

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



TRABAJO BIBLIOGRÁFICO DE FIN DE GRADO

**SISTEMAS NANO-DISPERSOS
PARA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE
MEDICAMENTOS**

MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE GRADO EN
FARMACIA

PRESENTADO POR LUCÍA IGUÑA LÓPEZ

TUTORES:
DOMINGO GONZÁLEZ ARJONA
GERMÁN LÓPEZ PEREZ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

Sevilla, 5 de Julio de 2016. (Aula 0.4.)

Agradecimientos:

A mi familia y a mi novio, por el apoyo constante y las palabras de ánimo cuando más lo he necesitado.

Y a mis tutores, por la paciencia, las horas de laboratorio comprobando espectros de absorción y por enseñarme el mundo que encierra la nanotecnología.

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción	3
3. Objetivos	5
4. Metodología	5
5. Discusión	5
5.1. Propiedades de las nanopartículas	5
5.2. Estabilidad de nanopartículas metálicas	9
5.3. Parte experimental.....	10
5.3.1. Síntesis de nanopartículas de oro	10
5.3.2. Resultados: caracterización.....	12
5.3.3. Estabilidad de las nanopartículas en presencia de electrolitos.....	14
5.4. Funcionalización de nanopartículas	14
5.5. Farmacocinética y biodistribución.....	17
5.5.1. Entrada al organismo.....	17
5.5.2. Problemas de toxicidad	19
5.5.3. Impacto del tamaño de partícula	19
5.5.4. Impacto de la carga superficial.....	20
5.5.5. Impacto de la forma	21
5.5.6. Sistema inmunitario	21
5.5.7. Minimización del secuestro inmunitario de las nanopartículas.....	22
5.6. Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas	24
5.6.1. Nanopartículas y fármacos.....	24
5.6.2. Ablación térmica.....	27
5.7. Empleo de nanopartículas en técnicas de diagnóstico	29
5.7.1. Diagnóstico mediante bioimagen.....	29
5.7.2. Fluorescencia.....	30
5.7.3. Técnica fotoacústica	31
6. Conclusiones.....	32
7. Bibliografía.....	33

1. Resumen

La fabricación de una nanopartícula terapéutica implica diseñar un nanomaterial que sea biocompatible, seguro, capaz de llegar intacto a su destino y que, una vez ejercido su objetivo, pueda eliminarse fácilmente.

Es por ello que las nanopartículas (NPs) metálicas se consideran excelentes candidatos, destacando las de oro por su estabilidad e inocuidad. Su síntesis, realizada experimentalmente y recogida en esta memoria, puede llevarse a cabo fácilmente mediante agentes reductores como el citrato sódico, que además actúa como estabilizante evitando la precipitación de las nanopartículas. Debido a su pequeño tamaño (de 1 a 100 nm) poseen una propiedad óptica característica: el fenómeno de plasmón superficial que se origina al incidir sobre ellas un haz de luz. Son capaces de absorber radiación de longitudes de onda del rango visible del espectro y a simple vista el color de ellas varía según el tamaño y la forma de partícula, lo que permite su caracterización mediante técnicas de espectroscopía de absorción. Gracias a éste hecho resulta interesante su aplicación en técnicas de diagnóstico o incluso sensores bioquímicos.

Además, las nanopartículas poseen una gran relación superficie/volumen, por lo que es posible funcionalizarlas y crear un complejo fármaco-nanopartícula que posibilite el diseño de estrategias que den solución a problemas a los que se enfrentan en la actualidad áreas como la farmacología, el diagnóstico clínico o la tecnología farmacéutica.

A pesar de que el desarrollo de un fármaco conlleva muchos años de investigación, se han obtenido resultados favorables en ensayos clínicos con nanopartículas llevados a cabo en animales. Se han desarrollado fármacos quimioterápicos vectorizados por nanopartículas de oro, incluso técnicas terapéuticas como la fototérmica, basadas en la administración de nanopartículas funcionalizadas que logran alcanzar los tejidos tumorales y, una vez localizadas en ellos, son irradiadas de forma externa con láser. Como consecuencia, las nanopartículas emiten calor y provocan la destrucción de células tumorales.

La nanotecnología constituye, por tanto, una ventana hacia el desarrollo de nuevas terapias para la prevención y tratamiento de enfermedades, con el fin principal de mejorar la calidad de vida del paciente.

Palabras clave: nanopartícula, vectorización, funcionalización, fármaco, fototermia.

2. Introducción

El prefijo *nano-* proviene del griego *nanos*, que significa “pequeño, minúsculo”, y de acuerdo con la definición del *National Nanotechnology Initiative* las nanopartículas (NPs) son estructuras creadas artificialmente, agregados aislados de átomos, con un tamaño de entre 1 y 100-200 nm. Tal y como se puede observar en la figura 1, dentro de la escala nanométrica se diferencian dos términos: “nanoclusters”, estructuras de entre 1 y 2 nm, y “nanocristales”, con tamaños superiores a los 2 nm (Wilczewska y cols., 2012).

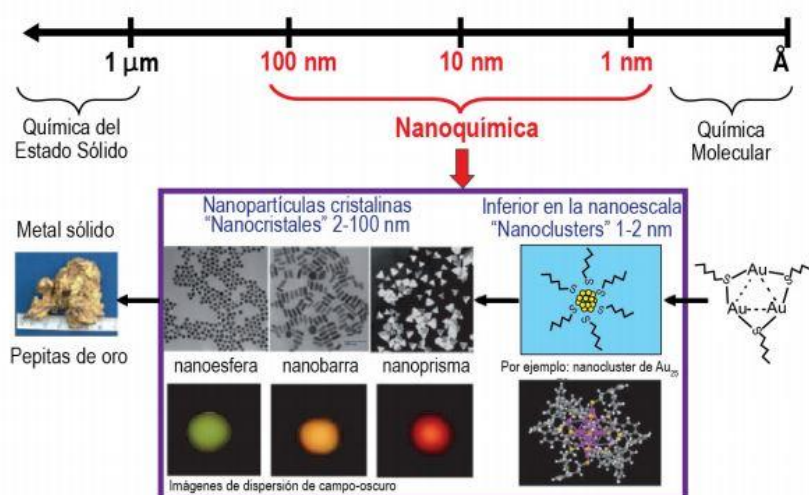


Figura 1. Escala nanométrica donde se aprecian diferentes tamaños y formas de las nanopartículas (Wilczewska y cols., 2012).

Una forma habitual de encontrarlas es en forma de coloides, dispersas en un disolvente adecuado. Se denominan hidrofílicas cuando se solubilizan en agua, hidrofóbicas cuando se trata de un disolvente orgánico o anfílicas cuando las partículas se solubilizan en ambos tipos de disolución (Friederisci, 2013).

El uso de compuestos metálicos a esta escala se encuentra en auge actualmente, pero no se trata de un descubrimiento moderno. Ya en la antigüedad existieron civilizaciones que, de forma casual, fabricaron piezas decorativas con materiales que contenían nanopartículas, como cristales rojos teñidos pertenecientes a la Edad de Bronce (1200 - 1000 a.C.) que fueron descubiertos en Rovigo (Italia) y cuyo color se debía a las nanopartículas de cobalto que componían los cristales (Sciau, 2012). También se hallaron nanopartículas de cobalto en esmaltes pertenecientes a civilizaciones celtas (400 a 100 a.C.), y esta costumbre de colorear el cristal se extendió hasta el período romano. En la antigua Roma destaca la copa de Licurgo, mostrada en la figura 2, que se encuentra actualmente en el Museo Británico de Londres. Tras analizar mediante microscopía electrónica se comprobó que en la matriz de vidrio existía una

pequeña cantidad de nanopartículas de oro y plata. Es por este motivo que el color cambia de verde a rojo oscuro cuando la fuente de luz se sitúa en su interior (Oliva, 2013).



Figura 2. Copa de Licurgo. Obsérvese el cambio de color rojo que toma la copa cuando la luz atraviesa el cristal (<http://tecnologianano.com>).

Durante la Edad Media el oro tuvo gran repercusión al emplearse para el tratamiento de dolencias como problemas venéreos, disentería y diagnóstico de sífilis. Este hecho está bien detallado en el que se considera el primer libro que habla acerca del oro coloidal, publicado por el filósofo y médico Francisci Antonii en 1618 (Antonii, 1618). Además, también llegó a tener un uso adicional con fines cosméticos (Fuentes, 2014).

En 1857, Michael Faraday mostró especial interés en el color rojo del oro coloidal, realizando investigaciones sobre la interacción de la luz con partículas metálicas. Preparó disoluciones como la de tetracloroaurato sódico (NaAuCl_4) con agentes reductores y observó en la disolución, de color amarillo, que el oro iba reduciéndose a partículas muy finas no visibles a la vez que la solución iba adoptando un color rojo oscuro. Casi 100 años más tarde, Turkevich y cols. (Turkevich y cols., 1951), revelaron a través de investigaciones con el microscopio electrónico que los coloides que llegó a preparar Faraday originaban partículas de oro de un tamaño entre 2 y 6 nm, y eran tan estables que una de ellas se mantuvo en estado coloidal hasta la Segunda Guerra Mundial, cuando accidentalmente fue destruida (Thompson, 2007; Häkkinen, 2012). Más tarde, el uso de metales nobles gana mayor importancia en la terapéutica gracias a Robert Koch, formando parte de preparados con cianuro que se empleaban como tratamiento frente a la tuberculosis (Bhattacharya y Mukherjee, 2008).

Estos antecedentes propiciaron la síntesis e investigación en la actualidad de metales a escala nanométrica. Gracias a ello se ha logrado poner de manifiesto las especiales propiedades que hacen que las NPs metálicas sean interesantes candidatas a formar parte de novedosos tratamientos y técnicas que se desarrollan a lo largo de los siguientes apartados. Además, algunas de las terapias que se describen en el trabajo son de especial aplicación contra el cáncer, principal causa de morbilidad y mortalidad hoy en día a nivel mundial.

3. Objetivos

Debido a los importantes avances en cuanto a aplicación de nanopartículas sucedidos en la actualidad y a través de la búsqueda bibliográfica, este trabajo define el término de nanopartícula, y desarrolla las propiedades más importantes de las nanopartículas metálicas, más específicamente en las de oro, dada su especial biocompatibilidad y su baja toxicidad. También se ha recopilado información sobre ensayos científicos interesantes que muestran la posibilidad de aprovechar las especiales propiedades de estas nanopartículas en terapéutica y diagnóstico clínico. Se hace especial hincapié en la revisión bibliográfica de novedosas aplicaciones de nanopartículas relacionadas con terapias oncológicas, debido a su gran relevancia en la actualidad.

4. Metodología

A lo largo del trabajo se ha llevado a cabo una recopilación de extractos de libros online y artículos científicos hallados en las bases de datos de PubMed, ACSnano y Sciencedirect, así como algunas tesis de máster y doctorado con información relevante. Además, para ampliar información se consultaron algunas de las citas bibliográficas de artículos encontrados en las bases de datos. Como criterios de selección la búsqueda se centró en fuentes preferentemente en inglés y actuales, del 2008 en adelante, aunque también se tuvieron en cuenta algunas de años anteriores por poseer contenido a destacar e incluir en el trabajo. Se usaron palabras clave como *metallic, nanoparticles, gold, drug, theragnostic, ablation, bioimaging, photothermal therapy, plasmon, resonance*. Para añadir algunas definiciones o conceptos que ayudaran a comprender más a fondo el contenido que se trata en el trabajo se usaron recursos procedentes de páginas web.

5. Discusión

5.1. Propiedades de las nanopartículas

Una vez conocido el concepto de nanopartícula, es conveniente detallar en esta memoria algunas de las propiedades que las hacen tan interesantes. Las NPs, situadas en el rango de tamaños de átomos y moléculas, poseen propiedades diferentes a las del sólido volumétrico de partida. Este hecho es especialmente importante sobre todo en nanopartículas metálicas, donde se aprecian perceptibles cambios catalíticos, estructurales, electrónicos y ópticos.

A causa de su pequeño tamaño existe una elevada relación superficie/volumen. La superficie es una región muy activa de las sustancias y las partículas que están en la superficie tienen una energía mayor que las del mismo tipo que se encuentren en la fase homogénea, por lo que un sistema de NPs con una gran relación superficie/volumen posee una gran reactividad. Esta cualidad será muy útil para, como veremos más adelante, poder funcionalizar estas nanopartículas y usarlas con múltiples finalidades.

Además, en una nanopartícula los electrones están restringidos a moverse en una región muy pequeña, y ello implica la manifestación de efectos cuánticos percibidos en propiedades magnéticas (variación del momento magnético), en la conductividad electrónica o incluso la capacidad calorífica.

Por otro lado, el hecho de poseer una esfera de coordinación incompleta y de que los átomos de la superficie de estas NPs estén menos “enlazados” provoca que se incremente la energía libre superficial modificando propiedades como la temperatura de fusión. Sus propiedades catalíticas se dan como consecuencia de la gran actividad química de su superficie; al cambiar su forma cristalina, adoptando formas poliédricas, el número de bordes y esquinas es mayor, con lo que se incrementan su solubilidad y su capacidad de adsorción.

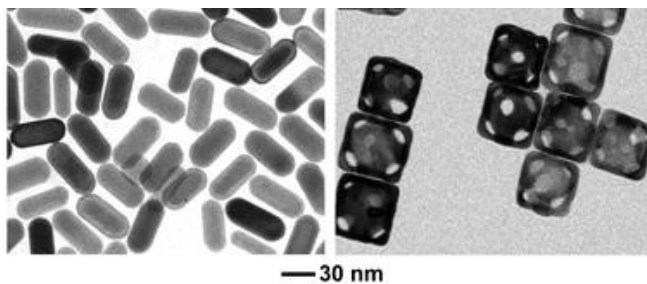


Figura 3. Nanopartículas de oro en forma de bastones y cubos. La forma que adopten determina la capacidad de adsorción de éstas (Cobley y cols., 2011).

Entre los ejemplos de buenos catalizadores se encuentran las nanopartículas de oro (AuNPs), cuya síntesis se describe más adelante (Thompson, 2007). En la figura 3 se muestran imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de AuNPs con formas de bastones y cubos.

Un hecho destacable de las nanopartículas metálicas son las características ópticas, gracias al fenómeno conocido como plasmón superficial. Cuando se hace incidir radiación electromagnética sobre una nanopartícula metálica, se produce una excitación colectiva de los electrones libres,

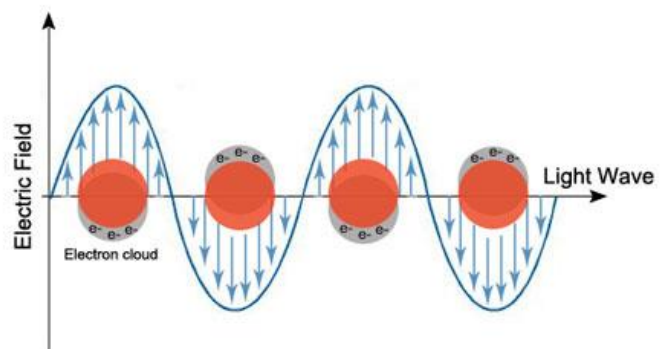


Figura 4. Al incidir la luz en una NP, los electrones de sus átomos se orientan de forma que se crea una zona con carga positiva y otra con carga negativa (<http://www.cvtodiagnosics.com>).

denominadas plasmón. Este hecho ocurre debido a que la proporción de átomos en la superficie respecto al volumen es muy superior a la del metal volumétrico al ser de tan pequeño tamaño, por lo que los electrones libres superficiales vibran al incidir sobre ellos un haz de luz, como se refleja en la figura 4. Como consecuencia de la excitación de los electrones, se genera una casi-partícula híbrida resultante del fuerte acoplamiento entre la luz y los electrones libres en la superficie de una NP (Criado y cols., 2007; Cornejo, 2015).

Tomando como ejemplo del oro, se conoce su color dorado brillante, pero sin embargo, cuando se encuentran en tamaño nanométrico su color varía dependiendo del tamaño de su diámetro, como puede apreciarse en la figura 5. Estos cambios se deben al fenómeno de resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR son sus siglas en inglés), que otorga a las nanopartículas la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color. La longitud de onda absorbida es aquella, cuya energía hace que el plasmón de superficie de la nanopartícula vibre con la misma



Figura 5. Nanoesferas de oro mostrando diferentes colores según el tamaño de partícula (<http://nanocomposix.eu>).

longitud de onda que la onda absorbida. Este fenómeno es observable en el rango visible, originando diferencias de color según la longitud de onda a la que absorba y además variará dependiendo del tamaño, forma, naturaleza química de la partícula, temperatura, así como también dependerá de las condiciones del medio en que se encuentren dispersas (Norris y Bawend, 1996).

Así, se observan desplazamientos del plasmón de superficie hacia el espectro visible de longitudes de onda mayores (hacia la derecha), con menor energía a medida que las nanopartículas aumentan de tamaño, tal y como aparece en el espectro de absorción de la figura 6. Por tanto, si una nanopartícula absorbe luz de color rojo, reflejará luz verde, que es el color que observaremos.

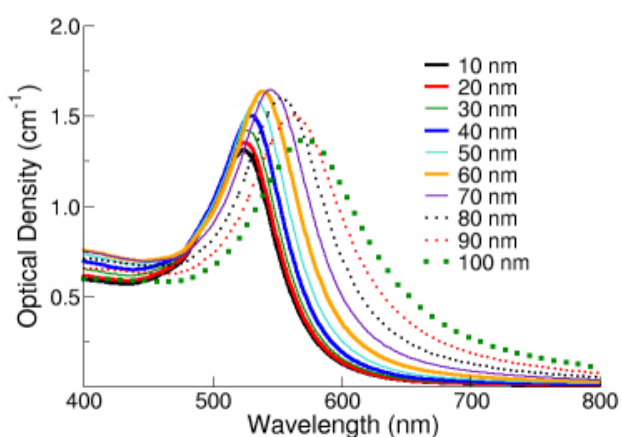


Figura 6. Espectros de absorción visible obtenidos para los distintos tamaños de nanopartículas (<http://nanocomposix.com>).

Otra propiedad óptica a tener presente se basa en la fluorescencia, debido al confinamiento cuántico que sufren los electrones a causa del reducido tamaño de partícula. Entre la capa de valencia y la capa de conducción de los átomos que forman las nanopartículas existe un “salto de banda” (*bandgap* en inglés), cuya magnitud se incrementa a medida que disminuye el tamaño

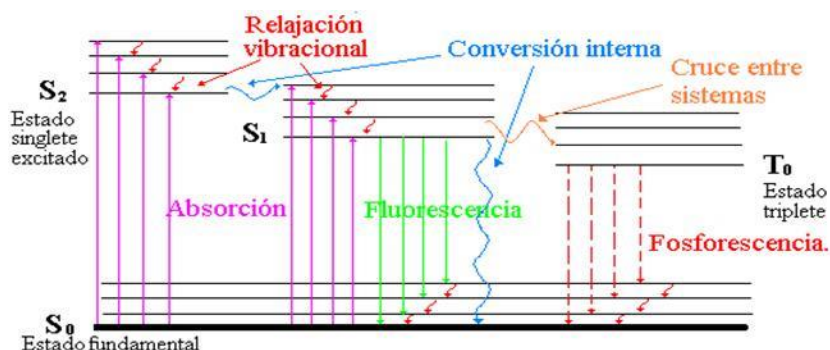


Figura 7. Diagrama de Jablonski en el que se representa el proceso de fluorescencia: cuando se absorbe radiación, los electrones pasan a un estado de singlete excitado. Para volver al estado fundamental puede liberarse energía emitiendo fluorescencia (http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/Clases_Teoricas/Fluorescencia.pdf).

de partícula. Por ello, cuando se produce la absorción de un fotón de radiación con una energía superior a la del salto de banda los electrones pasan a un estado de singlete excitado. Para volver a

su estado fundamental genera la emisión de un fotón de energía inferior al absorbido, con su correspondiente fotoluminiscencia, tal y como se esquematiza en la figura 7. Como se puede comprobar en la figura 8, la emisión de fotones será de energías discretas, es decir, de un solo color, el cual variará según el tamaño de partícula. Los espectros de absorción generados por NPs, suelen ser anchos, ya que el proceso de fotoluminiscencia es más probable que suceda a longitudes de onda pequeñas. Por este hecho se consideran excelentes alternativas al uso de fluoróforos, ya que poseen una mayor vida media del fenómeno luminiscente y mejoras en términos de sensibilidad y selectividad (García, 2013).

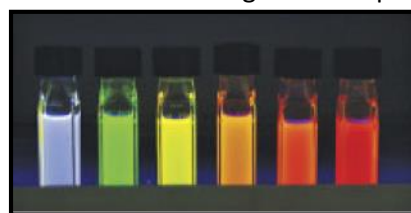


Figura 8. Luminescencia dependiente del tamaño de partícula (<https://quimicosonador.wordpress.com>).

El oro es un excelente candidato a formar parte de la síntesis de nanopartículas metálicas. Se trata de un metal de transición de una gran estabilidad química cuando se encuentra en su estado metálico y una notable resistencia a la corrosión. Además, la baja reactividad del oro lo convierte en el metal más inocuo para la salud humana. Forma parte de la industria alimentaria como colorante alimentario y añadidos decorativos de bebidas, e incluso se evalúa su uso terapéutico como anti-inflamatorio en dolencias como la artritis reumatoide. Por otro lado sin embargo, es importante destacar que algunas de sus sales, tales como el cloruro de oro, sí presentan toxicidad (Criado y cols, 2013).

5.2. Estabilidad de nanopartículas metálicas

Para formar agregados de átomos de tamaños adecuados es necesario que las nanopartículas se encuentren rodeadas de una “cubierta” de grupos químicos que protejan y eviten la aglomeración de estas. Varios de los tipos de estabilización son:

- Estabilización electrostática: en este caso la nanopartícula queda rodeada en su superficie por iones, lo que origina el

conocido efecto de doble capa eléctrica. Como se observa en la figura 9, este efecto consiste en que los iones que cubren la nanopartícula interactúan fuertemente con iones de signo contrario del medio, y estos a su vez atraen iones de signo opuesto, generando regiones con capas eléctricas bien diferenciadas. A medida

que la distancia con la superficie de la nanopartícula es mayor se percibe un mayor movimiento iónico, con lo que la carga será menos acusada en esta zona (capa difusa). En este caso, el potencial Z que se define como la energía mínima por unidad de carga que es necesario aplicar para separar la partícula de su atmósfera iónica, irá disminuyendo a medida que aumenta la distancia con la superficie de la nanopartícula.

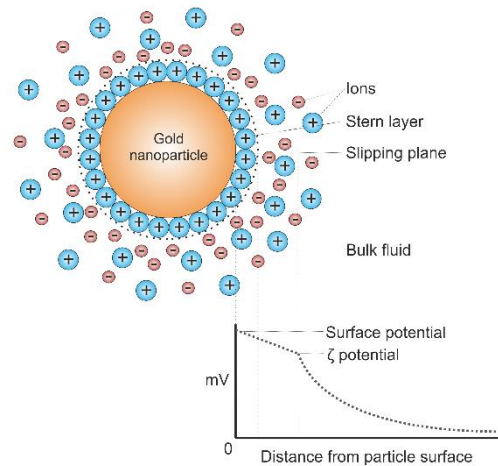


Figura 9. Doble capa eléctrica que se genera alrededor de una AuNP (https://commons.wikimedia.org/wiki/file:Gold_nanoparticle_Zetapotential.png).

- Estabilización de tipo estérica: lo que conseguimos es generar un impedimento estérico que evite que las nanopartículas se agreguen entre sí, mediante el anclaje en su superficie de grupos químicos voluminosos, como polímeros o cadenas largas de surfactantes.
- Estabilización electroestérica: utilizan haluros de tetraoctilamonio que se unen a la superficie de la nanopartícula metálica por la zona negativa de los haluros y además, proporcionan impedimento estérico por las cadenas alquílicas largas del compuesto (Friederisci, 2013).
- Estabilización mediante la unión de ligandos orgánicos donadores de átomos como P, N y S. Los tioles (-SH), al ser bases blandas poseen una gran afinidad química por los

metales nobles (ácidos blandos), según el principio de Pearson de ácidos y bases duros y blandos. En este modelo de unión dos grupos tiol interaccionan con tres átomos de oro en una conformación de puente (Ocampo, 2012).

5.3. Parte experimental

5.3.1. Síntesis de nanopartículas de oro

Como complemento a este trabajo bibliográfico, se procedió a la síntesis y caracterización de forma experimental de nanopartículas de oro.

En general, la síntesis de NPs puede llevarse a cabo mediante dos técnicas opuestas:

- *Top-down*, o técnica descendente, en la que se parte de un sólido volumétrico y se va reduciendo su tamaño de partícula hasta llegar a alcanzar medidas nanométricas.
- *Bottom-up*, o ascendente, en las que partiendo de átomos aislados en disolución se van generando uniones entre ellos hasta conseguir el tamaño de partícula deseado.

A su vez, pueden emplearse métodos físicos (como la termólisis) o métodos químicos, a través de la reducción o precipitación de metales en contacto con agentes estabilizantes, como es el caso de la síntesis de NPs de oro. De esta forma, una sal de oro se reduce en presencia de un agente químico reductor que se unirá a su superficie provocando la repulsión de las AuNPs entre ellas, tal como se ha descrito en el apartado anterior.

MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN: <ul style="list-style-type: none">• Vaso de precipitado• Frasco topacio• Matraz de fondo redondo• Equipo refrigerante• Termómetro• Agitador magnético con calor• Imán para agitador magnético	REACTIVOS: <ul style="list-style-type: none">• Ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) disuelto en ácido sulfúrico (H_2SO_4) (30 μL)• Agua destilada (222 mL)• Citrato sódico (0,035 g) disuelto en 3 mL de agua destilada.
--	--

PROCEDIMIENTO:

En este caso el método usado se ha basado en una variante del método de Turkevich (Turkevich, 1951). En un vaso de precipitado se disuelven los 30 μL de HAuCl_4 en 222 mL de agua destilada y se traslada a un frasco topacio. Del frasco se extraen 97 mL y se añaden al matraz de fondo redondo. Se mantiene calentando con agitación continua unido al equipo refrigerante, hasta que alcance una temperatura de 85-90°C, tal y como aparece en la figura 10.

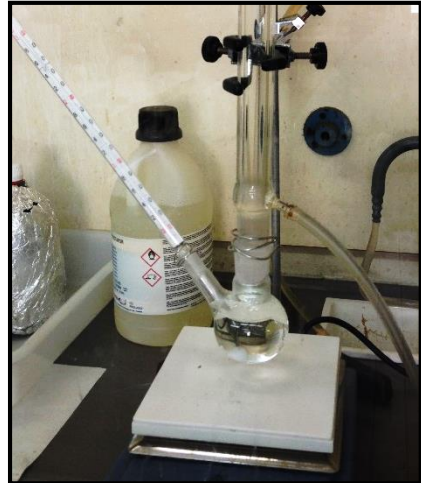


Figura 10. Montaje del equipo refrigerante para mantener la disolución acuosa de HAuCl_4 en agitación

Una vez alcanzada esta temperatura se añade la disolución de citrato sódico en agua, con ayuda de una jeringuilla, por la parte superior del refrigerante. A partir de este momento la disolución, que se mostraba transparente, cambia de color a un azul oscuro y va adquiriendo diferentes tonalidades, pasado del violeta hasta llegar a rojo, mostrado en la figura 11. Este cambio de color se basa en el cambio del estado de oxidación del oro, pasando de su forma iónica (+3) a su estado metálico (0).

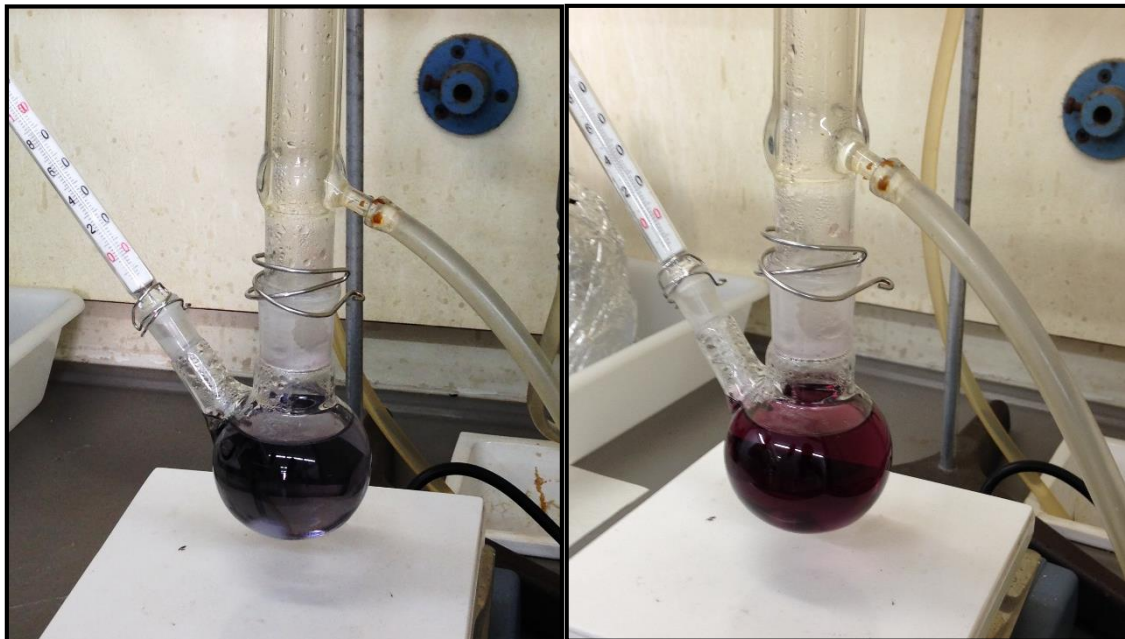


Figura 11. Proceso de reducción con citrato, inicialmente cambiando a tonalidad azul. Las nanopartículas van aumentando su tamaño a medida que se van agregando los átomos de Au y se rodean de citrato, adquiriendo la disolución un color rojizo, hasta que no existan más moléculas de citrato libres.

Es entonces cuando finaliza la reacción, pero se mantiene en agitación, sin calor, durante 24 horas para lograr la mayor dispersión posible de las partículas. Pasado ese tiempo se traslada la dispersión a un frasco topacio para proteger de la luz natural.

El citrato sódico utilizado actúa como agente reductor y a su vez como estabilizante. De este modo, las moléculas de citrato se adsorben y aportan carga negativa a las AuNPs para que estas se repelan entre sí, evitando así su precipitación. En la figura 12 se observa un esquema de la estructura generada por una AuNP y moléculas de citrato ancladas en su superficie.

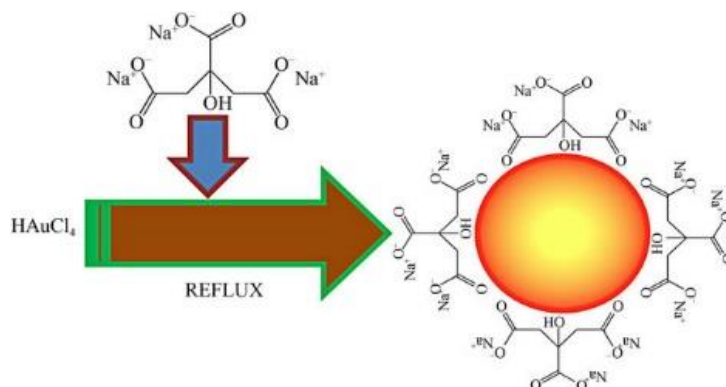


Figura 12. El citrato añadido se adhiere a la superficie de las NPs, de forma que todas poseen carga negativa (Ghosh y Chattopadhyay, 2013).

5.3.2. Resultados: caracterización

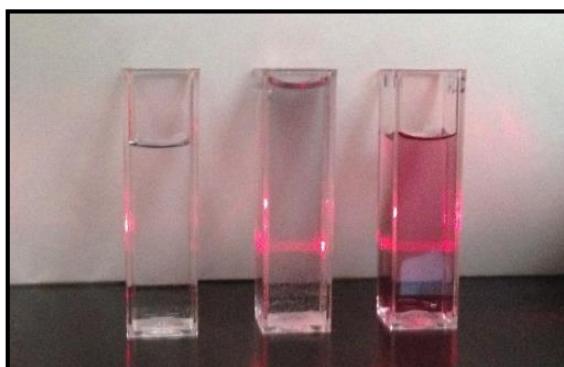


Figura 13. Cubeta 1 conteniendo agua y cubetas 2 y 3 conteniendo coloide de nanopartículas de oro. Al apuntar con un láser se observa como la cubeta de agua no dispersa la luz, mientras que las dos restantes sí

En primer lugar es interesante observar qué ocurre cuando la luz atraviesa una cubeta con agua y otras dos con nanopartículas. En aquella cubeta que contiene nanopartículas la luz atraviesa la cubeta, gracias a la absorción y dispersión de la luz por parte de éstas. Sin embargo, la cubeta que contiene agua no dispersa la luz, al tratarse de una disolución verdadera en la que no pueden distinguirse las partículas de la fase dispersante. Este

fenómeno físico es conocido como efecto Tyndall y es característico de los coloides.

Por otro lado, como ya se ha explicado anteriormente, la propiedad de una nanopartícula de interactuar con la luz de forma especial permite su caracterización. Gracias a este hecho, mediante la técnica de espectroscopía de absorción UV-Visible se procedió a caracterizar el coloide preparado, usando un rango de longitudes de onda de 350 nm a 800 nm. El espectro de absorción obtenido fue el siguiente:

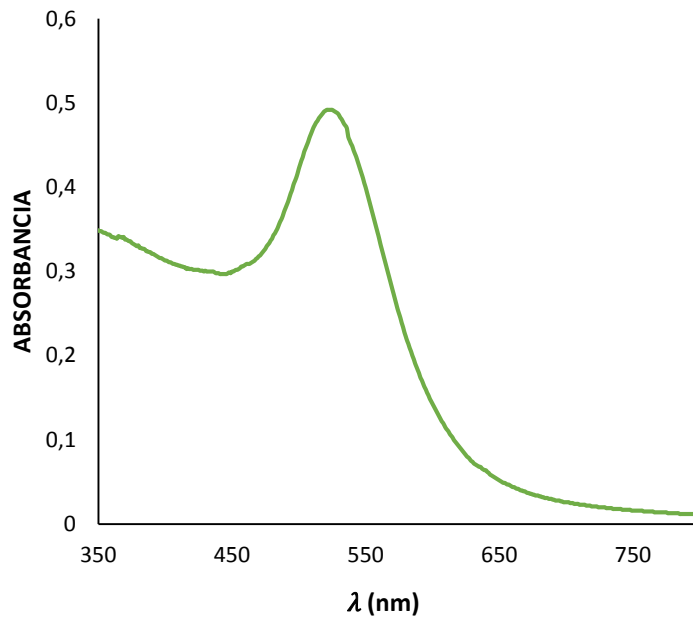


Figura 14. Representación de espectro de absorción UV-Visible. Muestra un pico de absorbancia máximo de 0,492 a 523 nm de longitud de onda.

Gracias al espectro de absorción, y con ayuda de datos de la figura 6, se puede aproximar que el tamaño de las NPs está entre 22-48 nm. Se observa un pico de banda estrecho correspondiente a las nanopartículas, debido a que la distribución de tamaños es más o menos homogénea. Basándonos en la Ley de Lambert-Beer ($A = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot l$) se deduce que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, por lo que cuanto mayor sea el valor del máximo de la banda de AuNPs, más concentración de ellas tendremos en nuestro coloide.

A su vez, cuanto más estrecha es la banda, más homogéneos serán los tamaños de éstas, y a medida que esta banda se desplace hacia longitudes de onda mayor la fracción de átomos de oro será menor y por tanto, las AuNPs formadas serán de mayor tamaño.

Además se midió el pH del coloide sintetizado, obteniendo un valor de pH de 4,9, cercano al segundo pKa del ácido cítrico.

El tamaño de las AuNPs puede ser modificado principalmente de varias formas:

- Añadiendo otra sustancia química que desplace las moléculas de citrato de la superficie.
- Cambiando el disolvente
- Variando el pH del coloide
- Modificando las interacciones entre las AuNPs.

El principal problema de la síntesis de nanopartículas metálicas es que hay que provocar dos procesos opuestos al mismo tiempo: las partículas tienen que crecer incorporando masa a su

superficie, pero si no se bloquea de alguna manera su superficie se agregarán unas con otras y aumentará el tamaño. Por otro lado, es deseable que el procedimiento de síntesis produzca AuNPs iguales en tamaño, forma y naturaleza, lo que se conoce como monodispersidad.

5.3.3. Estabilidad de las nanopartículas en presencia de electrolitos

Se preparó una disolución de 10 mL de NaCl 1 M. A continuación, se midieron mediante espectrofotómetro disoluciones de 1,5 mL de AuNPs con NaCl a distintas concentraciones:

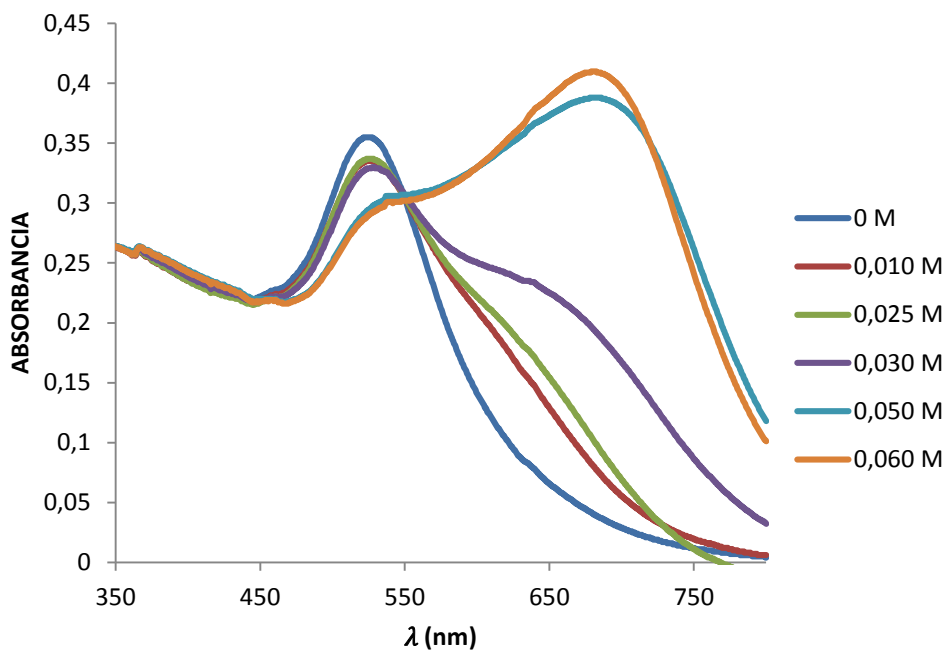


Figura 15. Representación de espectros de absorbanza obtenidos para coloides de AuNPs con distintas concentraciones de NaCl.

Se observa como a medida que aumenta la concentración de NaCl en el coloide, el electrolito desplaza al citrato que recubre las AuNPs la repulsión entre ellas es menor, por lo que se agregan y aumentan su tamaño. En la gráfica, la banda de absorbanza es cada vez más ancha y se encuentra más desplazada hacia longitudes de onda mayores.

5.4. Funcionalización de nanopartículas

En el anterior apartado de la memoria se ha puesto de manifiesto la posibilidad de funcionalizar una nanopartícula, añadiendo un electrolito que se adhiera a la superficie de ésta. Este hecho plantea la posibilidad de que las nanopartículas adsorban moléculas que sirvan, bien para evitar

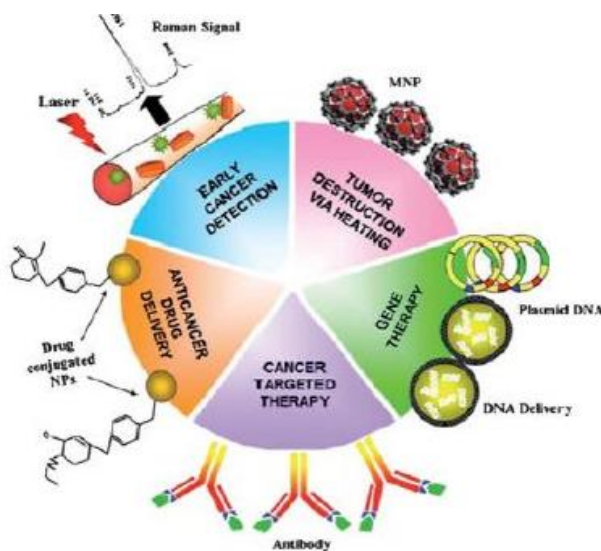


Figura 16. Aplicaciones de las nanopartículas y formas de funcionalización (Xu y cols., 2012).

el secuestro rápido por el sistema inmunológico, conseguir una mayor afinidad a moléculas biológicas o incluso vehicular fármacos para alcanzar con mayor especificidad el lugar de acción de éstos. Ejemplos de estas moléculas o compuestos anclados son: anticuerpos, ADN, ARN o péptidos. En la figura 16 se representan las distintas posibilidades de aplicación de las NPs en el tratamiento del cáncer.

Para funcionalizar una nanopartícula con otro compuesto es necesario añadir en su superficie grupos químicos que sirvan de enlace entre la nanopartícula y el compuesto en sí. Destacan como grupos de anclaje los tiolatos, ditiolatos, aminos, carboxilato, isotiocianato o fosfina. Los más relevantes son los dos primeros, especialmente los tiolatos, ya que si bien estudios llevados a cabo por Flynn y cols. (Flynn y cols., 2003) concluyeron que los ditiolatos son los grupos de elección debido a sus uniones multivalentes, también poseen una estabilidad menor, de aproximadamente 35 días bajo condiciones fisiológicas, lo que indicó que sería más útil emplear tiolatos (Dreaden y cols., 2012).

En la tabla 1 se muestran algunos de los grupos funcionales usados para unir NPs y ligandos y sus posibles aplicaciones (Tiwari y cols., 2011):

Grupo funcional	Ejemplo de ligando	Ventaja	Aplicaciones
Polietilenglicol (PEG)	Unido a un agente de contraste mediante grupos tioles.	Mayor adherencia a las membranas celulares. Aumenta el tiempo de permanencia en el organismo.	Estudios de biodistribución, vehiculización hacia dianas celulares específicas.
Péptidos	Receptores de la superficie de las membranas celulares, fármacos como el octreótido, anticuerpos.	Es capaz de intervenir en procesos de translocación nuclear y citoplasmática, vehiculización hacia células tumorales.	Técnicas de imagen de células tumorales, transporte celular e intracelular. Coadyuvante de activación de macrófagos cuando se administran vacunas.
ADN	Polinucleótidos de cadena de ADN complementario	Posibilidad de unión a cadena complementaria de ADN de proteína p53, supresora de tumores.	Detección de genes específicos, técnicas de bioimagen, regulación del ARNi.
Anticuerpos	Anticuerpos específicos de ciertos patógenos	Pequeño tamaño, fácilmente dirigibles hacia dianas específicas.	Diagnóstico y tratamiento inmunológico.

Tabla 1. Ejemplos de ligandos usados para funcionalizar NPs y grupos químicos mediante los cuales tiene lugar la unión, junto con sus ventajas y aplicaciones más relevantes

Existen estudios que ponen de manifiesto que la concentración de nanopartículas por transporte pasivo en tejidos tumorales es mayor, debido que la retención y permeabilidad en ellos se encuentra aumentada al desarrollar una vascularización inmadura con grandes fenestraciones. Este hecho hace que, junto con su pequeño tamaño y la facilidad de caracterización, sean agentes de contraste idóneos (Doello y cols., 2015). Incluso es posible, como veremos más adelante, usar nanopartículas con el fin de destruir tejidos cancerígenos gracias a la posibilidad de transformar la energía recibida en calor tras ser irradiadas.

Incluso el hecho de que las nanopartículas sean reconocidas como agentes extraños en el organismo también podría llegar a constituir una ventaja, sobre todo en el campo de las vacunas. Así, podría ser útil su empleo para potenciar los efectos de las vacunas, o incluso para mejorar la estabilidad de éstas. Además, sería posible el diseño de vacunas de liberación controlada basadas en nanopartículas que evitaran la problemática de tener que administrar varias dosis (González-Fernández, 2012).

En la actualidad, como ejemplo, se encuentra comercializado el medicamento [®]Abraxane, un polvo para suspensión para perfusión que contiene 5 mg de paclitaxel unido a albúmina en una formulación de nanopartículas. Se trata de un fármaco quimioterápico empleado en casos de metástasis, aprobado para su comercialización desde enero del 2009. Pero según podemos ver en la figura 17, para que una nanopartícula, sea cual sea su aplicación, llegue a ser comercializada es necesario que se lleven a cabo estudios preclínicos in vivo (cultivos de células, tejidos) e in vitro (animales) para evaluar parámetros de toxicidad y eficacia.

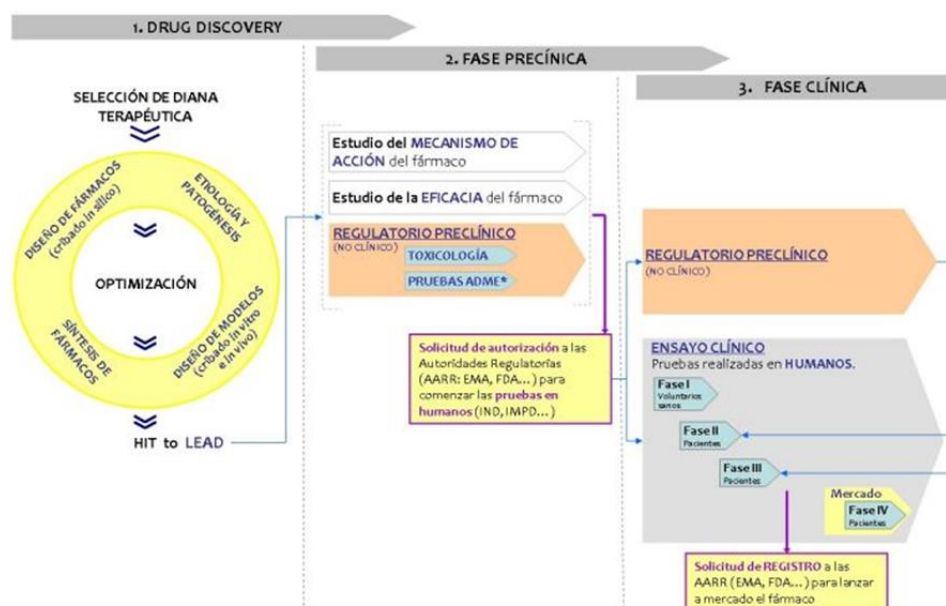


Figura 17. Etapas del procedimiento para comercializar un fármaco: tras el descubrimiento, existe una fase preclínica y otra clínica, y es necesario presentar un informe sobre cada estudio a las autoridades competentes (Miguel (de) y cols., 2012).

Una vez demostrada una favorable relación beneficio/riesgo de estos estudios se procede a la fase clínica, de estudio en humanos (Miguel (de) y cols., 2012). Todos estos procedimientos deben estar regulados y autorizados por entidades como la EMA (*European Medicines Agency*), AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) o la correspondiente en cada caso. El tiempo invertido suele ser entre 7 y 15 años, y el gasto suele rondar los 1.000 millones de euros, por lo que es muy importante tener en cuenta aspectos, no solo de la nanopartícula en sí, sino relacionados también con la biodistribución y farmacocinética de ésta en el organismo.

5.5. Farmacocinética y biodistribución

5.5.1. Entrada al organismo

Una vez descritas las características más importantes de las nanopartículas metálicas, también es interesante conocer qué ocurre dentro del organismo, qué cambios pueden llegar a producirse en las nanopartículas y sobre todo, las consecuencias de ello.

De forma general las nanopartículas deben ser biocompatibles, estables y no tóxicas. Además, muchas de ellas se diseñan de forma que, una vez ejercida su función, puedan descomponerse para así evitar su toxicidad por acumulación. Pero su supervivencia en el organismo dependerá principalmente del proceso por el cual hayan sido sintetizadas, de su superficie, de la vía de entrada usada y del efecto que se espera conseguir.

Según la vía de entrada al organismo las nanopartículas atraviesan unos tejidos u otros para llegar hasta el torrente sanguíneo, p.ej. capas de la piel, tejido pulmonar, tejido gástrico, etc. y/o podrían sufrir el efecto de primer paso hepático. Atraviesan las barreras biológicas mediante endocitosis, capturadas del medio extracelular. Este mecanismo consiste en que las nanopartículas son internalizadas mediante vesículas de las membranas plasmáticas celulares. No obstante, se han observado nanopartículas libres en el citoplasma o incluso en el interior de

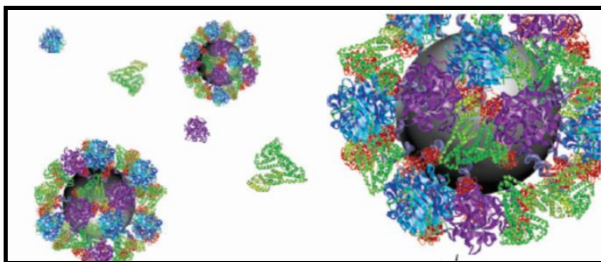


Figura 18. Proteínas adheridas a la superficie de las nanopartículas cuando se encuentran en el organismo (http://www.lincoi.it/files/centro_lincoi/Caracciolo_23-6-2014.pdf).

orgánulos como mitocondrias, lo que sugiere que quizás las NPs metálicas pueden atravesar las membranas plasmáticas por simple difusión pasiva, creando un poro de forma temporal (Ruiz, 2015). Una vez en la sangre, las nanopartículas se hallan en contacto con proteínas plasmáticas y tenderán a formar

uniones con ellas, originando un complejo de unión reflejado en la figura 18 que se denomina proteínas corona (Lundqvist y cols., 2008). El grado de unión variará según:

- el tamaño de las nanopartículas, siendo menor el grado de unión cuanto más pequeñas sean
- la carga superficial: nanopartículas neutras presentan una menor adsorción que las cargadas tanto positiva como negativamente.
- la forma geométrica de la nanopartícula antes de producirse la unión

Podría decirse que una vez en el organismo, la interacción de las nanopartículas con los tejidos diana depende también en parte del tamaño y conformación de las proteínas que lleve unidas. Como ejemplo, nanopartículas unidas con apolipoproteínas de baja densidad tienen mayor preferencia por tejidos con receptores lipoprotéicos, por lo que se concentrarán en el hígado (Aula y cols., 2015).

Por otro lado, el transporte de las nanopartículas desde la sangre a los tejidos depende del tipo de endotelio del capilar sanguíneo por el que circule, y además pueden distribuirse de forma pasiva, ya sea “per se” o mediante macrófagos y otras células secuestradoras, o también de forma activa en el caso de que lleven ancladas moléculas que las dirijan a lugares específicos. Ambos tipos desencadenarán una acumulación de nanopartículas en distintos órganos, pero en este caso con la distribución activa alcanzaremos sólo los tejidos diana (Kamaly y cols., 2012).

Una vez ejercido su efecto, la eliminación de estas NPs generalmente tiene lugar por vía renal, pero también pueden hallarse en heces al ser transferidas mediante la bilis en el hígado. El tamaño también condiciona su eliminación, pues sólo las de tamaños menores de 6 nm son capaces de ser filtradas por el riñón. En tamaños de 6 nm a 8 nm depende de la carga eléctrica, ya que ésta puede provocar procesos de adsorción e incrementar el diámetro de las nanopartículas. Se ha observado que se la filtración renal se ve favorecida en aquéllas con carga positiva o neutra. En cambio, tamaños de NPs superiores a 8 nm son dirigidos directamente al sistema retículo endotelial (Longmire y cols., 2008).

A pesar de que el transcurso de tiempo en el que las NPs del sistema circulatorio que son fagocitadas por los hepatocitos o las células Kupffer es relativamente rápido, su procesado y excreción por la bilis es lento, lo que propicia la acumulación de éstas en los tejidos hepáticos (Choi y cols., 2007).

5.5.2. Problemas de toxicidad

Uno de los aspectos más discutidos por los investigadores es la toxicidad o no de las nanopartículas. En el caso de las nanopartículas de oro, han demostrado ser las que mayor biocompatibilidad muestran, pero a pesar de ello su interacción con orgánulos celulares, ADN o las propias membranas celulares, pueden provocar problemas de apoptosis o daño por estrés oxidativo.

El organismo reconoce las nanopartículas como agentes extraños, y por ello desencadena una serie de respuestas inflamatorias para eliminarlas. Pero a su vez, la inflamación puede potenciar la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuáles se originan como producto del metabolismo celular y generalmente son neutralizadas gracias a la acción de los antioxidantes. Si se origina una sobreproducción de especies reactivas, tiene lugar un desequilibrio entre antioxidantes-especies reactivas, dándose lugar al estrés oxidativo, causante de daños celulares o incluso de desorganizar la estructura de azúcares, lípidos, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. En el caso de los ácidos nucleicos, este daño puede ocasionar una mutagénesis, es decir, una alteración de genes o cromosomas.

Pero además, la producción de especies reactivas puede darse de forma intrínseca, mediante contacto directo de la superficie de las nanopartículas con metales de transición o radicales libres (Ruiz, 2015).

De esta forma, un estudio llevado a cabo por Connor y cols. (Connor y cols., 2005) concluía que las nanopartículas por sí mismas no afectaban a la función celular, mientras que otro estudio nombrado en apartados siguientes de Goodman y cols. (Goodman y cols., 2004) determinaba que nanopartículas de ciertas concentraciones cargadas positivamente ocasionaban daños a nivel de membranas celulares.

En realidad, la toxicidad depende de múltiples factores. De la misma forma que el tamaño, la carga superficial, la forma geométrica, etc. condiciona la biodistribución de las nanopartículas, también condiciona los posibles problemas de toxicidad, así como la dosis y el tipo de célula con el que interacciona (Akilany y Murphy, 2010).

5.5.3. Impacto del tamaño de partícula

Las partículas de 10 nm penetran con mayor profundidad en los tejidos del corazón, timo, pulmones y cerebro, mientras que tamaños mayores tienden a acumularse en sangre, hígado y bazo. Aquéllas de entre 15 y 50 nm pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Sonavane y cols., 2008). Por otro lado, NPs con tamaños de 60 nm o mayores se conducen específicamente

hacia la médula ósea y acceden a las vías linfáticas. Además, como hemos mencionado anteriormente, durante el proceso las nanopartículas pueden adherir proteínas o incluso agregarse entre ellas aumentando su tamaño, como se observa en la figura 19, lo que puede provocar que queden retenidas en los tejidos pulmonares.

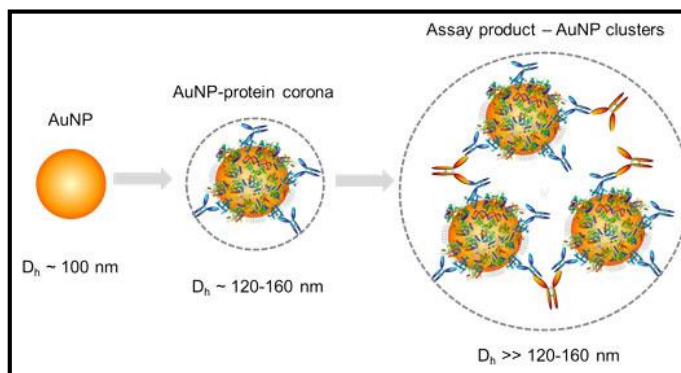


Figura 19. Aumento de tamaño de las nanopartículas al interactuar con proteínas plasmáticas (<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=39527.php>).

Sin embargo, nanopartículas con tamaños inferiores a 10 nm serán excretadas y eliminadas del organismo con mayor facilidad (Lundqvist y cols., 2008). Incluso existen estudios que confirmaron que las nanopartículas de oro de tamaños inferiores a 2 nm ocasionaban problemas de reactividad química, desencadenando en toxicidad (Akilany y Murphy, 2010). Todo ello ha de ser tenido en cuenta a la hora de dirigir las nanopartículas, ya que alcanzar un tamaño u otro nos servirá para poder predecir el órgano diana en el que ejercerá su efecto farmacológico.

5.5.4. Impacto de la carga superficial

En cuanto a la estabilidad de las nanopartículas es necesario controlar la carga superficial tanto en el proceso de síntesis como cuando entren en contacto en el organismo. Cuando se sintetizan nanopartículas en un medio líquido usamos, además, compuestos como el citrato, nombrado en el apartado de síntesis experimental y cuya función es evitar la agregación de éstas. Pero es importante tener en cuenta que las nanopartículas en el organismo van a estar constantemente en contacto con proteínas, macrófagos, ácidos nucleicos, electrolitos, etc. que pueden provocar problemas de agregación, sobre todo si se trata de nanopartículas con carga. Durante su estancia en el torrente sanguíneo una partícula con carga positiva en su superficie facilita las interacciones electrostáticas con las proteínas plasmáticas, pero también con los glóbulos rojos, ocasionando principalmente hemólisis (Xiao y cols. 2011). Por ello, parece que las NPs cargadas positivamente no son favorables durante su estancia en el torrente sanguíneo, pero se ha observado que, una vez en los tejidos, la carga positiva sí que favorece la formación de interacciones de tipo electrostático con las membranas, cargadas negativamente. El problema está en que si la nanopartícula se queda anclada puede producirse un daño en la membrana por toxicidad, como ocurre en el hígado, donde suelen acumularse con mayor frecuencia, dando lugar a procesos

inflamatorios, según las observaciones llevadas a cabo por Goodman y cols. (Goodman y cols., 2004).

En el caso de NPs cargadas negativamente, se ha observado que son más fácilmente “secuestradas” por el sistema inmune. Por otro lado, las partículas sin carga apenas muestran interacción, mostrando bajo grado de opsonización y secuestro por el sistema retículo-endotelial, al contrario de las nanopartículas con carga negativa (Aula y cols., 2015).

5.5.5. Impacto de la forma

Si el tamaño y carga de las nanopartículas condiciona su estancia en el organismo, también cobra importancia la forma geométrica, que facilitará o no la interacción con los macrófagos, aumentando o disminuyendo el tiempo de circulación en la sangre. En la figura 20 se muestran cuatro tipos de formas geométricas que se han observado para nanopartículas de oro: esferas, bastones, estrellas y triángulos.

Así, las partículas esféricas son inmediatamente fagocitadas por los macrófagos, debido a la presencia de curvaturas, y son más fácilmente excretadas. Por tanto, si se disminuye el grado de curvatura, es decir, se aumentan los bordes y esquinas y se sintetizan nanopartículas más alargadas, teniendo el mismo volumen se puede inhibir la fagocitosis. Pero se ha observado que si una partícula esférica logra sobrevivir a la fagocitosis, su biodistribución es mayor que la del resto de formas, sin embargo, no logra penetrar en el interior de los tejidos, como ocurre con las formas alargadas (Black y cols., 2014).

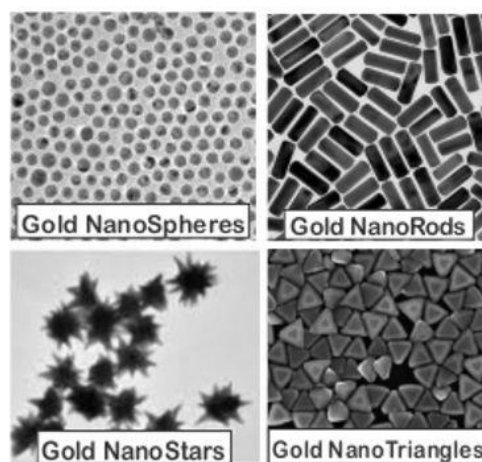


Figura 20. Diferentes formas de nanopartículas de Au (Chen y cols, 2008).

5.5.6. Sistema inmunitario

Además de la unión a proteínas plasmáticas, el sistema inmune juega un papel fundamental durante el tránsito de las nanopartículas por el organismo. De forma general, ante un antígeno o sustancia extraña, el organismo posee mecanismos de eliminación. En este caso también tiene lugar la unión de proteínas plasmáticas, llamadas opsoninas, a las nanopartículas a las que reconocen como algo extraño y las “marcan” para ser dirigidas al sistema fagocito mononuclear. Este sistema está compuesto por monocitos circulantes y macrófagos tisulares del hígado (80-90%), bazo (6-8%), ganglios linfáticos, médula ósea. Las nanopartículas opsonizadas pueden incluso almacenarse en los pulmones o en el cerebro.

Los macrófagos, pueden actuar frente a las nanopartículas de dos formas principales:

1. El propio macrófago crea una vesícula llamada fagosoma, envolviendo a la partícula extraña, como se ve en la figura 21. En el fagosoma se produce la destrucción del contenido mediante enzimas y otras actividades, hasta que el material se elimina por exocitosis.

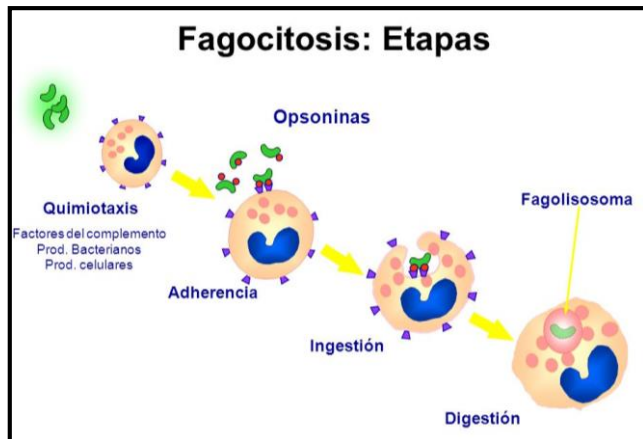


Figura 21. Etapas de la fagocitosis cuando el macrófago detecta un agente extraño (<http://inmunologiamed.blogspot.com.es>).

2. Actúan también como células presentadoras de antígeno, ya que no todo el contenido del fagosoma se degrada completamente. Es lo que se conoce como "activación clásica". El resto sin degradar se sitúa en la superficie del macrófago esperando contactar con un linfocito Th, el cual tras activarse, secreta citoquinas (sustancias intermedias en procesos como la inflamación) que a su vez activan a los macrófagos, con lo que éstos mejoran su capacidad fagocítica y de destrucción (Arpa, 2008).

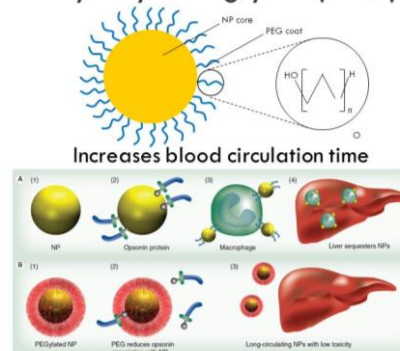
5.5.7. Minimización del secuestro inmunitario de las nanopartículas

Conocer los mecanismos que implican a las células del sistema inmunitario nos permite anticipar el secuestro de las NPs, así como su distribución y acumulación en órganos como el hígado, bazo o médula ósea. En muchas ocasiones se diseñan estrategias para evitar el reconocimiento y aumentar la permanencia en el torrente sanguíneo, algunas de las cuales se describen brevemente a continuación (Arami y cols., 2015).

a) PEGILACIÓN

Se han realizado estudios usando polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) para aumentar el tiempo de circulación de las nanopartículas. Se trata de un polímero inerte y según la longitud y densidad de las cadenas de PEG adheridas a la superficie de la nanopartícula, tal y como se ve en la figura 22, puede originar repulsión estérica y evitar la unión

Polyethylene glycol (PEG)



³Jokerst JV, Lobovikina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(4):715-728.

Figura 22. PEGilación de nanopartículas y su efecto en el organismo (Jokerst y cols., 2011).

de las opsoninas, sobre todo a partir de los 2 kDa de peso. El principal inconveniente es que dosis repetidas promueven la activación de anticuerpos anti-PEG, comprometiendo la eficacia del producto. En la actualidad todavía es necesario llevar a cabo más ensayos y estudios sobre el uso y la eficacia de este tipo de compuestos.

b) **COMPETICIÓN**

Existe una estrategia que se halla centrada en las células Kupffer, los macrófagos del hígado. Consiste en reducir el número de estas células cuando las nanopartículas se encuentran en el organismo, mediante la inyección de otro material que sea más afín a las células Kupffer. Se pueden emplear partículas liposomales cubiertas de níquel como agente quelante, que tienen gran afinidad para unir opsoninas y así la actividad inmunitaria se centrará más en la partícula liposomal que en la nanopartícula metálica. El problema de esta metodología es que aún es necesario evaluar la toxicidad a largo plazo de las partículas con níquel.

c) **MARCADO CON CÉLULAS SANGUÍNEAS**

Se observó que si se marcaban eritrocitos con nanopartículas aumentaba el tiempo de circulación de éstas en el organismo.

d) **OTRAS ESTRATEGIAS**

La tabla 2, realizada por Paciotti y cols. resume algunos de los problemas que suelen surgir en el abordaje del tratamiento de tumores mediante nanopartículas y posibles métodos de solventarlos (Paciotti y cols., 2006):

PROBLEMA	TÉCNICA PARA SOLUCIONARLO
Aclaramiento por el sistema retículo-endotelial a causa de la opsonización	- Envolver con una capa de polímeros hidrofílicos - Usar tamaños pequeños
Heterogeneidad celular existente en las masas tumorales	Nanopartículas multifuncionalizadas con ligandos específicos que sean capaces de reconocer los receptores de las células cancerígenas
Acceso a vascularización del tumor	Las nanopartículas tienden a acumularse de forma pasiva, por extravasación de los capilares defectuosos desarrollados por los tumores.

Tabla 2. Estrategias para atravesar barreras biológicas en la terapia antitumoral con nanopartículas.

El desarrollo estas técnicas constituyen interesantes perspectivas de aplicación en el campo de la farmacología cada vez más novedosas y estudiadas. Hoy en día, la era de los pacientes crónicos y polimedicados en la que cada vez son más las personas diagnosticadas de cáncer, es más importante que nunca la prevención y el diagnóstico precoz. Y con las ventajas de las NPs, será

posible mejorar notablemente la calidad de vida del paciente.

5.6. Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas

5.6.1. Nanopartículas y fármacos

Gracias a la capacidad de funcionalizar NPs es importante su uso en el campo de la farmacología como medio de vehiculización de fármacos hasta su lugar de acción, evitando así efectos secundarios. Este hecho constituye la estrategia de transporte activo de fármacos, alcanzando lugares específicos. En muchas ocasiones, este tipo de funcionalización está diseñada para que las NPs, una vez en el organismo, sean capaces de responder a estímulos externos. Además, gracias a este transporte activo se puede reducir la dosis de fármaco, ya que podríamos incluso evitar efectos de primer paso (Cho y cols., 2008).

El fármaco puede ir anclado en la superficie de una nanopartícula metálica mediante enlaces ditioles, como hemos nombrado en el apartado anterior, o puede incorporarse mediante un proceso conocido como capa a capa (*layer by layer*, LbL en inglés). Este mecanismo propone la formación alrededor de la nanopartícula de capas sucesivas de polielectrolitos, alternando electrolitos catiónicos y aniónicos mediante centrifugación. De esta forma el fármaco irá nanoencapsulado entre las capas formadas (Dreaden y cols., 2012).

Un caso interesante de unión nanopartícula-fármaco sería el de nanopartículas de oro con doxorubicina. La doxorubicina es un antibiótico empleado para el tratamiento de células cancerosas, actuando como agente intercalante entre las bases del ADN, con lo que se bloquea la síntesis y transcripción de éste y además inhibe la topoisomerasa II, lo que conlleva a la ruptura del ADN. Pero uno de los principales problemas que se origina tras el uso fármacos oncológicos es la llamada multiresistencia a fármacos (sus siglas en inglés MDR, "*Multiple Drug Resistance*"). La principal característica de los MDR es la producción en exceso de una glicoproteína de membrana llamada "glicoproteína P", responsable de una disminución de los niveles de fármaco en el interior de las células tumorales. Esta disminución tiene lugar mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP, directamente relacionado por tanto, con la permeabilidad celular (Juliano y Ling, 1976).

Tal y como se observa en la figura 23, si se ancla la doxorubicina a las AuNPs, su entrada a la célula tiene lugar mediante endocitosis, no siendo sustrato de la glicoproteína P y evitando, por tanto, el problema de MDR. Además, las nanopartículas de oro han demostrado actuar como "inhibidores" de fluorescencia, mediante un efecto de transferencia de energía entre el fármaco unido a la superficie de la nanopartícula. Por ello, mientras la doxorubicina se encuentre unida

a la nanopartícula no se observa fluorescencia, mientras que cuando entre en la célula, se almacene en órganos como lisosomas y se libere de la nanopartícula para ejercer su acción en el núcleo, se activará la fluorescencia de nuevo, siendo este fenómeno importante a la hora de monitorizar el fármaco (Wang y cols., 2011).

Pero no solo existen de tratamientos basados en la unión nanopartícula-fármaco, sino que también representa una novedad el uso de compuestos biológicos como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), una citoquina cuya eficacia en destrucción de tumores ha sido avalada por estudios científicos, pero que presenta la problemática de generar toxicidad sistémica. De forma que unida a las AuNPs realiza una doble función: actúa como ligando de vectorización y a su vez ejerce su acción antitumoral. El anclaje a las nanopartículas, junto con moléculas de PEG, aumenta su eficacia, disminuye la toxicidad sistémica y evita el secuestro celular y la estimulación del sistema inmunitario.

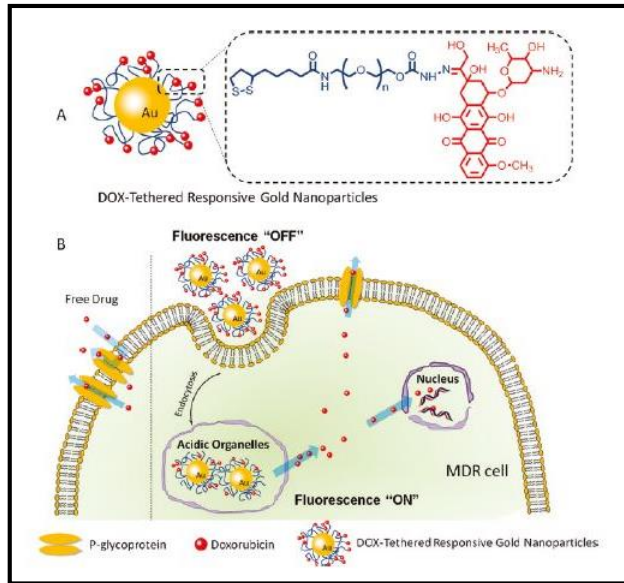


Figura 23. A) estructura de la molécula de doxorubicina unida a la nanopartícula de oro. B) Mecanismo de actuación de la nanopartícula de oro unida a la doxorubicina (Vigderman y Zubarey, 2013).



Figura 24. Tiempo transcurrido desde que las AuNPs-TNF-PEGiladas son inyectadas hasta que se observa su focalización en el tumor (Dykmana y Khlebtsov, 2012).

La figura 24 muestra un estudio en el que se inyectó de forma intravenosa TNF-AuNPs-PEGiladas en ratones, acumulándose en células de carcinoma de colon, con escasa o nula acumulación de éstas en el resto de órganos sanos (Dykmana y Khlebtsov, 2012). Estudios de Chen y cols. demostraron un retraso en el crecimiento del tumor tras el empleo del complejo TNF-AuNPs-PEGiladas, lo que ha dado lugar a que en la actualidad se esté llevando a cabo un estudio clínico (en fase I) para evaluar la toxicidad, farmacocinética y eficacia clínica (Chen y cols., 2008).

Una de las principales características que sitúan a las nanopartículas como idóneos agentes de vectorización de medicamentos es su posibilidad de atravesar barreras como la hematoencefálica, mediante endocitosis. Es por este hecho por el que se está evaluando su

empleo junto con el fármaco D-penicilamina, agente quelante que forma complejos con cobre, plomo y mercurio propiciando su eliminación por vía renal. Actualmente se encuentra aprobado para enfermedades como artritis reumatoide, enfermedad de Wilson o alzheimer.

En el caso del alzheimer, a pesar de que la causa biológica es aún desconocida, existen algunas hipótesis que afirman que es provocada por la formación de placas y ovillos neurofibrilares principalmente en los lóbulos temporales del cerebro, que son importantes para la memoria. Las placas amiloides, que se forman en el espacio extracelular entre las neuronas, se componen principalmente de un péptido denominado o β -amiloide ($A\beta$), que ha sido escindido de la porción extracelular de una proteína transmembrana, llamada proteína precursora de amiloide (APP). El análisis de la placa muestra que contiene varias copias del péptido $A\beta$ en un agregado insoluble oligomérico en forma de hoja β -plegada, con altas cantidades de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+} . Estos iones provocan la producción de especies reactivas de oxígeno, los cuales causan daños a los componentes celulares y a las neuronas.

El problema de la administración de la D-penicilamina es que se trata de un fármaco muy hidrofílico para atravesar la barrera hematoencefálica, y además es rápidamente eliminado de la sangre (52-55 min de vida media). Por tanto, gracias a su vectorización mediante nanopartículas su estancia en el organismo se prolongaría y sería posible acceder al cerebro para ejercer su efecto farmacológico (Cui y cols., 2005).

Por otro lado, recientemente, se han realizado estudios que han demostrado que por sí mismas las NPs también son capaces de provocar efectos terapéuticos en el organismo. Ejemplo de ello es la aplicación de AuNPs recubiertas de quitosano como agentes antimicrobianos, como alternativa al tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos resistentes a antibióticos. En este caso, se ha descubierto que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias gram positivas y negativas tales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, como se demuestra en la figura 25.

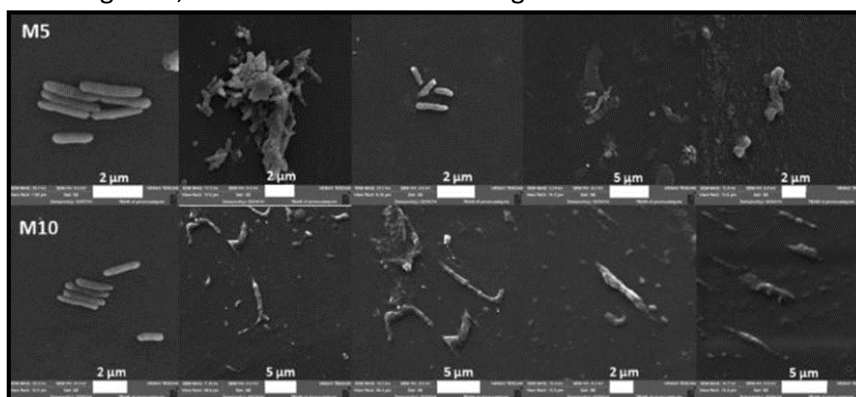


Figura 25. Nanopartículas rodeadas con quitosano a distintas concentraciones (M5 y M10) actuando sobre *Pseudomonas aeruginosa*, a lo largo del tiempo (Regiel-Futyra y cols., 2015).

Se desconoce actualmente el modo de actuación, pero muchos estudios (Cui y cols., 2012) sugieren que está relacionado con la capacidad de destrucción de la pared celular de estos microorganismos. Asimismo, el recubrimiento de estas nanopartículas con quitosano ofrece dos ventajas principales: por un lado, actúa como agente reductor en la síntesis de las AuNPs y a la vez como estabilizante (Prado y cols., 2014), con lo que se eliminarían ciertos problemas de citotoxicidad que han sido detectados con la generación de especies de oxígeno reactivo, y por otro lado, este polímero ofrece propiedades bactericidas demostradas, sumándose al efecto provocado por la nanopartícula (Regiel-Futyra y cols., 2015).

Por otro lado, resulta interesante destacar que nanopartículas de tamaños menores de 2 nm, por sí mismas, pueden inducir necrosis y daños mitocondriales (recordemos que en este rango de tamaños es particularmente importante su actividad catalítica, provocando estrés oxidativo gracias a su facilidad de penetrar en las células (Pan y cols., 2009)). Ello supone una ventaja en el tratamiento de tumores, en el que las nanopartículas son dirigidas selectivamente hacia los tejidos malignos. Incluso se ha descubierto a través de estudios in vivo e in vitro que AuNPs de 5 nm de diámetro tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de la vascularización de los tumores, debido a que se une a una glicoproteína básica que estimula el crecimiento de las células endoteliales vasculares del tumor, ocasionando la inhibición de su actividad y por tanto, frenando la progresión del tumor (Mukherjee y cols., 2005).

5.6.2. Ablación térmica

Es sabido que los componentes celulares son sensibles a la temperatura, pues una leve variación de ésta puede suponer la desnaturalización de proteínas. Por ello resulta interesante el planteamiento de abordar, mediante la generación de calor, la destrucción de células cancerígenas que alberguen nanopartículas en su interior.

El tratamiento o destrucción de células mediante calor resulta ser una técnica novedosa, variante de la fotodinámica, técnica usada ya en la antigüedad por griegos para tratar patologías. La fotodinámica consiste en la administración por vía intravenosa de un agente fotosensibilizante, que se deposita sobre las células afectadas en mayor concentración, y a continuación se irradia con una dosis lumínica, actualmente mediante láser. Cuando la longitud de onda de la radiación es la adecuada, se generan radicales libres de oxígeno que provocan una destrucción selectiva de las células. Constituye una de las alternativas más eficaces en la destrucción de células tumorales, y gracias a ella, ha tenido lugar el desarrollo de la técnica de terapia fototérmica, sobre la cual se centra el resto del apartado.

El uso de radiación electromagnética, como las producidas por los láseres de alta energía, constituye una nueva alternativa a la oncoterapia. Eliminan células tumorales localizadas mediante el aumento de temperatura por encima de umbrales de estabilidad de las células, provocando necrosis. Posee, además, ventajas frente a otras terapias, como el hecho de ser mínimamente invasiva o el de ser capaz de acabar con células que no pueden ser eliminadas por métodos quirúrgicos. En comparación con la terapia fotodinámica, se genera calor y no radicales libres de oxígeno, evitando problemas de toxicidad y destrucción de células sanas durante el proceso (Xu y cols., 2012).

De la misma manera que se afectan los tejidos tumorales también puede producirse necrosis de tejidos sanos, por lo que es necesario un control preciso de la temperatura en esta técnica. La variación de las propiedades fluorescentes de las nanopartículas con la temperatura puede utilizarse para determinar la temperatura intracelular, considerándose que una temperatura de 30 grados es suficiente para que las nanopartículas provoquen la destrucción de las células de su alrededor (Akilany y Murphy, 2010).

A pesar de que la terapia fototérmica presenta el inconveniente de la absorción de luz por parte de los tejidos del organismo (Jaque y cols, 2014), se han registrado regiones del espectro electromagnético llamadas ventanas biológicas. En este rango de longitudes de onda de la ventana biológica los tejidos presentan una transparencia parcial, el fenómeno de autofluorescencia de algunos orgánulos como lisosomas es bajo y la absorción de luz es mínima, con lo que la luz penetrará de forma más profunda en los tejidos biológicos. Por tanto, superada esta limitación, esta técnica se presenta como una eficaz alternativa gracias al empleo de nanopartículas metálicas, que poseen un elevado poder de calentamiento (llegando a alcanzar más de 30°C), una gran capacidad de acumularse en tejidos tumorales y además ofrecen la posibilidad de trabajar en los rangos de longitudes de onda de las ventanas biológicas (Martínez, 2015).

Es necesario tener en cuenta que la generación de calor por parte de las nanopartículas metálicas depende fuertemente de la longitud de onda y del tamaño de la nanopartícula. Además, la forma de las nanopartículas es importante a la hora de determinar el rango de longitudes de onda de absorción y ajustarse a la ventana biológica que se encuentra entre los 700 y 1000 nm (Agarwal y cols., 2007).

Destacan por su importancia los nanobastones de oro, fáciles de sintetizar, de pequeño y cuya absorción de plasmón superficial puede ser modificada. Estudios llevados a cabo por von Maltzahn y cols. demostraron que con nanobastones era posible la inhibición o incluso

eliminación de tumores in vivo. Esta inhibición tenía lugar mediante inyección intravenosa de nanobastones de oro PEGilados y con terapia fototérmica en ratones. Gracias a este estudio se pudo observar su gran selectividad hacia células cancerígenas (Maltzahn (von) y cols., 2008). En la figura 26 se aprecia la disminución del tamaño de tumor tras el tratamiento térmico de nanobastones de oro en ratones.



Figura 26. En la primera imagen se aprecia de forma externa la eliminación del tumor tras inyectar nanobastones de oro. En la segunda se aprecian los cambios de temperatura que genera la concentración de las nanopartículas en el foco de actuación (<http://nanopartz.com>).

Los nanocubos de oro también han demostrado comportarse como buenos candidatos, con propiedades ópticas de plasmón superficial que se ajustan a rangos de absorción de luz de entre 400 y 1200 nm. Incluso nanopartículas sintetizadas a base de oro y sulfuro de oro presentan una gran absorción en el rango del visible con un diámetro de menos de 25 nm, comparadas con nanoesferas del mismo tamaño, cuyo poder de absorción es menor (con un pico de absorción de 520 nm (Gobin y cols., 2010).

5.7. Empleo de nanopartículas en técnicas de diagnóstico

5.7.1. Diagnóstico mediante bioimagen

En lo relacionado al diagnóstico, seguimiento y tratamiento de cáncer y otras enfermedades como el Alzheimer adquieren gran importancia las técnicas de bioimagen. Entre ellas destacan las técnicas de PET (Tomografía de Emisión de Positrones), MRI (Imagen por Resonancia Magnética Nuclear) y TAC (Tomografía Axial Computerizada), las cuales nos ofrecen amplia información mediante el uso de agentes de contraste (Chen y cols., 2008).

A pesar de que cada una de ellas posee una base científica diferente, todas comparten un par de desventajas: no son capaces de detectar tumores de tamaños inferiores a 0,5 cm y no distinguen entre un tumor benigno y maligno. Como ejemplo, uno de los agentes de contraste más usados en diagnóstico por TAC es la iopromida (®Ultravist), pero presenta la problemática de causar daños renales y de ser rápidamente eliminado del organismo.

Es en este último aspecto en el que las nanopartículas aportan ventajas respecto a los contrastes convencionales, pues gracias a su relación cantidad/volumen la resolución o contraste es mayor. Asimismo, también pueden conjugarse con gran variedad de ligandos como anticuerpos específicos, es adecuado su uso para obtener imágenes de tumores o de órganos de manera más específica (Popovtzer y cols., 2008).

Como ejemplo de su aplicación se pueden mencionar las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, usadas como agentes de contraste en MRI. Estas NPs poseen baja toxicidad y la gran ventaja de la posibilidad de que el hierro sea asimilado por el organismo tras realizar su función diagnóstica, para la síntesis de metaloproteínas como la hemoglobina (Sandiford y cols., 2013; Mirabello y cols., 2015).

Ya hemos mencionado anteriormente que el inconveniente principal común al uso terapéutico de las nanopartículas es que pueden ser secuestradas fácilmente por macrófagos. Incluso este hecho puede desembocar en una ventaja, así, tras su secuestro son dirigidas al sistema retículo-endotelial, en el hígado y bazo, con lo que podría considerarse eficaz en la identificación y el diagnóstico de tumores en estos órganos (Sandiford y cols., 2013).

5.7.2. Fluorescencia

Según los principios físico-químicos, cuando una sustancia origina fotoluminiscencia previamente tiene lugar la absorción de radiación electromagnética, así un electrón pasa a un nivel energético superior. Tal y como se explica en el apartado de propiedades de las nanopartículas metálicas, es de especial importancia el fenómeno de fluorescencia en el rango entre visible e infrarrojo que experimentan, del orden de millones de veces más potente que el que puede darse en el material volumétrico de partida. En general, los métodos tradicionales usan fluoróforos moleculares como proteínas y otras moléculas orgánicas, las cuales se pueden incorporar fácilmente dentro de células vivas. Sin embargo, presentan una pobre fotoestabilidad y sus propiedades fluorescentes varían con el entorno (pH, viscosidad o concentración de iones de Ca^{2+}) (Resch-Genger y cols., 2008). Comparando la técnica de fotoluminiscencia usando fluoróforos orgánicos frente a las nanopartículas, éstas últimas emiten señales alrededor de 100 veces más potentes (Dreaden y cols., 2012). En la figura 28 se observa 30 min después de inyectar nanopartículas de diferentes tamaños en ratones cómo se concentran en el área de tumor (al estar funcionalizadas con anti cuerpos específicos), y la elevada resolución de la imagen que generan.

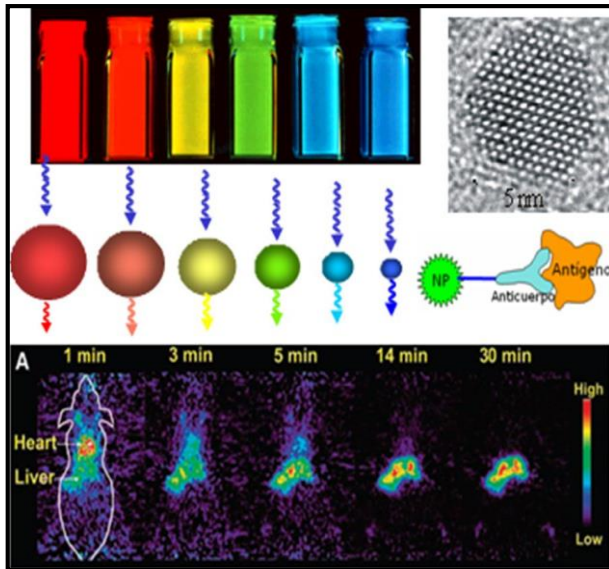


Figura 28. Uso de nanopartículas de diferentes tamaños aplicadas en ratones, observándose mediante su emisión de fluorescencia su acumulación en órganos como corazón e hígado (Liz-Marzán LM, 2013).

Así, se describe en la bibliografía el uso de nanopartículas metálicas como los nanobastones de oro para la detección de células cancerígenas en terapia de fotoluminescencia, con una resolución espacial de 75 nm según estudios de Durr y cols. (Durr y cols., 2007). Con estos resultados se pretende aplicar la técnica de fluorescencia para localizar tumores in situ, sin necesidad de realizar biopsias, e incluso en cirugías, para poder delimitar de forma más precisa la masa tumoral a extirpar.

Pero no solo emiten fluorescencia las nanopartículas metálicas, pues existen moléculas dentro de la escala nanométrica que de forma intrínseca pueden generar fotoluminescencia. Estudios de Fan y cols. (Fan y cols., 2016) muestran la posibilidad de generar fluorescencia mediante el empleo de un dipéptido de nanopartículas formado por triptófano y fenilalanina. Las señales que se originan se encuentran en el rango de ultravioleta a visible, y además, este complejo posee la ventaja de ser biodegradable.

Por otro lado, se estudia la posibilidad de combinar la técnica fototérmica con la fotoluminescencia como alternativa, en algunos casos, a tratamientos y cirugías de tumores. De esta forma, se aúnan diagnóstico y tratamiento, ofreciendo la posibilidad de eliminación de tumores de manera mínimamente invasiva.

5.7.3. Técnica fotoacústica

Esta técnica forma parte de las aplicaciones más prometedoras en diagnóstico médico. Consiste en la detección, mediante ultrasonido, de áreas de emisión acústica generadas en los tejidos por pulsos de láser. En la figura 29 se muestra un esquema de su mecanismo.

Al escoger cuidadosamente el ancho de banda correcto, el rayo de luz calienta sólo las células que contienen biomoléculas que absorben luz llamadas cromóforos, tales como la hemoglobina y la melanina. La rápida expansión de las moléculas con cromóforos calientes ocasiona un cambio en la presión local. Esta acción crea un tipo particular de onda sonora, una onda

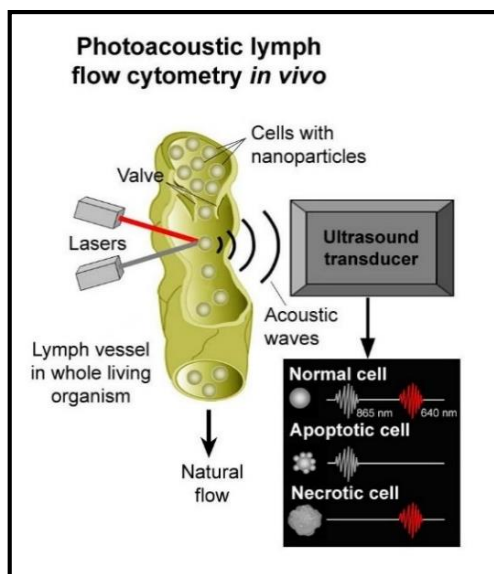


Figura 29. Técnica fotoacústica en la diferenciación de tipos de células (Tuchin y cols., 2011).

fotoacústica, la cual viaja a través del tejido y es capturada por un transductor de ultrasonido en la superficie de la piel. Esta técnica combina por tanto, la especificidad y sensibilidad de las técnicas de imagen ópticas y la alta resolución de la detección de imagen por ultrasonido (Agarwall y cols, 2007). Al igual que en la terapia fototérmica, esta técnica puede aportar grandes avances en el diagnóstico de células tumorales, y es de especial interés el uso de nanopartículas que actúen como cromóforos. Se han logrado obtener imágenes fotoacústicas de gran detalle, mediante inyección de nanocubos 2 horas antes, que fueron detectados incluso en vasos

sanguíneos del cerebro de tamaños de 100 μm , siendo imposible visualizarlos sin el uso de agentes de contraste (Dreaden y cols, 2012).

Por último, otras de sus aplicaciones son la detección de macrófagos en placas ateroscleróticas, diagnóstico de respuestas inflamatorias en etapas tempranas, y monitorización de fármacos dirigidos (Li y Chen, 2015).

6. Conclusiones

Mediante el procedimiento experimental se ha logrado la síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas de oro estables en coloides y se ha podido comprobar visualmente la variación del color de éstas con el tamaño de partícula, mediante la adición de un electrolito.

A lo largo de la revisión bibliográfica se han puesto de manifiesto las útiles ventajas que ofrece la nanotecnología, un área aparentemente reciente, cuyo desarrollo es clave para el tratamiento de enfermedades.

De todas sus líneas de aplicación, resulta interesante destacar la terapia combinada de diagnóstico y tratamiento (en inglés denominada *theranostic*). Los estudios consultados ponen de manifiesto la posibilidad de crear nanopartículas con tamaños y formas específicas, capaces de generar imágenes con contrastes de gran resolución y que, además, pueden ser funcionalizadas y dirigidas hacia células diana. E incluso es posible dirigir externamente la nanopartícula mediante un campo magnético, como ocurre con las de óxido de hierro. A su vez,

en el lugar de acción las NPs pueden destruir células por sí mismas, mediante la aplicación externa de pulsos de láser que estimulan la producción de calor. Este hecho constituye un avance muy importante en la terapia oncológica, evitando en parte técnicas quirúrgicas y por tanto, mejorando la calidad de vida del paciente.

Los principales problemas a los que se enfrenta la nanotecnología son: la producción de radicales libres de oxígeno por las nanopartículas, una vez alcanzan las células y el rápido secuestro por el sistema inmunitario. Para solventarlos, es posible adecuar el tamaño y forma de las NPs e incluso se están ensayando estrategias como la PEGilación de nanopartículas o la competición.

Por otro lado, es posible crear un complejo nanopartícula-fármaco que aporte numerosas ventajas. Entre ellas, cabe destacar el hecho de evitar efectos secundarios, aumentar el tiempo de vida media de permanencia en el organismo e incluso evitar el efecto de primer paso hepático. Este último hecho permite administrar dosis menores de fármaco consiguiendo el efecto farmacológico que queremos, mejorando así la adherencia al tratamiento del paciente.

Por último, se apuntan líneas futuras de investigación hacia la terapia génica. Probablemente nos encontremos ante la alternativa más eficaz para la erradicación de enfermedades como el cáncer, el alzheimer o la fibrosis quística.

7. Bibliografía

- * Agarwal A, Huang SW, O'Donnell M, Day KC, Day M, Kotov N, Ashkenazi S. *Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging*. J. Appl. Phys., 2007; 102(6): 064701-4.
- * Akilany AM, Murphy CJ. *Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?* J. Nanopart. Res., 2010; 12(7): 2313–2333.
- * Antonii F. *Gold potion, or two treatments of potable gold*, 1618.
- * Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. *In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles*. Chem. Soc. Rev., 2015; 44(23): 8576-8607.

- * Arpa Toribio L. *Mecanismos moleculares que regulan la activación clásica y alternativa de los macrófagos*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, Departamento de Fisiología, 2008.
- * Aula S, Lakkireddy S, Jamil K, Kapley A, Swamyd AVN, Lakkireddy HR. *Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles*. RSC Adv., 2015; 5(59): 47830-47859.
- * Berger M. *A quick and simple blood test to detect early-stage cancer*. 2015. [en línea] [Consultado en Abril de 2016]. Disponible en <http://www.nanowerk.com>.
- * Bhattacharya R, Mukherjee P. *Biological properties of «naked» metal nanoparticles*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2008; 60(11): 1289-1306.
- * Black KCL, Wang Y, Luehmann HP, Cai X, Xing W, Pang B, Zhao Y, Cutler CS, Wang LV, Liu Y, Xia Y. *Radioactive ¹⁹⁸Au-Doped Nanostructures with Different Shapes for In Vivo Analyses of Their Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution*. ACS Nano, 2014; 8(5): 4385-4394.
- * Caracciolo G. *Nanomaterials in physiological environments: challenges and opportunities for the Life Sciences*. 2014. [en línea] [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en http://www.lincoi.it/files/centro_lincoi/Caracciolo_23-6-2014.pdf
- * Chen H, Kou X, Yang Z, Ni W, Wang J. *Shape and Size Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles*. Langmuir, 2008; 24(10): 5233-5237.
- * Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. *Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing*. Nanotechnology, Science and Applications, 2008; 2008(1): 45–66.
- * Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer*. Clin. Cancer. Res., 2008; 14(5): 1310-1316.
- * Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. *Renal clearance of quantum dots*. Nat. Biotechnol. 2007; 25(10): 1165-1170.
- * Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. *Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications*. Chem. Soc. Rev., 2011; 40(1): 44-56.
- * Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. Small, 2005; 1(3): 325-327.

- * Cornejo L. *Nuevas tecnologías y materiales*. [Consultado en Marzo de 2016], Recurso online disponible en: <http://nuevatecnologiasymateriales.com>.
- * Criado CL; Rodríguez DC; Torres RAR, Juárez BPS, Reséndez RM. *Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro*. Celerinet, 2013; (Especial) 98-103.
- * Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. *Biomaterials*, 2012; 33(7): 2327-33.
- * Cui Z, Lockmanb PR, Atwood CS, Hsua CH, Gupte A, Allen DD, Mumper RJ. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 2005; 59(2): 263-72.
- * Cytodiagnosics. *Gold Nanoparticle Properties*. [en línea]. [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en <http://www.cytodiagnosics.com>.
- * Doello K, Cabeza L, Ortiz R; Arias JL, Melguizo C, Prados J. *Magnetic Nanoparticules in Cancer Diagnosis and Treatment*. *Actual. Med.*, 2015; 100(796): 139-144.
- * Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CI, El-Sayed MA. *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine*. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41(7): 2740-2779.
- * Durr NJ, Larson T, Smith DK, Korgel BA, Sokolov K, Ben-Yakar A. *Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells using Molecularly Targeted Gold Nanorods*. *Nano Lett.*, 2007; 7(4): 941-945.
- * Dykmana L, Khlebtsov N. *Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives*. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41(6): 2256-2282.
- * Espinosa C. *Citoquinas, Fagocitosis e Inflamación*. 2015. [en línea]. [Consultado en Abril de 2016]. Disponible en <http://inmunologiamed.blogspot.com.es/2015/06/citoquinas-fagocitosis-e-inflamacion.html>.
- * Fan Z, Sun L, Huang Y, Wang Y, Zhang M. Bioinspired fluorescent dipeptide nanoparticles for targeted cancer cell imaging and real-time monitoring of drug release. *Nat. Nanotechnol.*, 2016; 11(4): 388-394.
- * Flynn NT, Tran TNT, Cima MJ, Langer R. *Long-term stability of self-assembled monolayers in bio-logical media*. *Langmuir*, 2003; 19(26): 10909–10915.

- * Friederisci M. *Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y propiedades catalíticas*. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, 2013.
- * Fuentes Rojas, A. *Estudio de la interacción directa entre biopolímeros y sistemas metálicos nanodispersos: efectos del protocolo de inmovilización*. Trabajo Fin de Máster de estudios avanzados en Química. Universidad de Sevilla, 2014.
- * García Cortés M. *Síntesis de nanopartículas metálicas funcionalizadas: aplicación al análisis bioquímico, posibilidades de amplificación para biomarcadores*. Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Oviedo, 2013.
- * Ghosh D, Chattopadhyay N. *Gold Nanoparticles: Acceptors for Efficient Energy Transfer from the Photoexcited Fluorophores*. Optics and Photonics Journal, 2013; 3(1): 18-26.
- * Gobin AM, Watkins EM, Quevedo E, Colvin VL, West JL. *Near Infrared Resonant Gold / Gold Sulfide Nanoparticles as a Photothermal Cancer Therapeutic Agent*. Small, 2010; 6(6): 745-752.
- * González-Fernández AM, Olmedo P, Lozano T, Simón R, Díaz B. *Nanotecnología y sistema inmunitario*. En Juan M editor. Monografías Dr. Esteve. Número 36. Nuevas perspectivas en Inmunoterapia Nuevas perspectivas en inmunoterapia. Fundación Dr. Antonio Esteve, 2012: p. 21-33.
- * Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. *Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains*. Bioconjug. Chem., 2004; 15(4): 897-900.
- * Häkkinen H. *Ligand-Protected Gold Nanoclusters as Superatoms-Insights from Theory and Computations*. En Johnston Roy, Wilcoxon JP editor. Metal Nanoparticles and Nanoalloy; Elsevier; 2012. p. 129-154.
- * Jaque D, Maestro LM, Rosal B, Haro-Gonzalez P, Benayas A, Plaza JL, Martín Rodríguez E, García Solé J. *Nanoparticles for photothermal therapies*. Nanoscale, 2014; 6(16): 9494-9530.
- * Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy*. Nanomedicine (Lond.), (2011), 6,715–728.
- * Juliano RL, Ling V. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim. Biophys. Acta., 1976; 455(1): 152-162.

- * Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. *Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation*. Chem. Soc. Rev., 2012; 41(7): 2971-3010.
- * Larryisgood. *Potential difference as a function of distance from gold nanoparticle surface*. 2011 [en línea] [Consultado en Marzo de 2016]. Disponible en <https://commons.wikimedia.org>.
- * Li W, Chen X. *Gold nanoparticles for photoacoustic imaging*. Nanomedicine (Lond.), 2015; 10(2): 299–320.
- * Liz-Marzán LM. *Nanobiosensores, Aplicaciones en la frontera entre las nanociencias y la biomedicina*. CIC network, 2013; (13): 24-27.
- * Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. *Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats*. Nanomedicine (Lond.), 2008; 3(5): 703–717.
- * Lundqvist M, Stigler J, Elia G; Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008; 105(38): 14265-14270.
- * Maltzahn (von) G, Park JH, Agrawal A, Bandaru NK, Das SK, Sailor MJ, Bhatia SN. *Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas*. Cancer Res., 2008; 69(9): 3892-3900.
- * Martín Yerga D. *Quantum dots, quizás el año que viene*. 2012. [en línea] [Consultado en Marzo de 2016]. Disponible en <https://quimicosonador.wordpress.com>.
- * Martínez Maestro L. *Puntos cuánticos como nanotermómetros luminiscentes: hipertermia plasmónica controlada*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de física de materiales, 2015.
- * Miguel (de) M, Gracia C, Martín L, Escribano M: *Guía de desarrollos preclínicos, Fundación para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica (Genoma España)*. 2012 [en línea]. [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.uspceu.com>.

- * Mirabello V, Calatayud DG, Arrowsmith RL, Ge H, Pascu SI. *Metallic nanoparticles as synthetic building blocks for cancer diagnostics: from materials design to molecular imaging applications*. J. Mater. Chem. B, 2015; 3(28): 5657-5672.
- * Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. *Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles*. Clin. Cancer Res., 2005; 11(9): 3530-3534.
- * Nanocomposix. *Gold Nanoparticles: Optical Properties*. [en línea]. [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en <http://nanocomposix.eu>.
- * Nanopartz. *In Vivo Photothermal Therapy*. [en línea] [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en http://www.nanopartz.com/invivo_therapeutics_ntracker.asp.
- * Norris DJ, Bawendi MG. *Measurement and assignment of the sizedependent optical spectrum in CdSe quantum dots*. Phys. Rev. B Condens. Matter., 1996; 53(24): 16338-16346.
- * Ocampo BE. *Desarrollo de un radiofármaco específico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con HYNICpéptido/manosa para la detección de ganglio centinela en cáncer de mama*. Tesis doctoral de Física-Médica. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Universidad Autónoma del Estado de México, 2012.
- * Oliva Montero JM. *Copa de Licurgo: cuando ciencia y arte se dan la mano para hacer historia*. MOLEQLA, 2013; 11.
- * Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. *Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors*. Drug Dev. Res., 2006; 67(1): 47-54.
- * Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Brandau W, Schmid G, Simon U, Jahnchen-Dechent W. *Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage*. Small, 2009; 5(18): 2067-2076.
- * Popovtzer R, Agrawal A, Kotov NA, Popovtzer A, Balter J, Carey TE, Kopelman R. *Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer*. Nano Lett, 2008; 8(12): 4593-4596.
- * Prado R, Lopez G, Martin MJ, Cabrera F, Franconetti A. *Use of gold nanoparticles as crosslink agent to form chitosan nanocapsules: Study of the direct interaction in aqueous solutions*. J. Inorg. Biochem, 2014; 135: 77-85.

- * Química Analítica. *Cátedra de Espectroscopía de fluorescencia molecular*. 2011. [en línea]. [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/Clases_Teoricas/Fluorescencia.pdf.
- * Regiel-Futyr A, Kus-Liśkiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G, Kyzioł A. *Development of Non cytotoxic Chitosan-Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials*. ACS Appl Mater Interfaces, 2015; 7(2): 1087-1099.
- * Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nat Methods, 2008; 5(9) 763-75.
- * Ruiz Gallardo O. *Nanomateriales y salud laboral. Estudio del impacto económico de una propuesta de solución reglamentaria*. Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Politécnica de Cataluña, 2015.
- * Sandiford S, Phinikaridou A, Protti A, Meszaros LK, Cu X, Yan Y, Frodsham G, Williamson PA, Gaddum N, Botnar RM, Blower PJ, Green MA, de Rosales RT. *Bisphosphonate-Anchored PEGylation and Radiolabeling of Superparamagnetic Iron Oxide: Long-Circulating Nanoparticles for in Vivo Multimodal (T1 MRI-SPECT) Imaging*. ACS Nano, 2013; 7(1): 500-512.
- * Sciau P. *Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval*. En Dr. Hashim, editor. The Delivery of Nanoparticles: InTech; 2012. p. 525-540.
- * Sonavane G, Tomoda K, Makino K. *Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size*. Colloids Surf. B Biointerfaces, 2008; 66(2): 274–280.
- * Tecnología Nano. *Recrean la nanotecnología del cristal que cambiaba de color en la Antigua Roma*. 2014. [en línea].[Consultado en marzo de 2016]. Disponible en (<http://tecnologianano.com>)
- * Thompson D. Michael *Faraday's. Gold Bulletin*, 2007; 40(4): 267-269.
- * Tiwari PM, Vig K, Dennis VA; Singh SR. *Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications*. Nanomaterials, 2011; 1(1): 31-63.
- * Tuchin VV, Tárnok A, Zharoy VP. *In vivo flow cytometry: a horizon of opportunities*. Cytometry A, 2011; 79(10): 737-745.

- * Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc*, 1951; 11: 55-75.
- * Vigderman L, Zubarev ER. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013; 65(5): 663-676.
- * Wang F, Wang YC, Dou S, Xiong MH, Sun TM, Wang J. Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS nano*, 2011; 5(5): 3679-3692.
- * Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*, 2012; 64(5): 1020-1037.
- * Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, Agarwal RG, Lam KS. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 2011; 32(13): 3435-3446.
- * Xu Y, Heberlein WE, Mahmood M, Orza AI, Karmakar A, Biris AR, Casciano D, Mustafa T. Progress in materials for thermal ablation of cancer cells. *J. Mater. Chem.*, 2012; 22(38): 20128-20142.