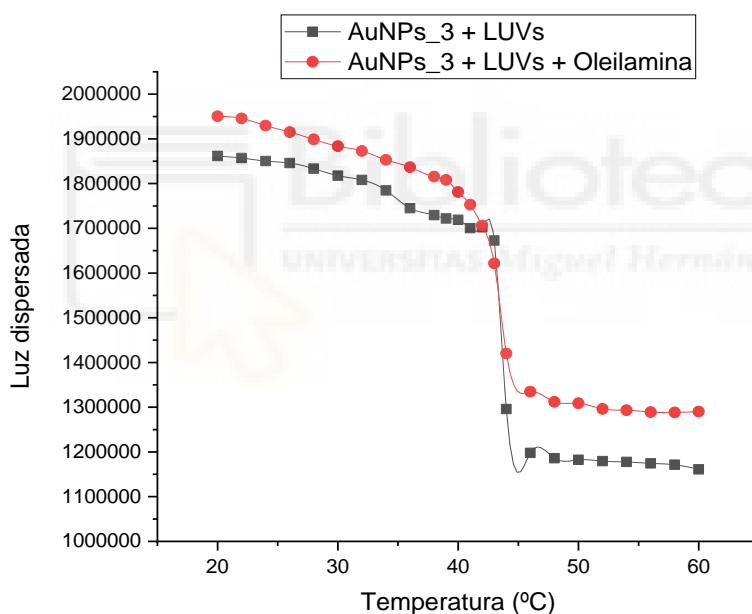
**Figura 25.** Imágenes obtenidas mediante FESEM en modo STEM de la suspensión de LUVs de DPPC con oleilamina (izquierda) y sin oleilamina (derecha) sobre los cuales se han sintetizado las AuNPs\_3 “in situ”.

Las imágenes del FESEM mostradas en la *Figura 25* permitieron visualizar la interacción de las AuNPs sintetizadas “in situ” con los LUVs de DPPC con y sin oleilamina, confirmando la formación de nanopartículas híbridas en ambos casos.

La diferencia radica en el cambio de morfología de las AuNPs. Cuando los nanohíbridos son sintetizados en presencia de oleilamina, las AuNPs<sub>3</sub> parecen perder su naturaleza esférica y se disponen formando una “cinta” alrededor de la superficie del liposoma. Este hecho sería el principal responsable del desplazamiento de la banda plasmónica hacia longitudes de onda en el NIR.

#### - Estudio de la transición de fase

Finalmente, y con el objetivo de discernir si la transición de fase del lípido se había visto afectada tras la formación de estos nanohíbridos, se recurrió a los barridos de luz dispersa. Los datos obtenidos de este experimento se encuentran plasmados en la *Figura 26*.



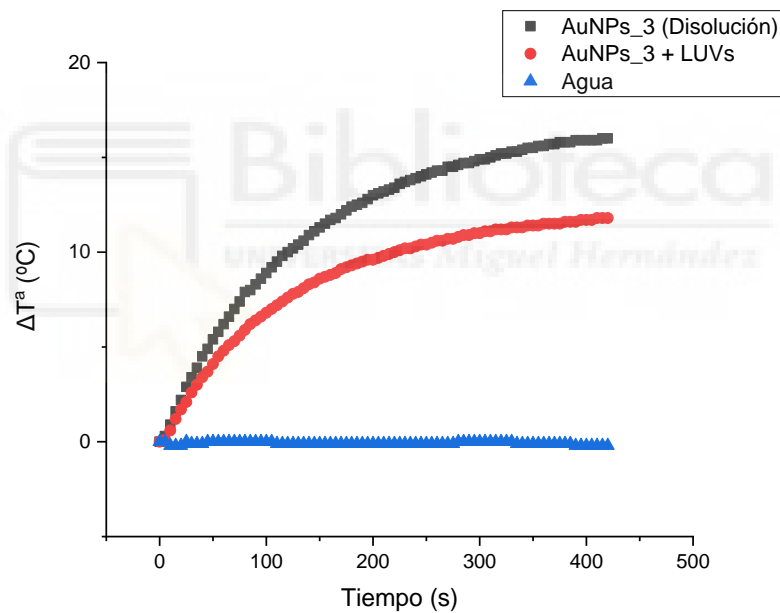
**Figura 26.** Luz dispersada de los LUVs de DPPC (sin y con oleilamina) sobre los cuales se sintetizaron las AuNPs<sub>3</sub> “in situ” en función de la temperatura.

Tras revisar los resultados, se pudo determinar que la transición de fase de las vesículas lipídicas de DPPC no se vio afectada por la presencia de AuNPs sintetizadas “in situ” sobre estas. Todo parecía indicar que la  $T_c$  (en torno a 42°C) no sufrió ninguna variación, además la caída brusca de la luz dispersada alrededor de la  $T_c$  sugirió que la transición de fase del lípido seguía siendo cooperativa y que, por tanto, la integridad y las propiedades termosensible del liposoma se mantenían.

## 5.4 Conversión fototérmica

La conversión fototérmica es un proceso eficiente donde las AuNPs convierten la energía de la luz en calor. Este fenómeno se basa en la interacción entre la luz y los electrones de la superficie de las AuNPs, también conocido como SPR (ver apartado 1.2.1).

En las últimas semanas de estancia en el laboratorio se adquirió un diodo láser con emisión a 520 nm, que podría utilizarse para confirmar las propiedades fototérmicas de los nanohíbridos desarrollados. Para ello se montó un dispositivo que permitió recoger los cambios de temperatura inducidos en una muestra al ser irradiada con el láser. Se seleccionó para ello una muestra de AuNPs\_3 y una segunda muestra en donde las AuNPs se sintetizaron “in situ” sobre LUVs de DPPC (en ausencia de oleilamina para no desplazar el plasmón al NIR). Las suspensiones de aproximadamente 1 mL de volumen se introdujeron en una cubeta que tenía un termopar adherido a una de sus caras. Las muestras se irradiaron durante 7 minutos con una potencia de 1,2 W y se representó en una gráfica el incremento de temperatura frente al tiempo de irradiación (*Figura 27*).



**Figura 27.** Incremento de temperatura de las disoluciones frente al tiempo de irradiación.

Como se puede observar, en ambas muestras se incrementó en más de 10  $^{\circ}\text{C}$  la temperatura, siendo mayor el cambio en ausencia de lípidos, posiblemente porque los LUVs son capaces de dispersar parte de la luz incidente del láser, reduciendo ligeramente la eficiencia de la conversión fototérmica de las AuNPs.

El hecho de que el control (muestra con únicamente agua) no incrementara la temperatura confirmó la validez de los experimentos.

Los resultados muestran, por tanto, como es posible utilizar AuNPs para transformar la energía de la luz del láser en calor y como los nanohíbridos fabricados en este trabajo mantienen esa propiedad.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de una nueva nanoestructura híbrida multifuncional, en la cual se integran las funciones de transporte de fármacos, liberación controlada, terapia fototérmica y bioimagen, utilizando lípidos de DPPC, AuNPs y oleilamina.

En primer lugar, se caracterizaron todas las AuNPs sometidas a este estudio, permitiendo descartar aquellas que presentan agregados o no son coloidalmente estables.

El hecho de emplear un lípido zwitteriónico (sin carga neta) como el DPPC en este estudio, ha permitido trabajar con liposomas cuya  $T_c$  es ligeramente superior a la temperatura del organismo (aprox. 42°C), permitiendo su aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos. Aunque los resultados sugieren que la suspensión de LUVs preparados únicamente con DPPC no es estable coloidalmente.

Se ha puesto a punto la metodología para la obtención de nanopartículas híbridas mediante la interacción de AuNPs con vesículas lipídicas que presentan diferentes porcentajes de oleilamina. Esto ha permitido concluir que cuanto mayor es la cantidad de oleilamina empleada en la formación de LUVs, mayor es el tamaño hidrodinámico de las vesículas lipídicas, estabilizándose hacia 130 nm. De igual manera, el potencial Z aumenta cuanto mayor es la cantidad de oleilamina añadida, hasta una  $X_{oleilamina}$  de 0,091 donde su valor parece alcanzar un plató. Además, independientemente de la concentración de oleilamina empleada, todos los LUVs del estudio muestran una temperatura de transición de fase gel a fase fluida de 42°C siendo en todos los casos cooperativa.

Ninguna de las AuNPs parece interaccionar “ex situ” de forma directa con las vesículas lipídicas de DPPC (sin oleilamina). Por el contrario, el mismo estudio “ex situ” con adición de oleilamina sugiere que sí que existe la interacción entre ambos componentes, probablemente electrostática, obteniéndose nanohíbridos con banda plasmónica en el visible (hacia 525 nm) debido a que las AuNPs siguen manteniendo su morfología esférica.

El análisis de interacción entre el DPPC y las AuNPs de ácido ascórbico “in situ” muestra la interacción entre las AuNPs y la superficie de la bicapa lipídica. Cuando la muestra contiene oleilamina se produce un cambio en la morfología de las AuNPs con el consiguiente desplazamiento de la banda plasmónica hacia el NIR. Como resultado se obtiene un nanohíbrido plasmónico multifuncional.

A partir de los experimentos preliminares de fotoconversión es posible concluir que tanto las AuNPs como los nanohíbridos son capaces de incrementar la temperatura de la disolución más de 12 grados en pocos minutos utilizando potencias de láser próximas a 1,2 W, demostrando su capacidad para ser aplicados en terapias fototérmicas.

A la luz de estos hechos, queda patente la síntesis de una nueva estructura nanométrica multifuncional que permite aunar las excelentes características de transporte y liberación de fármacos de los liposomas, con las propiedades fototérmicas y de imagen de las AuNPs, permitiendo integrar la quimioterapia, la terapia fototérmica plasmónica y la detección en una sola nanoestructura.

Los próximos objetivos irán dirigidos a optimizar estos nanohíbridos y encapsular en ellos fármacos cuya liberación pueda desencadenarse de forma controlada mediante la irradiación láser, modulando la potencia y el tiempo de irradiación.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Dykman L. A., Khlebtsov N. G. (2011) *Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects*. Acta Naturae, 34-55.
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M., & Higgitt, C. (2007). *The Lycurgus cup—a roman nanotechnology*. Gold bulletin, 40(4), 270-277.
- Chávez-Sandoval, B. E., Flores-Mendoza, N., Chávez-Recio, A., Balderas-López, J. A., & García-Franco, F. (2021). *Biosynthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and the reducing agents in the process*. Mundo Nano, 14(27).
- Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J., & Mousa, S. A. (2008). *Emerging nanopharmaceuticals*. Nanomedicine, 4(4), 273-282.
- Moddarese M., Brown M.B., Zhao Y., Tamburic S., Jones SA. (2010) *The role of vehicle-nanoparticle interactions in topical drug delivery*. Int J Pharm. Nov 15;400(1-2):176-82.
- I-Qadi S., Remuñán-López C. (2009) *Nanopartículas metálicas: oro*. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Nanotecnología farmacéutica. Madrid; pp. 223-248.
- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., & Maqbool, M. (2022). *Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review*. Advances In Colloid And Interface Science, 300, 102597.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). *Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited*. The Journal Of Physical Chemistry. B, 110(32), 15700-15707.
- Bohren, C. F., & Huffman, D. R. (1998). *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*.
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). *Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda*. Avances en Ciencias e Ingeniería, 3(2), 67-78.
- Anaya, A. M. O., Fajardo, J. J. M., & Sánchez, Ó. C. (2019) *Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro*. Revista de la Sociedad Química del Perú/Revista de la Sociedad Química del Perú, 85(4), 432-439.
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). *Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles*. The Journal Of Physical Chemistry. B, 103(21), 4212-4217.
- Gutiérrez-Cruz, F. V., Ancira-Cortez, A., Camacho-López, M. Á., Isaac-Olivé, K., & Jiménez-Mancilla, N. (2022). *Calentamiento de nanopartículas de oro inducido por excitación fotónica y multifotónica*. Ciencia Ergo-sum/Ciencia Ergo Sum, 30(2).
- Khan F. A., Albalawi R., Pottoo F.H. (2022) *Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment*. Med Res Rev. 42(1), 227–258.
- Amini, S. M. (2019). *Gold nanostructures absorption capacities of various energy forms for thermal therapy applications*. Journal Of Thermal Biology, 79, 81-84.
- Rengan, A. K., Bukhari, A. B., Pradhan, A., Malhotra, R., Banerjee, R., Srivastava, R., & De, A. (2015). *In Vivo Analysis of Biodegradable Liposome Gold Nanoparticles as Efficient Agents for Photothermal Therapy of Cancer*. Nano Letters, 15(2), 842-848.
- Rastinehad A. R., Anastos H., Wajswol E., y col. (2019) *Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study*. Proc Natl Acad Sci USA. ;116(37):18590–18596.

- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). *Liposomes as nanomedical devices. International Journal Of Nanomedicine.*
- Villanueva, Martín E. "Interacción de nanopartículas con sistemas organizados que revisten interés en nanobiociencias" Tesis doctoral 2020, Universidad Nacional de Córdoba.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., y col. (2013) *Liposoma: clasificación, preparación y aplicaciones.* 8, 102-108.
- Sabín Fernández, Juan D. *Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas.* Tesis doctoral 2007, Universidad de Santiago de Compostela.
- Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H., & Blumenthal, R. (1978). *Design of Liposomes for Enhanced Local Release of Drugs by Hyperthermia.* Science, 202(4374), 1290-1293.
- Riske, K. A., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B., & Lamy, M. T. (2009). *Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process.* Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes, 1788(5), 954-963.
- Pippa, N., Meristoudi, A., Pispas, S., & Demetzos, C. (2015). *Temperature-dependent drug release from DPPC:C12H25-PNIPAM-COOH liposomes: Control of the drug loading/release by modulation of the nanocarriers' components.* International Journal Of Pharmaceutics, 485(1-2), 374-382.
- Pentak, D. (2014). *Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC.* Thermochemica Acta, 584, 36-44.
- Ta, T., & Porter, T. M. (2013). *Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy.* Journal Of Controlled Release, 169(1-2), 112-125.
- Meins, J. L., Schatz, C., Lecommandoux, S., & Sandre, O. (2013). *Hybrid polymer/lipid vesicles: state of the art and future perspectives.* Materials Today, 16(10), 397-402.
- García, M. C., Montañó, J. M. C., Rueda, M. R., Longhi, M., Álvarez, A. M. R., Lázaro, M. L., Dapena, F. P., & Rodríguez, M. L. G. (2021). *Nucleolípido incorporado en liposomas funcionalizados con nanopartículas de oro y sensibles a estímulos de pH y temperatura para liberación controlada de doxorubicina.*
- Simón, M., Jørgensen, J. T., Norregaard, K., Henriksen, J. R., Clergeaud, G., Andresen, T. L., Hansen, A. E., & Kjaer, A. (2023). *Neoadjuvant Gold Nanoshell-Based Photothermal Therapy Combined with Liposomal Doxorubicin in a Mouse Model of Colorectal Cancer.* International Journal Of Nanomedicine, Volume 18, 829-841.
- Mhanna, K., Qian, W., Zhong, Z., Brooks, A. F., Ouchi, E., Stauff, J., Arteaga, J., Papachristou, M., Datseris, I. E., Liu, B., Shao, X., & Scott, P. J. H. (2023). *Preparation and Evaluation of <sup>64</sup>Cu-Radiolabeled Dual-Ligand Multifunctional Gold Nanoparticles for Tumor Theragnosis.* Pharmaceuticals, 16(1), 71.
- Rubio-Camacho, M., Alacid, Y., Mallavia, R., Martínez-Tomé, M. J., & Mateo, C. R. (2019). *Polyfluorene-Based Multicolor Fluorescent Nanoparticles Activated by Temperature for Bioimaging and Drug Delivery.* Nanomaterials, 9(10), 1485.
- Rubio-Camacho, M., Martínez-Tomé, M. J., Cuestas-Ayllón, C., De la Fuente, J. M., Esquembre, R., & Mateo, C. R. (2023). *Tailoring the plasmonic properties of gold-liposome nanohybrids as a potential powerful tool for light-mediated therapies.* Colloids And Interface Science Communications 100690, 52