



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

SISTEMAS FOTOACTIVOS PARA ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR CON CÉLULAS CANCEROSAS SKBR-3

AUTORA: Núria Belda Marqués

TUTORA: María Consuelo Jiménez Molero

COTUTOR: Ignacio Vayá Pérez

Curso Académico: 2020-21

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. M^a Consuelo Jiménez Molero y al Dr. Ignacio Vayá Pérez por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, donde he podido adquirir una mayor destreza en el laboratorio e iniciarme en el campo de la investigación. Especialmente, quisiera agradecer a Nacho la atención que siempre me ha prestado, todos los conocimientos que me ha enseñado y las dudas que siempre ha estado dispuesto a responder. También quiero dar las gracias a Lorena por haber estado en todo momento a mi lado dispuesta a ayudarme, a tranquilizarme y preocupándose de que todo saliera bien y de que pudiera aprender al máximo.

En segundo lugar a mi familia, especialmente a mi madre, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente siempre a lo largo de todos estos años.

A Javi, por todos los momentos que hemos pasado durante el grado y por su apoyo emocional.

A Belén, por haber compartido la experiencia juntas hasta el final y por los buenos momentos vividos tanto en clase como fuera.

Por último, gracias a Gucci por haberme acompañado durante este último curso todas las noches de estudio.

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se han sintetizado nanopartículas esféricas de oro (AuNPs) con un diámetro de 2-4 nm, las cuales han sido funcionalizadas con polietilenglicol (PEG), diferentes proteínas (HSA, BSA, RatSA y RabSA) y con ambos isómeros del éster etílico del flurbiprofeno (FBPet). Mediante técnicas como la espectrofotometría UV-vis, la fluorescencia y la fotólisis de destello láser, se ha estudiado la fotorreactividad del complejo FBPet@proteína en distintos medios (acuoso, con AuNPs en disolución y con proteína unida covalentemente a las AuNPs) para poder comparar su comportamiento. Finalmente, se ha realizado un estudio de viabilidad celular con células cancerosas de mama humana (SKBr-3) con el fin de investigar su potencial uso en terapia u otras aplicaciones biológicas.

Para la síntesis de las nanopartículas y su funcionalización, se tomaron las cantidades óptimas para llevar a cabo la reacción, siguiéndose el método de Brust-Schiffrin. Mediante las medidas de los espectros de absorción UV-vis, se comprobó que las diferentes proteínas se encontraban correctamente ancladas a las nanopartículas. Tras llevar a cabo el estudio de la fotorreactividad de los complejos en los distintos medios, se obtuvieron diferentes resultados en función de la proteína estudiada. En este sentido, los ensayos realizados con FBPet@HSA, muestran una desactivación de la fluorescencia en presencia de AuNPs, cuya causa puede atribuirse a un proceso de transferencia electrónica entre la nanopartícula y FBPet@HSA, aunque tampoco se puede descartar la formación de un complejo en el estado excitado que no emita.

Por último, se realizaron estudios de viabilidad celular con células de cáncer de mama humana SKBr-3. Los resultados obtenidos indican que la tasa de supervivencia de las células es menor en presencia de AuNPs, tanto en disolución como unidas covalentemente a HSA. Asimismo, se ha observado que existe cierta enantiodiferenciación, donde (S)-FBPet parece que induce mayor muerte celular. No obstante, el ensayo debería repetirse con el fin de comprobar la reproducibilidad de los resultados.

Palabras clave: albúminas séricas, cultivos celulares, fármacos, fluorescencia, fotólisis de destello láser, nanopartículas de oro

RESUM

En aquest treball de fi de grau s'han sintetitzat nanopartícules esfèriques d'or (AuNPs) amb un diàmetre de 2-4 nm, les quals han sigut funcionalitzades amb polietilè glicol (PEG), diferents proteïnes (HSA, BSA, RatSA i RabSA) i amb tots dos isòmers de l'èster etílic del flurbiprofen (FBPet). Mitjançant tècniques com l'espectrofotometria UV-vis, la fluorescència i la fotòlisis de centelleig làser, s'ha estudiat la fotorreactivitat del complex FBPet@proteïna en diferents medis (aquós, amb AuNPs en dissolució i amb proteïna unida covalentment a les AuNPs) per a poder comparar el seu comportament. Finalment, s'ha realitzat un estudi de viabilitat cel·lular amb cèl·lules canceroses de mama humana (SKBr-3) amb la finalitat d'investigar el seu potencial ús en teràpia o altres aplicacions biològiques.

Per a la síntesi de les nanopartícules i la seua funcionalització, es va fer ús de les quantitats òptimes per a dur a terme la reacció, seguint el mètode de Brust-Schiffrin. Mitjançant les mesures dels espectres d'absorció UV-vis, es va comprovar que les diferents proteïnes es trobaven correctament unides a les nanopartícules. Després de dur a terme l'estudi de la fotorreactivitat dels complexos en els diferents medis, es van obtenir diferents resultats en funció de la proteïna estudiada. En aquest sentit, els assajos realitzats amb FBPet@HSA, mostren una desactivació de la fluorescència en presència de AuNPs, la qual pot atribuir-se a un procés de transferència electrònica entre la nanopartícula i FBPet@HSA, encara que tampoc es pot descartar la formació d'un complex en l'estat excitat que no emeta.

Finalment, es van realitzar estudis de viabilitat cel·lular amb cèl·lules de càncer de mama humana SKBr-3. Els resultats obtinguts indiquen que la taxa de supervivència de les cèl·lules és menor en presència de AuNPs, tant en dissolució com unides covalentment a HSA. Així mateix, s'ha observat que existeix una certa enantiodiferenciació, on (S)-FBPet sembla que indueix major mort cel·lular. No obstant això, l'assaig hauria de repetir-se amb la finalitat de comprovar la reproduïbilitat dels resultats.

Paraules clau: albúmines sèriques, cultius cel·lulars, fàrmacs, fluorescència, fotòlisis de centelleig làser, nanopartícules d'or

ABSTRACT

In this work, spherical gold nanoparticles (AuNPs) with a diameter of 2-4 nm have been synthesized and functionalized with polyethylene glycol (PEG), in addition with different proteins (HSA, BSA, RatSA and RabSA); besides, the two isomers of flurbiprofen ethyl ester (FBPet) bound to the proteins have also been used. Spectroscopic techniques such as UV-vis, fluorescence and laser flash photolysis have been used to investigate the photoreactivity of the FBPet@protein complexes in different media (aqueous solution, with AuNPs in solution and with the protein covalently linked to the surface of AuNPs) in order to compare their behavior. Finally, a cell viability study has been performed with human breast cancer cells (SKBr-3) in order to investigate their potential use in therapy or other biological applications.

For the synthesis of the nanoparticles and their functionalization, optimal amounts were taken to carry out the reaction, following the Brust-Schiffrin method. UV-vis absorption spectroscopy was used to confirm that the different proteins were properly bounded to the nanoparticles. After studying the photoreactivity of the complexes in the different media, different results were obtained depending on the investigated protein. In this sense, a significant fluorescence quenching of FBPet@HSA in the presence of AuNPs has been observed, which can be attributed to an electron transfer process between the nanoparticle and FBPet@HSA, although it cannot be discarded the formation of a complex in the excited state with no emission.

Finally, cell viability studies were performed with SKBr-3 human breast cancer cells. The obtained results indicate that the cell survival rate is lower in the presence of AuNPs, both in solution and covalently bound to HSA. Also, a slight enantiodifferentiation has been observed, where (S)-FBPet appears to induce greater cell death. However, the assay should be repeated in order to check the reproducibility of the results.

Key words: cell cultures, drugs, fluorescence, gold nanoparticles, laser flash photolysis, serum albumins

ÍNDICE

Documentos presentes en el TFG

- Memoria
- Presupuesto

Índice de la memoria

Capítulo I. Objetivos e introducción	2
1.1 Objetivos del trabajo	4
1.2 Introducción	5
1.2.1 Los nanomateriales y sus aplicaciones	5
1.2.2 Las nanopartículas y sus aplicaciones en medicina	6
1.2.3 Las nanopartículas de oro	8
1.2.4 Métodos de síntesis de las nanopartículas de oro	10
1.2.5 Funcionalización de las nanopartículas de oro.....	11
1.2.6 Las proteínas y su interacción con los AINEs.....	12
1.2.7 Métodos de caracterización para las nanopartículas funcionalizadas.....	15
Capítulo II. Procedimiento experimental	19
2.1 Síntesis y caracterización fotofísica de las nanopartículas de oro	21
2.1.1 Síntesis y funcionalización de las AuNPs	21
2.1.2 Caracterización de las AuNPs	22
2.2. Funcionalización de las AuNPs con distintas proteínas	23
2.3 Preparación y estudio de la fotoreactividad de AuNPs-PEG-Proteína con FBPet.....	24
2.3.1 Síntesis del éster etílico del flurbiprofeno	24
2.3.2 Preparación de las muestras	26
2.3.3 Estudio fotofísico del complejo FBPet@proteína	28
2.4 Estudio de citotoxicidad con células SKBr-3.....	28
Capítulo III. Resultados experimentales.....	32
3.1 Caracterización fotofísica de las AuNPs funcionalizadas con PEG3000	34
3.1.1 Espectroscopía de absorción UV-vis	34
3.2 Estudio fotofísico de las AuNPs funcionalizadas con distintas proteínas y FBPet	34

3.2.1 Espectroscopía de absorción UV-vis	34
3.2.2 Fluorescencia en estado estacionario	38
3.2.3 Cinéticas de fluorescencia	41
3.2.4 Fotólisis de destello láser (FDL)	43
3.3 Estudios de viabilidad celular	49
Capítulo IV. Conclusiones y perspectiva de futuro.....	51
4.1 Conclusiones.....	53
4.2 Perspectiva de futuro	54
Capítulo V. Bibliografía	55
ANEXO. Fundamentos fotofísicos	59

Índice del presupuesto

1. Introducción al presupuesto	64
2. Presupuesto descompuesto.....	64
2.1 Material	64
2.2 Equipos	65
2.3 Mano de obra	66
2.4 Reactivos químicos	66
3. Resumen del presupuesto.....	67

DOCUMENTO I.
MEMORIA

CAPÍTULO I. OBJETIVOS E **INTRODUCCIÓN**

1.1 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente trabajo de fin de grado tiene como objetivo general el diseño de nanopartículas de oro esféricas de 2-4 nm de diámetro, así como su funcionalización con PEG3000 junto a diferentes proteínas transportadoras: albúmina sérica humana (HSA), bovina (BSA), de rata (RatSA) y de conejo (RabSA). Se estudiarán las propiedades fotofísicas de las nanopartículas diseñadas mediante técnicas espectroscópicas tales como UV-vis, fluorescencia y fotólisis de destello láser; además, se investigará la fotorreactividad de estos sistemas cuando el derivado etilado del fármaco flurbiprofeno (FBPet) interacciona con cada una de las proteínas. Asimismo, con el fin de determinar cómo se ve afectada la fotorreactividad del complejo según el medio en que se encuentre, los estudios se llevarán a cabo en medio acuoso, en nanopartícula en disolución y con la proteína unida covalentemente a la nanopartícula. Por otro lado, se investigará la fotorreactividad de ambos isómeros del derivado farmacológico, el isómero (*S*)- y (*R*)-FBPet, con el fin de determinar si existe estereoselectividad en las interacciones con la proteína en el nanomaterial.

Por otra parte, este trabajo también tiene como objetivo estudiar la citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas con el fin de determinar la viabilidad de su uso en terapia contra células cancerosas de mama humanas SKBr-3.

1.2 INTRODUCCIÓN

1.2.1 Los nanomateriales y sus aplicaciones

Los nanomateriales han ido tomando importancia en el campo científico a lo largo de los últimos años debido a la diferencia que reside en sus propiedades químicas, físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas a escala nanométrica con respecto a escalas mayores [1], adquiriendo así cualidades que de otro modo permanecen inertes. Estas variaciones vienen causadas por el aumento de la relación entre superficie y volumen, así como por la aparición de efectos cuánticos a medida que un material se reduce [2].

En los últimos años, los nanomateriales han sido objeto de estudio en la comunidad científica de forma que se ha ampliado el conocimiento sobre ellos, permitiendo así la creación de nuevos sistemas nanométricos con características singulares y aplicaciones novedosas en múltiples campos tales como el sanitario, electrónico, químico etc. [3].

Los nanomateriales presentan ciertas propiedades en la escala nanométrica (de 1 a 100 nm) en al menos una dimensión y que varían según su morfología [3]. En este sentido existen una gran variedad de formas tales como esférica, cilíndrica, tubular, helicoidal, dendrítica, etc. El control de su morfología es de gran importancia para obtener las propiedades deseadas en un nanomaterial.

Atendiendo a su aspecto dimensional, los nanomateriales pueden clasificarse en cuatro grandes grupos (ver *Figura 1*) [4]:

- Estructura Cero dimensional (0D): Las tres dimensiones se encuentran dentro de la nanoescala. Generalmente, aquellos nanomateriales que poseen estructura 0D son nanopartículas.
- Estructura Unidimensional (1D): Dos dimensiones se encuentran dentro de la nanoescala. Esta clase incluye nanotubos, nanofibras y nanorods, entre otros.
- Estructura Bidimensional (2D): Una de las tres dimensiones se encuentra dentro de la nanoescala. Son nanomateriales en forma de lámina o monocapa.
- Estructura Tridimensional (3D): Ninguna de las dimensiones se encuentra confinada en la nanoescala. Dentro de esta clasificación se encuentran los materiales nanoestructurados, las dispersiones de nanopartículas y multi-nanolayers.

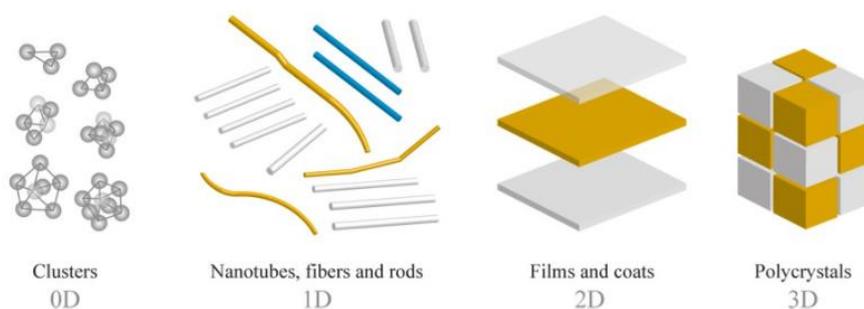


Figura 1. Clasificación de los nanomateriales según su aspecto dimensional

Estos nanomateriales pueden encontrarse en la naturaleza o bien ser sintetizados artificialmente. Los nanomateriales naturales son principalmente el resultado de una serie de procesos químicos, fotoquímicos, mecánicos, térmicos y biológicos. Aquellos de naturaleza orgánica pueden encontrarse en corales, plumas de aves e incluso seda y algodón. Del mismo modo, también existen en la naturaleza nanomateriales inorgánicos como las cenizas volcánicas o ciertas arcillas. En cambio, en el mundo tecnificado, los nanomateriales son diseñados y sintetizados de forma deliberada con vistas a aplicaciones determinadas. Actualmente se utilizan en diversos productos como, por ejemplo, en alimentos, cosméticos, agentes antimicrobianos, etc., así como para aplicaciones tecnológicas y biológicas [2].

1.2.2 Las nanopartículas y sus aplicaciones en medicina

Dentro de los nanomateriales, las nanopartículas (NPs) destacan por el gran atractivo que reside en sus propiedades físico-químicas, las cuales vienen determinadas por su composición química, tamaño y forma.

Entre todos los campos donde estos materiales pueden ofrecer mejoras, las nanopartículas han tomado en los últimos años un alto interés en el campo de la nanomedicina, tanto en el diagnóstico de enfermedades tales como el cáncer, como en el tratamiento de las mismas. Este auge surge por el gran potencial que estas poseen para ser usadas en aplicaciones biomédicas debido a su gran resistencia a la oxidación, su baja toxicidad, fácil síntesis y por poder ser altamente funcionalizables, aumentando así los niveles de biocompatibilidad [5]. Por ejemplo, las NPs son utilizadas como agentes de contraste en imagen de resonancia magnética (RM) [6], la cual es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de enfermedades de forma no invasiva. Se ha visto que el uso de NPs en este método diagnóstico permite una mayor diferenciación entre los tejidos sanos y los tejidos patológicos debido a que producen un mayor contraste en las imágenes obtenidas. No obstante, se debe tener en cuenta que para utilizar nanopartículas como agente de contraste es necesario que estas sean magnéticas, es decir, deben ser poseedoras de un núcleo magnético el cual debe encontrarse recubierto por una película polimérica biocompatible. Esta capa polimérica es la encargada de aportarle a la nanopartícula los grupos funcionales necesarios para que puedan unirse a ella las moléculas biológicas (anticuerpos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos) que serán las encargadas de dotar a la nanopartícula de la especificidad necesaria para reconocer las dianas biológicas deseadas.

Actualmente, las nanopartículas más utilizadas e investigadas en bioimagen son aquellas cuyo núcleo magnético está formado por óxido de hierro. Esto se debe principalmente a sus propiedades magnéticas y a su fácil proceso de síntesis. Sin embargo, en la actualidad también se encuentra en investigación el uso de nuevos materiales para el núcleo con el fin de mejorar las imágenes obtenidas en RM. En este contexto, se están diseñando nanopartículas de hierro dopadas con Mn, Co y Ni. Por otra parte, para realizar el recubrimiento polimérico, los compuestos más utilizados son el polietilenglicol (PEG) y el polisacárido dextrano dada su gran biocompatibilidad y su elevada afinidad por el hierro. No obstante, también pueden utilizarse materiales no poliméricos como oro y sílice [6].

Otra gran aplicación de las nanopartículas en biomedicina es su uso como vehículos de transporte. En este caso, las NPs realizan la función de agentes terapéuticos encargados del transporte de fármacos hasta localizaciones concretas del organismo. Este desplazamiento es

posible gracias a la acción de un campo magnético externo o bien porque las nanopartículas han sido funcionalizadas de forma que, al reconocer algún receptor de la célula tumoral, las nanopartículas se unen a ella. Tras unirse, las NPs quedan retenidas en el interior de la célula un tiempo lo suficientemente largo, produciéndose así la liberación controlada del fármaco [6].

El uso de NPs como vehículos de transporte presenta dos grandes ventajas: la necesidad de una menor dosis de fármaco dado que es liberado directamente sobre la zona deseada y la disminución de efectos secundarios sobre tejidos sanos. Un ejemplo de esta aplicación es el estudio realizado por Chiang *et al.*, donde se utilizaron nanopartículas magnéticas recubiertas con alcohol polivinílico y funcionalizadas con el anticuerpo Trastuzumab para transportar el fármaco Doxorubicina hasta células tumorales de ratones [7]. El objetivo de esta investigación era demostrar que el tamaño de los tumores disminuía al someter las NPs a un campo magnético externo; así pues, se demostró que los tumores se reducían 3,25 veces más en presencia del campo magnético externo que en ausencia del mismo.

Con estos antecedentes, conviene destacar la viabilidad de utilizar nanopartículas funcionalizadas simultáneamente como técnica de diagnóstico y terapia. Esto es viable dada la posibilidad de dirigir las nanopartículas a las células malignas deseadas y de liberar los fármacos de forma controlada.

Finalmente, la hipertermia magnética es otra de las aplicaciones más destacables de las nanopartículas para el tratamiento de tumores. Esta técnica consiste en el aumento localizado de la temperatura (por encima de 43°C) en células cancerosas provocado por la interacción de NPs con un campo magnético externo, induciendo así la muerte celular. Aunque la hipertemia magnética únicamente ha sido utilizada en tumores superficiales, su eficacia también ha sido testada en tumores de mama o cerebrales entre otros [8].

En relación a las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas metálicas, y en particular en las formadas por oro, algunas poseen ciertas particularidades entre las que cabe destacar la resonancia de plasmón superficial (SPR) [9]. Los plasmones consisten en una oscilación colectiva de los electrones de conducción libres al ser iluminados con luz de una determinada longitud de onda que concentre el campo eléctrico de la luz alrededor de la nanopartícula, amplificando así su magnitud. Esta característica depende de la forma y tamaño de la nanopartícula, así como de la constante dieléctrica del medio que la rodea [10].

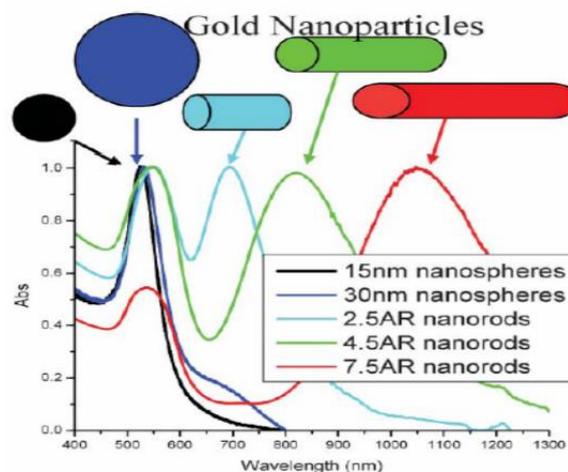


Figura 2. Espectros de absorción de nanoesferas y nanorods de oro según su tamaño

La *Figura 2* muestra el espectro UV-vis de nanopartículas de oro, observándose la banda de plasmón cuyo máximo de absorción varía en función del tamaño de NP. Para las nanopartículas anisotrópicas, como los nanorods, presentan dos máximos diferenciados: la banda a una longitud de onda menor corresponde a la absorción y dispersión de la luz a lo largo del eje menor del nanorod, mientras que la que se presenta a mayor longitud de onda pertenece a su eje mayor [9].

Entre la gran variedad de materiales existentes, las nanopartículas de metales nobles como el platino, la plata y el oro son los más utilizados en diferentes aplicaciones biomédicas como por ejemplo en terapia contra el cáncer, mejora de la radioterapia, administración de fármacos y estudios de diagnóstico, entre muchos otros [11]. Entre los metales mencionados, la plata y el oro destacan para su aplicación en biomedicina ya que presentan grandes ventajas frente al resto de materiales [12]. Como ejemplo, un estudio desarrollado por Dreaden *et al.* (2012) destacó el uso de nanopartículas de oro en el diagnóstico del cáncer y en bioimagen.

1.2.3 Las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) se distinguen por ofrecer una gran biocompatibilidad dado que su núcleo es químicamente inerte y generalmente presentan una baja toxicidad. Así mismo, destacan por tener una gran capacidad de absorción, además de ser fácilmente funcionalizables y por ofrecer un gran control de su tamaño y morfología [13].

Como consecuencia de todas estas ventajas, las nanopartículas de oro pueden ser empleadas en diferentes terapias, como por ejemplo la terapia fototérmica (PTT) y fotodinámica (PDT) para el tratamiento del cáncer.

La terapia fototérmica (PTT) se basa en la conversión de energía lumínica (normalmente proveniente de fuentes cercanas a la luz infrarroja) en calor, induciendo así la muerte celular por hipertermia [14]. El proceso consiste en irradiar AuNPs con luz IR, produciendo así la excitación de los electrones de su superficie; dado que éstos presentan una gran capacidad de absorción y el tiempo para una pérdida de energía coherente de los electrones excitados es corto, se produce un aumento localizado de la temperatura, dañando así las células cancerosas [15].

La terapia fotodinámica (PDT) es una tecnología médica donde se activan fármacos fotosensibles mediante una fuente de luz (láser, LED o lámpara) para generar daño oxidativo en células cancerosas. Para utilizar esta técnica con AuNPs, es necesario funcionalizar la superficie de las nanopartículas con agentes fotosensibilizadores (PS), los cuales deben ser capaces de generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) tras ser irradiados con luz UV-vis. El oxígeno singlete es una especie altamente reactiva; es un potente oxidante que puede inducir la muerte celular, siendo por tanto citotóxica. El mecanismo por el cual se forma $^1\text{O}_2$ consiste en un proceso de transferencia de energía desde el estado excitado del agente fotosensibilizante al oxígeno molecular presente en el tejido, el cual se encuentra en estado normal triplete ($^3\text{O}_2$), dando lugar así al oxígeno singlete [13].

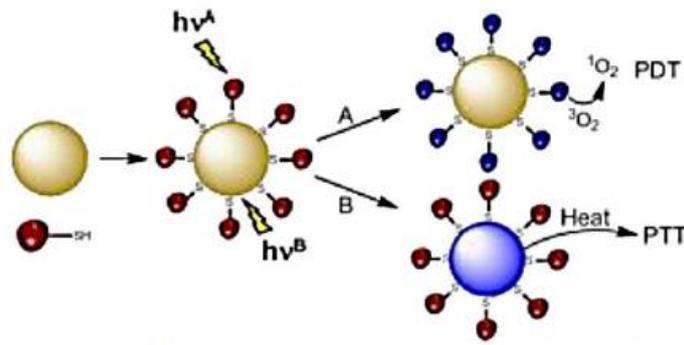


Figura 3. Proceso fotodinámico y fototérmico en nanopartículas de oro

Si bien los tejidos celulares presentan limitaciones en cuanto a la terapia PDT debido a que la luz visible no es capaz de penetrar en ellos profundamente, la luz infrarroja cercana al rango 800-1200 nm sí posee una transparencia corporal mucho mayor. Modificando la configuración de las nanopartículas de oro, se puede desplazar su banda de plasmón hacia la región del espectro infrarrojo, consiguiendo así alterar su eficiencia fototérmica y terapéutica [14].

Entre las múltiples configuraciones existentes de AuNPs, destacan los nanoshells, nanorods, nanostars y nanoesferas de entre el resto (ver Figura 4).

Las nanoshells de oro son nanopartículas cuya estructura consiste en un núcleo de sílica-gel dieléctrico envuelto por una fina capa externa de oro. Esta configuración destaca por su flexibilidad única como consecuencia de su fácil síntesis. Dicha flexibilidad les otorga una mejora de sus propiedades, consiguiendo así un aumento en su potencial de absorción y un incremento en la capacidad de carga del medicamento debido a su mayor superficie.

Los nanorods (NRs) de oro fueron sintetizados por primera vez por Wang *et al.* [14] para su uso en terapia fototérmica (PTT). En la actualidad, se encuentran entre las configuraciones de nanopartículas más utilizadas debido a que su peculiar forma les confiere unas propiedades fototérmicas muy sólidas en virtud de la presencia de la banda de plasmón tanto longitudinal como transversal.

Las nanostars de oro han ido ganando popularidad recientemente como consecuencia de su capacidad mejorada de absorción de luz en la región cercana a la infrarroja y por su baja toxicidad. Además, su peculiar estructura les confiere propiedades plasmónicas mejoradas en las puntas.

Las nanoesferas de oro forman parte de las primeras configuraciones de nanopartículas de oro que fueron objeto de estudio. Las nanoesferas destacan por su rápida y fácil síntesis, por su pequeño tamaño y por la facilidad que presentan para ser funcionalizadas, implicando así una elevada biocompatibilidad. Es por todo ello que este tipo de configuración de nanopartícula resulta altamente atractiva para ser utilizada en diferentes aplicaciones biomédicas.

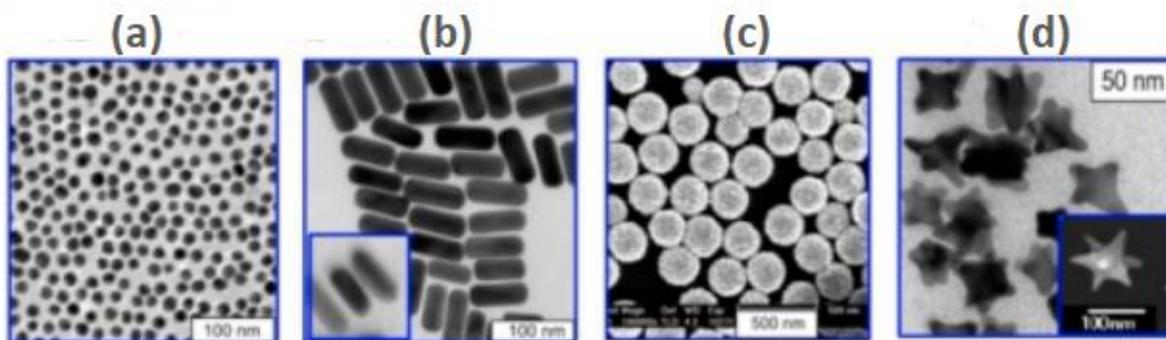


Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de (a) nanoesferas (b) nanorods (c) nanoshells y (d) nanostars de oro. Figura tomada de Khlebtsov et al. – *Theranostics “Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites”* (2013)

1.2.4 Métodos de síntesis de las nanopartículas de oro

En la historia, los coloides de oro han sido utilizados con fines médicos desde hace más de mil años. Asimismo, los coloides de oro también han sido usados con fines decorativos. En el Imperio Romano ya se encontraba la presencia de nanopartículas en copas y vasijas [16]. Para obtenerlas, se rompía el oro sólido mediante medios mecánicos hasta obtener el tamaño de partícula deseado. Actualmente, este mecanismo de síntesis es denominado “top-down” [17].

En el año 1856, Michael Faraday sintetizó una suspensión de nanopartículas de oro, la cual se conoce como uno de los primeros materiales producidos por el hombre del que se tiene conocimiento. En este experimento, Faraday consiguió obtener oro coloidal mediante la reducción de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) con fósforo blanco en una mezcla bifásica $\text{CS}_2\text{-H}_2\text{O}$ [18]. Este experimento dio nombre a las técnicas de síntesis “bottom-up”. Estas técnicas se basan en la nucleación del oro sobre estructuras más pequeñas mediante la reducción química, electroquímica o térmica [14].

Con el fin de desarrollar y mejorar este método de síntesis, en el año 1951 Turkevich introdujo el citrato como agente reductor y estabilizante. Para llevar a cabo la síntesis, era necesario llevar a ebullición el ácido cloroáurico y añadir el citrato bajo una agitación vigorosa. Con este método se llegaban a obtener nanopartículas con un diámetro aproximado de 20 nm. Más adelante, en 1973, Frens mejoró de nuevo el método pudiendo llegar a obtener nanopartículas de 15 a 150 nm. No obstante, fue en la década de los 90 cuando Brust y Schiffrin desarrollaron un método bifásico en el que empleaban bromuro de tetrabutilamonio (TOAB) en una disolución en tolueno y borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor. Con este método se consiguió obtener nanopartículas de diámetro 2-6 nm [19].

Actualmente, los esfuerzos en la síntesis de AuNPs están focalizados en el control del tamaño, estructura y propiedades de las nanopartículas [16]. Es por ello por lo que se deben tener en cuenta una serie de factores que afectan directamente a dichas características.

En primer lugar, se debe valorar la presencia de un agente estabilizante para prevenir la agregación [16]. Generalmente, en la actualidad, se utiliza el citrato únicamente como estabilizador, empleando borohidruro de sodio como reductor, de forma que la síntesis puede

llevarse a cabo a temperatura ambiente, permitiendo también un mayor control sobre la reacción.

La relación agente reductor/oro, así como la velocidad de adición del reductor, es otro factor que se debe considerar. Ambos afectan directamente al tamaño final que presentan las nanopartículas. Cuanto mayor sea la velocidad de adición del reductor, más favorecida se ve la nucleación y, por tanto, se obtienen nanopartículas esféricas más pequeñas y uniformes en su tamaño. En cambio, si la velocidad de adición es más lenta, la nucleación es menor y por tanto las nanopartículas presentan un diámetro mayor y una mayor distribución de tamaños. Generalmente, la formación de nanopartículas que presenten un tamaño uniforme se consigue mediante la combinación de una baja concentración de sal metálica junto a un agente reductor y un agente estabilizante que evite la agregación, incorporado durante la fase de crecimiento de la nanopartícula [16].

1.2.5 Funcionalización de las nanopartículas de oro

Con el fin de mejorar tanto las propiedades de las AuNPs como su estabilidad frente a la agregación, las nanopartículas pueden funcionalizarse con diferentes agentes, como por ejemplo polietilenglicol (PEG). Por otro lado, si la funcionalización se lleva a cabo con ligandos orgánicos, se consigue proporcionar múltiples puntos reactivos que pueden servir para el posterior enlace con moléculas de interés biológico [20], obteniéndose así NPs multifuncionalizadas.

Las nanopartículas funcionalizadas se definen como nanomateriales compuestos por dos o más nanocompuestos individuales [20]. Existe la posibilidad de funcionalizarlas tanto con ligandos inorgánicos como orgánicos, aunque la práctica más común es hacerlo con los segundos. Los ligandos orgánicos utilizados son además agentes estabilizantes de cadena alquílica larga que poseen grupos funcionales como tioles, fosfinas o aminas, siendo los tioles los que presentan mayor afinidad con las nanopartículas de oro [16]. Este hecho es consecuencia de la naturaleza de cada elemento, ya que este grupo funcional es una base débil y el oro un ácido débil, por tanto, presentan una elevada afinidad además de una quimisorción del grupo SH- muy selectiva y fuerte sobre la superficie del oro, similar a la de una unión covalente [21].

El método de Brust-Schiffrin es el más utilizado para funcionalizar nanopartículas, ya que se utiliza como agente estabilizante un compuesto que contenga un grupo tiol en su cadena, de forma que las nanopartículas se estabilizan y funcionalizan a la par [13]. Un ejemplo de ligando biopolimérico utilizado en este método es el polietilenglicol (HS-PEG-COOH). Al recubrir la nanopartícula de oro con este compuesto, se asegura una elevada biocompatibilidad, una baja tendencia a la agregación y la inexistencia de una respuesta biológica debido al carácter no inmunogénico del compuesto. El polietilenglicol también posee la habilidad de ser soluble tanto en disolución acuosa como orgánica [22], [23]. Por todo ello, y por su capacidad de ser inerte frente a ciertas moléculas biológicas, tales como las proteínas, el PEG es un ligando idóneo para ciertas aplicaciones biomédicas.

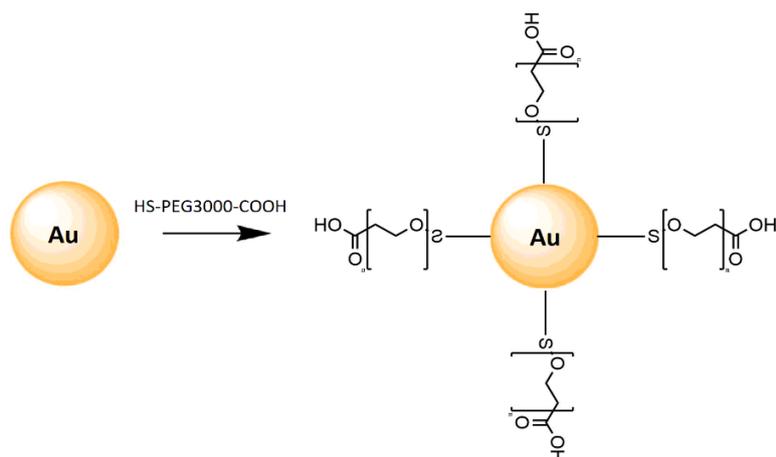


Figura 5. Representación de la funcionalización de una nanopartícula de oro con HS-PEG3000-COOH

1.2.6 Las proteínas y su interacción con los AINEs

Las proteínas son macromoléculas muy abundantes en los seres vivos que asumen múltiples funciones vitales gracias a su estructura heterogénea [24]. Pueden actuar como enzimas, anticuerpos, hormonas, receptores o como vehículos de transporte tanto de sustancias endógenas como exógenas [25]. En cuanto a su estructura, las proteínas pueden considerarse como polímeros lineales formados por aminoácidos que le confieren a la proteína una estructura tridimensional capaz de retener sustratos en su sitio activo para poder ejercer sus funciones biológicas [24].

Dentro de los diferentes tipos de proteínas, las más abundantes en el plasma sanguíneo son las proteínas transportadoras, entre las que conviene destacar las albúminas séricas (SAs). Su función principal se basa en el transporte de sustancias específicas (por ejemplo, fármacos) a través del torrente sanguíneo; también son las encargadas de llevar a cabo funciones como la regulación del pH en el plasma sanguíneo, la estabilización de la presión osmótica, etc. Estas proteínas son solubles en agua y poseen varios sitios de unión para moléculas orgánicas [26].

La albúmina sérica humana (HSA) y bovina (BSA) han sido muy utilizadas a nivel científico dado que presentan una menor inmunogenicidad y una mayor tolerancia en humanos que otras de la misma familia. Además, su bajo coste y su fácil obtención las convierte en idóneas para realizar estudios biomédicos. Ambas proteínas son muy similares en cuanto a estructura y propiedades ya que comparten un 76% de su secuencia de aminoácidos, siendo la principal diferencia entre ellas que la proteína HSA posee únicamente un residuo de triptófano (Trp) en su estructura, mientras que la BSA contiene dos (ver Figura 6) [26]. Dado que la estructura de las albúminas séricas es generalmente similar en todos los casos, en este trabajo también se han llevado a cabo estudios con albúmina sérica de rata (RatSA) y de conejo (RabSA).

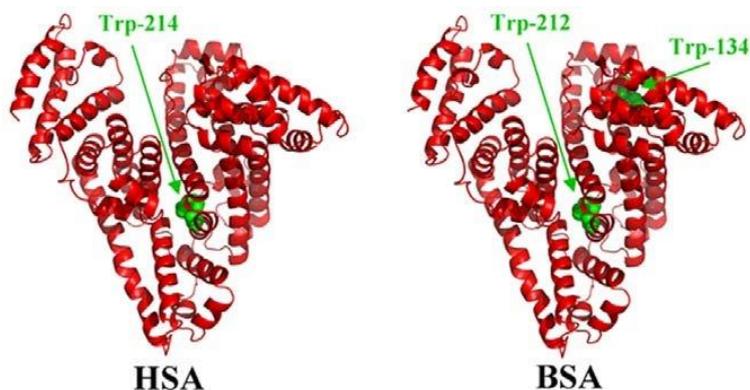


Figura 6. Estructura de HSA y BSA. En verde se indica la localización de los residuos de triptófano

Conviene destacar que las SAs son muy afines a la superficie de AuNPs, de forma que al unirse a ellas les confieren una mayor solubilidad en agua, estabilidad y compatibilidad biológica, permitiendo así que las nanopartículas puedan permanecer un mayor tiempo en la sangre. Del mismo modo, existe una gran variedad de fármacos que poseen una elevada afinidad por SAs, pudiéndose unir a la proteína en los diferentes sitios de unión, mejorando así su biocompatibilidad y eficiencia para su uso en diferentes terapias [26]. Particularmente, en HSA y BSA existen, según la clasificación realizada por Sudlow [27], dos sitios de unión preferentes para moléculas orgánicas pequeñas. El sitio I se sitúa en el subdominio IIA, y es donde se encuentra localizado el residuo de Trp en HSA. De entre los sustratos más afines a este sitio, están los ésteres de los ácidos 2-arilpropiónicos. Por el contrario, el sitio II se sitúa en el subdominio IIIA y presenta menor tamaño y flexibilidad que el sitio I. Los sustratos que presentan una mayor afinidad al sitio II se encuentran los AINES que pertenecen al grupo de los ácidos 2-arilpropiónicos [28].

Entre los fármacos más utilizados en la actualidad, se incluyen los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Estos son prescritos para el tratamiento de diversas patologías del aparato locomotor (artrosis, artritis reumatoide, etc.), así como para otras terapias (fiebre, cefaleas, traumatismos etc.) debido a su poder antiinflamatorio, analgésico y antipirético [13]. Además, numerosos ensayos realizados en los últimos años concluyen que algunos AINEs pueden ser utilizados para tratar distintos tipos de cáncer, como el de colon o de pulmón [29].

Aunque el mecanismo específico que contribuye a la actividad antitumoral sigue siendo desconocido, se le atribuye a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa COX-2 [29]. Por otro lado, algunos AINEs presentan la capacidad de generar oxígeno singlete por fotosensibilización, por lo que pueden ser utilizados en terapia fotodinámica (PDT) [13]. Como ejemplo de AINE capaz de generar $^1\text{O}_2$ se encuentra el flurbiprofeno, objeto de estudio en este trabajo.

El flurbiprofeno (FBP) es un AINE que forma parte de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Este posee un carbono quiral (*), hecho que implica la existencia de dos enantiómeros (*S*)- y (*R*)-FBP [27], siendo (*S*)-FBP quien presenta actividad farmacológica. El flurbiprofeno, así como su derivado éster metílico, es un compuesto que ha sido previamente estudiado y caracterizado por el grupo de investigación del Departamento de Química donde se ha desarrollado el TFG;

por ello, en este proyecto se ha propuesto trabajar con el flurbiprofeno etil éster (FBPet; ver Figura 7).

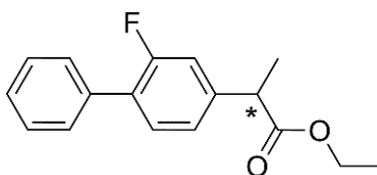


Figura 7. Estructura química de FBPet

Existen estudios previos que muestran el comportamiento fotofísico del FBP en presencia de HSA [30]. En la Figura 8A se muestra el espectro de absorción UV-vis del complejo (S)-FBP@HSA (línea roja) junto con el del fármaco y el de la proteína a la misma concentración. Como se puede observar, a 266 nm, que es la longitud de onda que se utilizó para los estudios de fluorescencia de los complejos (S)- y (R)-FBP@HSA, es la proteína quien absorbe mayor cantidad de luz (ca. 80%). En la Figura 8B se muestran los espectros de emisión de las distintas especies en disolución acuosa tras excitar a 266 nm. El fármaco (S)-FBP (línea negra) presenta su pico máximo de emisión sobre los 310 nm, mientras que HSA (línea verde) lo hace sobre los 340 nm. Conocida la emisión de ambas especies por separado, se puede calcular la emisión teórica de FBP en el interior de la proteína sin considerar las interacciones que pueda haber entre ellos en el estado excitado (línea roja oscuro). Sin embargo, el espectro de fluorescencia de (S)-FBP@HSA tras excitar a 266 nm (traza roja) es menor que el obtenido teóricamente. Este hecho se atribuyó a la existencia de un proceso de desactivación tanto del estado excitado singlete del flurbiprofeno como de la proteína. Se observó que este proceso es de naturaleza dinámica, y se atribuyó a un proceso de transferencia electrónica y/o de formación de excíplejos entre FBP y el residuo de Trp de la proteína. Además, se observó enantiodiferenciación, siendo el isómero (S)-FBP quien se desactivaba con mayor eficiencia [31].

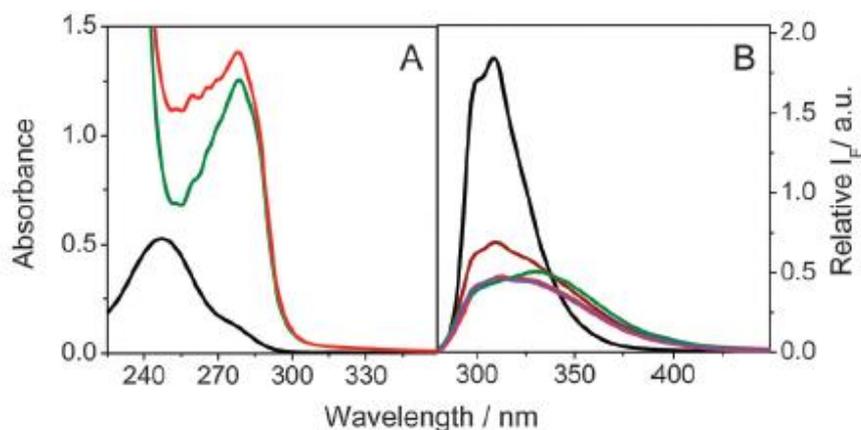


Figura 8. (A) Espectros de absorción de (S)-FBP (negro), HSA (verde) y complejo (S)-FBP@HSA (rojo) (B) Espectro de emisión en estado estacionario de (S)-FBP (negro), HSA (verde), (S)-FBP@HSA teórico (rojo oscuro) y (S)-FBP@HSA experimental (violeta). Imagen cogida de Phys. Chem. Chem. Phys., 2013, 15, 4727

1.2.7 Métodos de caracterización para las nanopartículas funcionalizadas

Con el fin de poder caracterizar morfológica y ópticamente las nanopartículas funcionalizadas, se recurre a la microscopía electrónica de transmisión (TEM), absorción de luz UV-Vis, emisión de fluorescencia tanto en estado estacionario como en tiempo resuelto y fotólisis de destello láser (FDL).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica de caracterización morfológica basada en el principio de transmisión de electrones de forma que permite obtener información sobre la estructura del nanomaterial. Para obtener las imágenes de las AuNPs, se hace pasar a través de una fina muestra un haz de electrones. Los electrones pueden ser o no dispersados, obteniéndose así el patrón de difracción de la muestra [32].

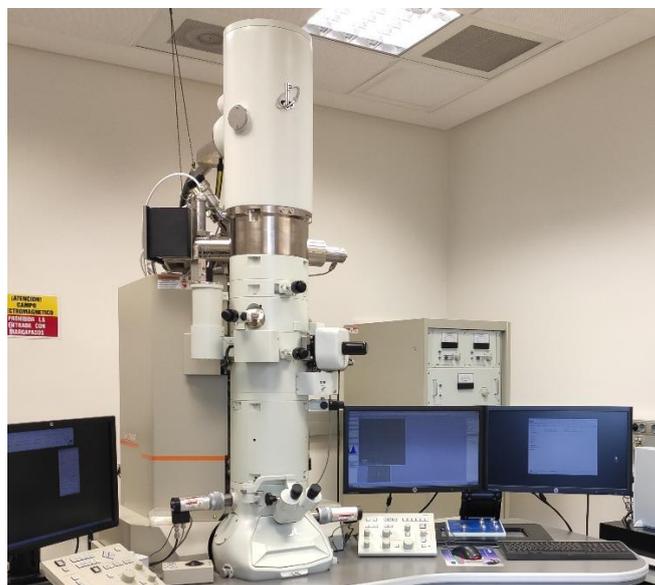


Figura 9. Fotografía del equipo TEM del Servicio de Microscopia de la UPV

Las técnicas de caracterización ópticas mencionadas son la espectroscopía de luz UV-vis y la emisión de fluorescencia de las nanopartículas. Ambos métodos aportan conocimientos sobre el mecanismo de los procesos fotoquímicos que se producen en ellas.

El espectrofotómetro de absorción de luz UV-vis se utiliza para cuantificar la absorción de luz cercana a las regiones ultravioleta y visible en una muestra. Para obtener el espectro de absorción, el equipo mide la intensidad de la luz antes y después de que ésta atraviese la muestra. Este procedimiento se realiza para cada valor de longitud de onda. A medida que se obtiene el espectro, el equipo lo corrige con la ayuda de un blanco de forma que el resultado final no tenga en cuenta su absorción.

Particularmente, las nanopartículas plasmónicas de oro tienen propiedades ópticas que son sensibles al índice de refracción cerca de la superficie de la NP, lo cual convierte a la espectroscopía UV-vis en una técnica muy valiosa tanto para caracterizar como para identificar estos nanomateriales [33].

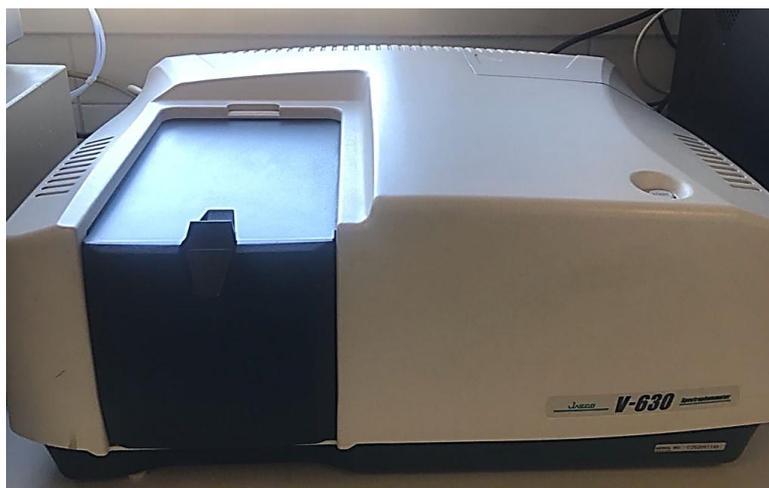


Figura 10. Fotografía del espectrofotómetro de absorción UV-vis utilizado durante el trabajo.

La espectrometría de fluorescencia es una técnica capaz de detectar la desactivación por fluorescencia de especies transitorias capaces de absorber radiación electromagnética y que se encuentran, generalmente, en su estado excitado singlete. Este método de caracterización puede utilizarse tanto en estado estacionario como en tiempo resuelto [13].

Un espectrofluorímetro está formado principalmente por cuatro partes [34]:

1. Fuente de radiación: genera el haz que incide sobre la muestra. Puede ser, por ejemplo, una lámpara de Xenón o un láser.
2. Monocromador de excitación: selecciona la longitud de onda correcta para excitar la muestra.
3. Monocromador de emisión: analiza las emisiones de fluorescencia producidas por la muestra.
4. Fotomultiplicador: recibe las ondas lumínicas y las cuantifica.



Figura 11. Fotografía del espectrofluorímetro de estado estacionario utilizado para la realización del trabajo.



Figura 12. Fotografía del espectrofluorímetro de resolución temporal utilizado en el trabajo.

La fotólisis de destello láser (FDL) es una técnica de absorción resulta en el tiempo donde se estudian las especies transitorias generadas al excitar la muestra con luz láser pulsada de elevada intensidad y corta duración, en este caso, microsegundos. Con esta técnica se pueden detectar especies en su estado excitado triplete, radicales, radicales aniones y cationes [13].

El equipo LFP está compuesto por las siguientes partes [27]:

1. Haz excitador: es el láser pulsado que incide sobre la muestra.

2. Haz analizador: es el detector. Emplea radiación Uv-vis y está compuesto por una lámpara de Xenón.
3. Sistema de detección: está formado por un monocromador, encargado de seleccionar la longitud de onda deseada; y por un fotomultiplicador, quien se ocupa de detectar la señal obtenida.
4. Sistema de análisis de la señal: permite cuantificar la señal de voltaje tiempo que ha sido detectada en el fotomultiplicador y la envía al ordenador.

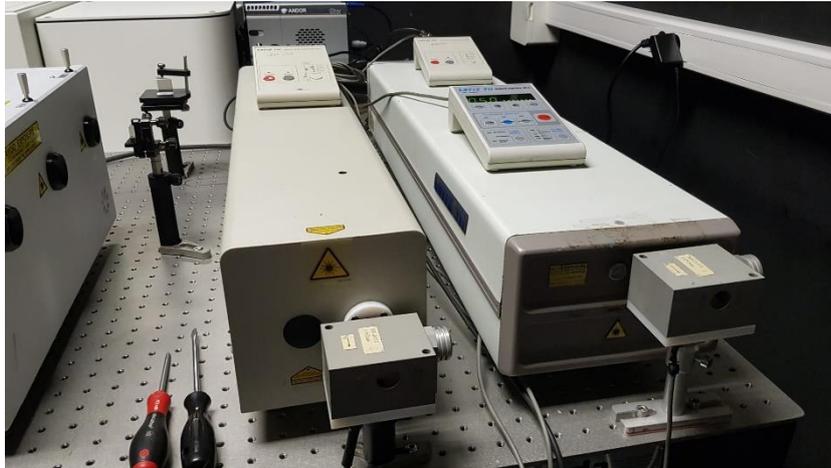


Figura 13. Fotografía de los equipos de fotólisis de destello láser del ITQ. En este trabajo se ha utilizado el láser de la derecha.

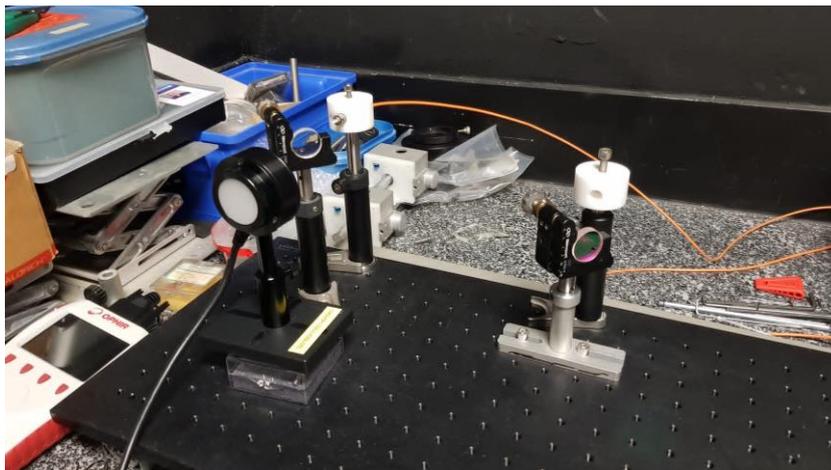


Figura 14. Fotografía del "trigger" y del espejo encargado de dirigir el haz de excitación hacia la muestra.

CAPÍTULO II. PROCEDIMIENTO **EXPERIMENTAL**

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis y caracterización fotofísica de las nanopartículas de oro

En este apartado se explica detalladamente el método seguido para sintetizar las nanopartículas de oro esféricas (AuNPs) con un tamaño de 2-4 nm de diámetro. Para ello se sigue un método similar al de Brust-Schiffrin, [19] donde la sal de oro (HAuCl_4) se reduce utilizando el borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de HS-PEG-COOH, que como se ha mencionado anteriormente, actúa como agente estabilizador impidiendo la agregación de las nanopartículas; además, también mejora la miscibilidad de las AuNPs en medio acuoso.

2.1.1 Síntesis y funcionalización de las AuNPs

Para llevar a cabo la síntesis y funcionalización de las AuNPs con HS-PEG-COOH se sigue el método de Brust-Schiffrin, utilizando la dimetilformamida (DMF) como disolvente. La cantidad de los diferentes reactivos empleados se muestra en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Reactivos utilizados para sintetizar y funcionalizar las AuNPs

Reactivos	PM (g/mol)	mol	Masa (mg)
HAuCl_4	393.83	$3.047 \cdot 10^{-6}$	2.4
HS-PEG-COOH	3145	$3.656 \cdot 10^{-6}$	22.996
NaBH_4	37.83	$1.057 \cdot 10^{-5}$	0.8

En primer lugar, se preparan las disoluciones de cada uno de los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción. Para ello, se disuelve por separado 2.4 mg de HAuCl_4 en 3 mL de agua ultra pura (milliQ), 23 mg de HS-PEG-COOH en 3 mL de agua milliQ y 0.8 mg de NaBH_4 en 0.5 mL de agua milliQ. A continuación, se añade la disolución de sal de oro sobre 3 mL de DMF. Tras ello, se agita la disolución a 180 rpm durante cinco minutos. Transcurrido este tiempo, se añade la disolución de HS-PEG-COOH y se deja en agitación (180 rpm) durante cinco minutos con el fin de homogenizar la mezcla en disolución. Seguidamente, y en agitación vigorosa (1200 rpm), se añade rápidamente la disolución que contiene el agente reductor NaBH_4 . De forma instantánea, se observa que la disolución pasa de un color amarillento a marrón oscuro, lo cual indica que la sal de oro se ha reducido formando nanopartículas esféricas de pequeño tamaño (~ 2-4 nm). Por el contrario, si la disolución adquiriese una tonalidad más rojiza, indicaría que las NPs obtenidas serían de mayor tamaño (ca. 10-15 nm).

Una vez obtenidas las nanopartículas, en cuya superficie se encuentran ancladas las moléculas de PEG, se elimina el disolvente por destilación a vacío haciendo uso de un rotavapor. La destilación se lleva a cabo bajo las condiciones de 20 mbar y 70 °C durante 30 minutos. Finalmente, se deben eliminar aquellos reactivos de la mezcla de reacción que se encuentran en exceso, como puede ser el PEG que no se ha anclado a la superficie de las NPs o el NaBH_4 restante que no haya reaccionado. Para ello, el residuo seco se redissuelve en agua milliQ (se usa el equipo de ultrasonidos para favorecer el proceso) y la disolución se traspasa a un filtro vivaspín de tamaño de poro 5 KDa, el cual se centrifuga y se lava repetidamente con agua milliQ a 7200 rpm y 10 °C durante 20 minutos. Se repite el lavado seis veces en las mismas condiciones.

2.1.2 Caracterización de las AuNPs

Tras obtener las nanopartículas funcionalizadas con PEG, se caracteriza la muestra morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión. También se estudian las propiedades ópticas de las AuNPs-PEG haciendo uso del espectrofotómetro de absorción de luz Uv-vis.

➤ Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite caracterizar la morfología de nanomateriales metálicos. Así pues, las nanopartículas de oro sintetizadas se han estudiado haciendo uso de la técnica TEM, comprobando que poseen forma esférica y que su diámetro varía entre 2-4 nm. En la *Figura 15* se observa una fotografía TEM de las AuNPs esféricas que se han sintetizado, las cuales difieren ligeramente unas de otras en cuanto al tamaño. En la imagen de la derecha se ha determinado el diámetro de una nanopartícula específica, cuyo valor es de 3.73 nm y que por tanto se sitúa dentro del rango deseado.

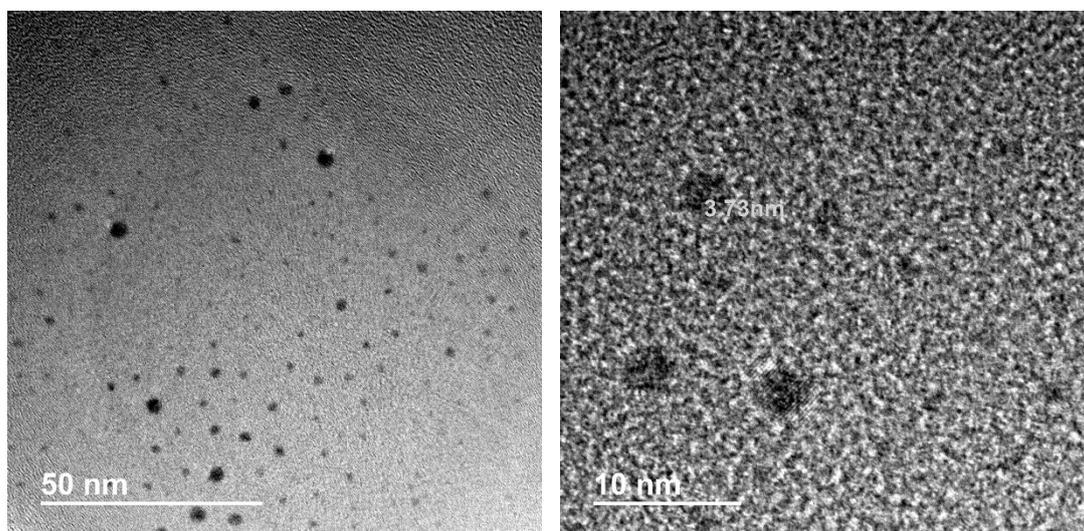


Figura 15. Imágenes TEM de AuNP-PEG3000 tomadas en el Servicio de Microscopía de la UPV

➤ Espectroscopía de absorción UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis se registran en el espectrofotómetro modelo V-630 de la marca JASCO. Este equipo ofrece un amplio rango de longitudes de onda, que comprende desde 190 nm a 1100 nm, pudiendo alcanzar una velocidad de escaneo de hasta 8000 nm/min a intervalos de hasta 0.2 nm. En este trabajo, las medidas se han realizado haciendo uso de una cubeta de cuarzo de $1 \times 0.4 \text{ cm}^2$ (paso de luz de 1 cm) en la que se ha introducido 1 mL de disolución de muestra, registrándose el espectro de absorción desde 800 nm hasta 220 nm, con una velocidad de barrido de 400nm/min a intervalos de 1 nm.

2.2. Funcionalización de las AuNPs con distintas proteínas

Finalizada la síntesis y funcionalización de AuNPs con HS-PEG-COOH, se procede a unir covalentemente diferentes proteínas a la superficie de la NP a través de las moléculas de PEG. Se han utilizado diferentes tipos de proteínas transportadoras, como son las albúminas séricas; entre ellas, se ha utilizado la albúmina sérica bovina (BSA), humana (HSA), de rata (RatSA) y de conejo (RabSA). En este apartado, se muestra detalladamente el proceso de funcionalización de las AuNPs-PEG con las diferentes proteínas, siguiendo el mismo protocolo para cada una de las proteínas.

Con el objetivo de unir covalentemente las proteínas a la superficie de las nanopartículas, es necesario activar el grupo carboxilo de la molécula de PEG. Para ello, se ha utilizado el reactivo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); éste se añade sobre la disolución de AuNPs-PEG y se deja agitar durante 10 min. A continuación, sobre la mezcla de reacción se añade una disolución de N-hidroxisuccinimida (NHS) en agua y se deja en agitación suave durante 1h. El motivo de añadir NHS es el de formar un intermedio (AuNPs-PEG-NHS) de reacción que sea más reactivo que el grupo carboxilo de la molécula de PEG. Pasado ese tiempo, la mezcla de reacción se centrifuga (7200 rpm y 10 °C durante 20 minutos) haciendo uso de un vivaspín con membrana PES de tamaño de poro de 5000 MWCO para eliminar el exceso de EDC y NHS que no haya reaccionado con HS-PEG-COOH. A continuación, se resuspende en agua milliQ, y sobre la mezcla de reacción se añade una disolución acuosa conteniendo la proteína (HSA, BSA, RatSA o RabSA), la cual se deja reaccionar durante toda la noche. De esta forma, la proteína reaccionará con el intermedio AuNPs-PEG-NHS, anclándose finalmente sobre la superficie de la nanopartícula para formar el derivado AuNPs-PEG-Proteína.

Para llevar a cabo la síntesis de los diferentes conjugados AuNPs-PEG-Proteína (conteniendo HSA, BSA, RatSA o RabSA) se han utilizado las cantidades de reactivo que vienen detalladas en la *Tabla 2*. Con el fin de intentar anclar la mayor cantidad de proteína sobre la superficie de AuNPs-PEG, se ha utilizado un exceso de EDC y NHS en relación con la cantidad de nanopartícula utilizada en la reacción. Asimismo, también se ha utilizado un exceso de disolución acuosa de proteína. Para los diferentes lavados que se llevaron a cabo con tal de eliminar el exceso de proteína que no reaccionó, se utilizaron filtros vivaspín de 100000 MWCO.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la funcionalización de las AuNPs con HSA, BSA, RatSA y RabSA

Reactivos	PM (g/mol)	mol	Masa (mg)	V (mL)
EDC	191.7	$7.32 \cdot 10^{-7}$	0.14	1
NHS	115	$8.784 \cdot 10^{-7}$	0.10	1
Proteína	67000	$3.66 \cdot 10^{-7}$	24.522	1

Tras finalizar el proceso de funcionalización, se estudian las muestras obtenidas mediante espectroscopía de absorción UV-vis con el fin de comprobar que la proteína se ha unido exitosamente a la superficie de la nanopartícula.

2.3 Preparación y estudio de la fotoreactividad de AuNPs-PEG-Proteína con FBPet

Las propiedades fotofísicas de las nanopartículas (AuNPs-PEG-Proteína) diseñadas con las diferentes proteínas HSA, BSA, RatSA y RabSA se estudian haciendo uso de técnicas espectroscópicas tales como UV-vis, fluorescencia y fotólisis de destello láser. Asimismo, también se estudia la fotoreactividad de estos sistemas cuando el fármaco FBPet interacciona con la proteína anclada a la nanopartícula. Adicionalmente, el fotocomportamiento de estos sistemas se comparará con el derivado de los complejos en disolución FBPet@proteína, para ver cómo puede verse afectada la fotoreactividad de estos en función del medio en el que se encuentren: disolución vs. AuNPs. Por otro lado, con el fin de observar si existe estereoselectividad en las interacciones FBPet@proteína, bien en disolución como anclado a la superficie de la nanopartícula, se utilizan los distintos enantiómeros (*S*)- y (*R*)-FBPet.

2.3.1 Síntesis del éster etílico del flurbiprofeno

En este apartado, se detalla el proceso de síntesis del éster etílico del flurbiprofeno (FBPet), tanto para el enantiómero (*S*)- como para el (*R*)-.

En primer lugar, se pesan 100 mg del enantiómero (*S*)-FBP y se disuelven en acetonitrilo (CH_3CN). Seguidamente, se deja la disolución a reflujo durante una hora con un exceso de cloruro de tionilo (SOCl_2). Pasado ese tiempo, se evapora el cloruro de tionilo y el acetonitrilo mediante destilación a vacío con un rotavapor. El crudo de reacción (aceite denso), se redissuelve en etanol y se deja agitando a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se vuelve a eliminar el disolvente mediante destilación a vacío. Finalmente, el crudo obtenido se purifica mediante cristalización, obteniendo un rendimiento de reacción prácticamente cuantitativo. Este proceso es análogo para la síntesis de (*R*)-FBPet. Las cantidades de reactivos utilizados se muestran en la *Tabla 3*.

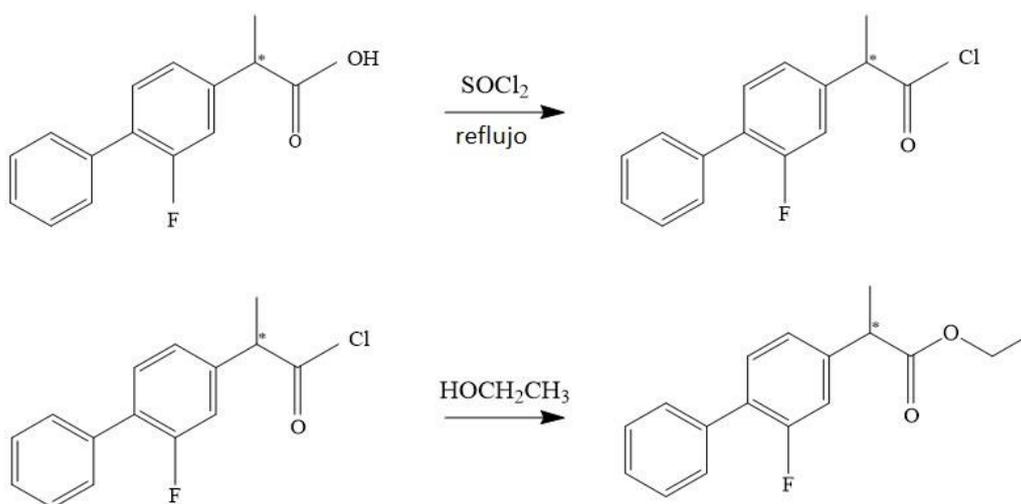


Figura 16. Esquema de síntesis de FBPet

Tabla 3. Reactivos utilizados para la síntesis del (S)- y (R)-FBPet

Reactivos	PM (g/mol)	mol	Masa (mg)
FBP	244.26	$4.1 \cdot 10^{-4}$	100
SOCl ₂	119	$1.23 \cdot 10^{-3}$	146

Los compuestos resultantes se analizan mediante resonancia magnética nuclear de protón ¹H utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente. Los espectros obtenidos correspondientes al (S)- y (R)-FBPet se muestran en las Figuras 17 y 18 respectivamente.

Espectro (S)-FBPet ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm, 7.56 – 7.54 (m, 2H), 7.46 – 7.34 (m, 4H), 7.18 – 7.13 (m, 2H), 4.18 (m, 2H), 3.75 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 1.54 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

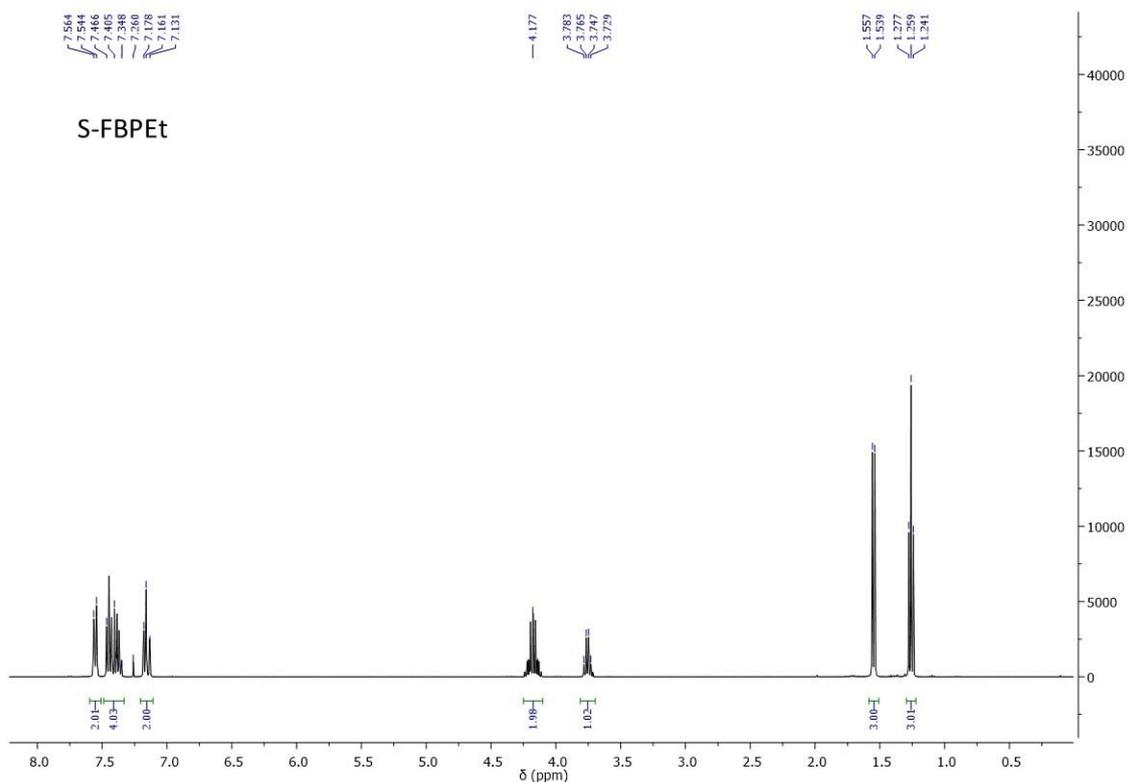


Figura 17. Espectro ¹H-RMN de (S)-FBPet

Espectro (R)-FBPet ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm, 7.57 – 7.55 (m, 2H), 7.47 – 7.35 (m, 4H), 7.19 – 7.13 (m, 2H), 4.18 (m, 2H), 3.76 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

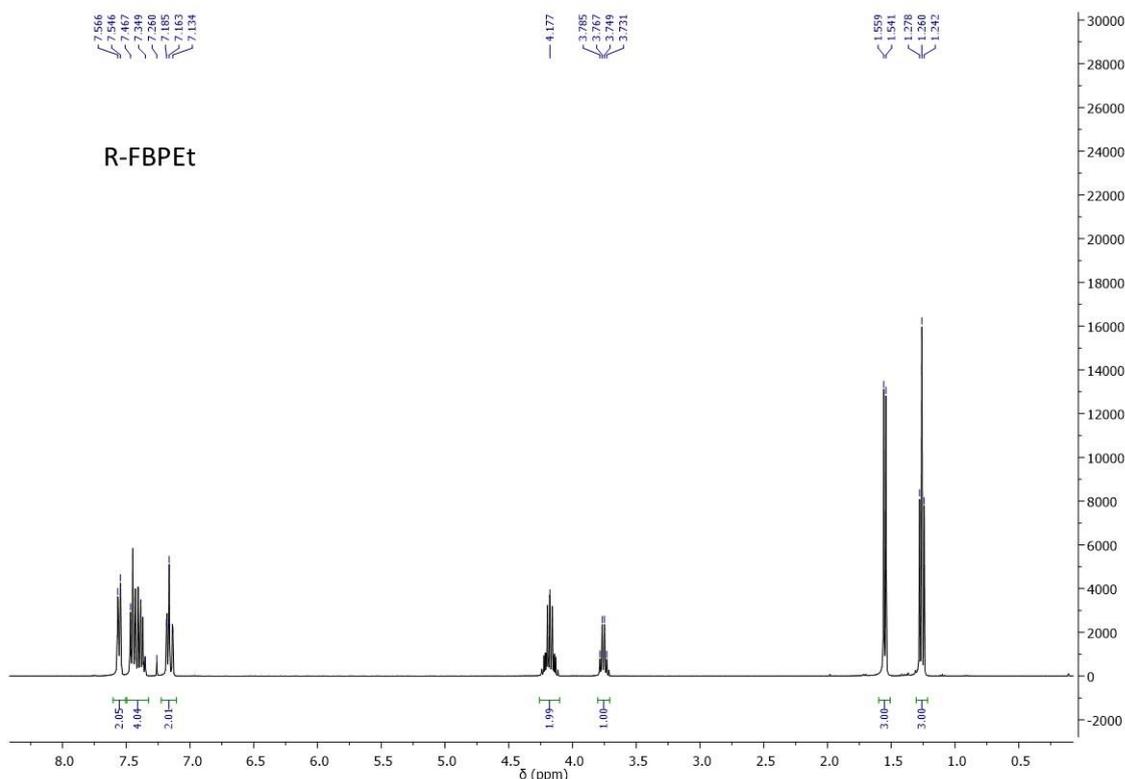


Figura 18. Espectro ^1H -RMN de (R)-FBPet

2.3.2 Preparación de las muestras

Para la preparación de las disoluciones con fármaco, tanto con nanopartícula (AuNPs-PEG-Proteína-FBPet) como en medio acuoso (Proteína-FBPet) con el fin de estudiar la emisión de fluorescencia, es necesario conocer la concentración de proteína que se encuentra anclada a las nanopartículas previamente funcionalizadas para poder añadir la misma concentración de FBPet. Para ello, en primer lugar, se ajustan todas las disoluciones preparadas de forma que la absorbancia a 400 nm sea igual a 0.05 puesto que en esta longitud de onda ni la proteína ni el fármaco absorben luz. En segundo lugar, se realiza una recta de calibrado midiendo la absorbancia de la proteína HSA en el máximo a diferentes concentraciones (ver Figura 19). El ajuste de la recta se muestra en la Ec.1. Finalmente, tras calcular la absorbancia de la proteína en su punto máximo de absorción ($\lambda_{\text{max}} \sim 275$ nm) y haciendo uso de la recta de calibrado, se determina la concentración de proteína presente en las disoluciones (ver Tabla 4). Se realiza el mismo procedimiento para todas las proteínas estudiadas.

$$y = 0.01577 + 0.03379 \quad (\text{Ec. 1})$$

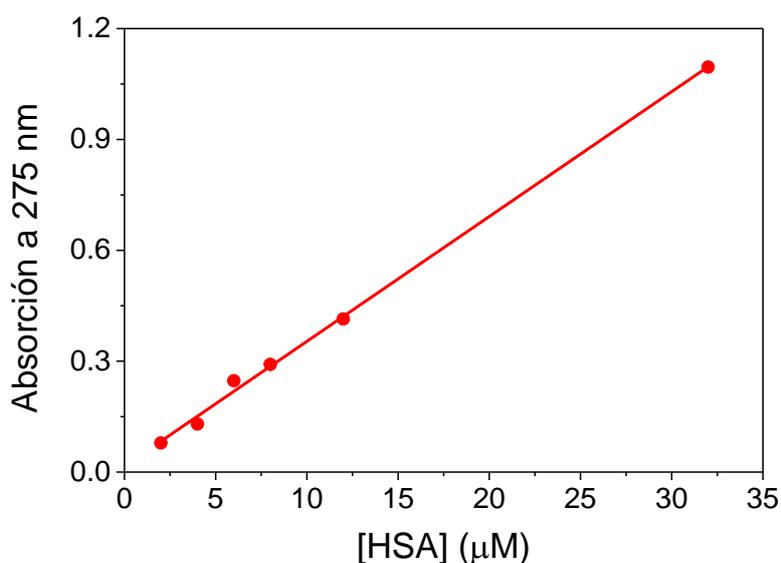


Figura 19. Variación de la absorción de HSA a 275 nm en medio acuoso frente a la concentración.

Tabla 4. Concentraciones de proteína presentes en las disoluciones

Proteínas	Concentración (μM)
BSA	5
HSA	4
RatSA	3
RabSA	5

Una vez conocida la concentración de proteína anclada a las AuNPs de cada muestra, se preparan las disoluciones de (S)- y (R)-FBPet. Para ello, se pesa 1 mg de cada reactivo y se disuelve en acetato de nitrilo de forma que se obtenga una disolución madre 2 mM diferenciada para cada enantiómero. Una vez preparadas las disoluciones del fármaco, se añaden los volúmenes correspondientes de cada uno de forma que la relación proteína-fármaco sea 1:1 en las muestras.

Cuando las disoluciones compuestas por el complejo proteína-fármaco anclado a AuNPs están listas, se preparan las disoluciones conteniendo el complejo FBPet@proteína sobre nanopartículas en disolución. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, se prepara una disolución madre de cada proteína a concentración 1.5 mM en medio acuoso. A continuación, sobre 3 mL de AuNPs-PEG3000 se añade el volumen correspondiente de disolución madre de proteína para que la concentración en la disolución sea de nuevo la mostrada en la *Tabla 4*. Se realiza de forma diferenciada para cada proteína. Finalmente, sobre las disoluciones preparadas se añaden los volúmenes correspondientes de (S)- y (R)-FBPet para que la relación FBPet@proteína sea equimolar.

Con el fin de comparar la fotoreactividad asociada al medio, se preparan las mismas disoluciones en medio acuoso (FBPet@proteína). Para ello se sigue el procedimiento anterior, esta vez sobre 3 mL de agua milliQ. De igual modo, para poder estudiar las diferencias causadas por la presencia del fármaco, se preparan una serie de muestras de las proteínas en medio acuoso.

Por último, con el propósito de estudiar las especies de absorción transitoria que pueden formarse al excitar FBPet, se deben preparar de nuevo todas las disoluciones mencionadas. El procedimiento a seguir y la concentración de las disoluciones para prepararlas son iguales que las descritas anteriormente. La única diferencia reside en que en este caso las disoluciones preparadas se ajustan inicialmente a una absorbancia de 0.4 a 266 nm.

2.3.3 Estudio fotofísico del complejo FBPet@proteína

Una vez preparadas las disoluciones, se estudia el fotocomportamiento de las muestras. Para ello se hace uso de la espectrofotometría de absorción Uv-vis, espectrofotometría de fluorescencia en estado estacionario y en tiempo resuelto y finalmente, fotólisis de destello láser.

➤ **Espectroscopía de absorción UV-Vis**

Se registran los espectros de absorción de todas las muestras preparadas anteriormente. Las disoluciones que contienen AuNPs-PEG3000 se miden desde 800 nm hasta 220 nm, con una velocidad de barrido de 400nm/min a intervalos de 1 nm. En cambio, los espectros de las muestras preparadas en medio acuoso se registran en el intervalo de 400 nm a 220 nm.

➤ **Fluorescencia en estado estacionario**

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se registran en el espectrofotómetro de fluorescencia modelo FP-8500 de la casa JASCO. Para ello, se excita a una longitud de onda de 265 nm en el intervalo de 275-550 nm con una velocidad de escaneo de 200 nm/min a intervalos de 1 nm.

Por otra parte, para registrar las cinéticas de fluorescencia, se hace uso de un fluorímetro modelo EasyLife de la marca HORIBA. Para ello se utiliza una lámpara de excitación de 265 nm y un filtro de WG295. Las medidas se tomaron desde 52 hasta 180 ns a una temperatura constante de 24 °C.

➤ **Fotólisis de destello láser (FDL)**

El equipo empleado para registrar las especies de absorción transitorias está compuesto por un láser de Nd-YAG que permite obtener longitudes de onda de excitación a 266, 355 o 532 nm. El sistema de detección consta de una lámpara de Xe, que actúa como haz analizador, de un monocromador y un fotomultiplicador. En este TFG, se han desarrollado experimentos de FDL excitando a una longitud de onda de 266 nm, monitorizándose tanto las cinéticas de desactivación como los espectros de absorción de las especies transitorias. Los espectros se registran desde 500 a 330 nm, mientras que las cinéticas de desactivación se registran a una longitud de onda de 380 nm.

2.4 Estudio de citotoxicidad con células SKBr-3

Para llevar a cabo el estudio de viabilidad celular, se cultivan células humanas de cáncer de mama SKBr-3 junto a los nutrientes necesarios para su crecimiento. Para ello, se descongelan las células en un baño termostático a 37 °C. A continuación, se diluyen en 9 mL de medio de

cultivo en un Eppendorf, y se centrifugan durante 5 minutos a 800 rpm y 21 °C. Tras centrifugarlas, se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 10 mL de medio de cultivo. A continuación, se traspasa a una placa de cultivo EasyFlasks de 25 cm³ y se dejan en incubación a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas. Una vez las células han crecido lo suficiente, se procede a contar las células para llevar a cabo el experimento de viabilidad celular. Para ello, se retira el medio del cultivo en el que se encuentran las células y a continuación se lava el frasco con PBS estéril con el fin de eliminar restos de medio de cultivo, así como aquellas células que se encuentren muertas.

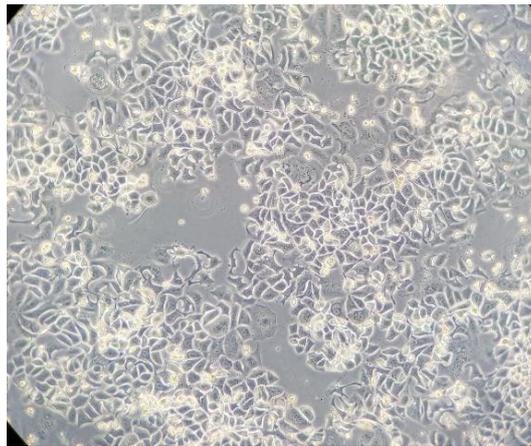


Figura 20. Imagen de las células SKBr-3 vivas vistas a través del microscopio

A continuación, se añaden 2 mL de tripsina 0.25 % con el fin de levantar las células vivas que se encuentran pegadas en el frasco; este se deja en la incubadora a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 5 minutos. Tras comprobar en el microscopio que las células se han despegado completamente del frasco, se añaden 8 mL de medio de cultivo para desactivar la tripsina. Se recoge todo el contenido en un tubo Falcon de 14 mL y se centrifuga durante 5 minutos a una velocidad de 800 rpm a 21 °C. El sobrenadante obtenido se retira y el pellet de células se resuspende con 4 mL medio de cultivo. A continuación, se procede a contar las células manualmente con la ayuda de una cámara de Neubauer, previamente limpiada y esterilizada con etanol. Para ello, se pipetea 20 µL del medio donde se encuentran las células y se depositan dentro del canal de la cámara de Neubauer. A continuación, se lleva la cámara al microscopio y se cuentan las células presentes en cada uno de los cuatro cuadrantes de ambos lados del hemocitómetro (ver *Figura 21*). El recuento obtenido se muestra en la *Tabla 5*.

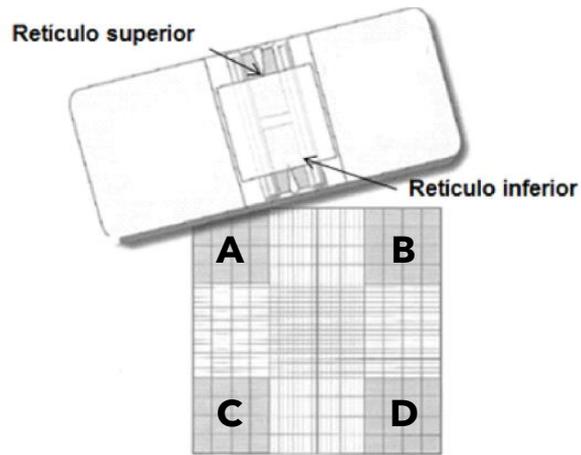


Figura 21. Cuadrantes de la cámara Neubauer para el conteo manual de células

Tabla 5. Recuento de células realizado manualmente en cámara Neubauer con la ayuda del microscopio

Cuadrante	Células
A	30
B	25
C	32
D	29
Promedio	29

Tras realizar el conteo, se obtiene que el número de células promedio es de 29. Este valor se multiplica por 10^4 ; así, el valor promedio de células que se ha obtenido es de 29×10^4 células/mL. Con este valor, se calcula el volumen de medio de cultivo que se debe añadir a las células para obtener una muestra de concentración $6 \cdot 10^4$ células/mL.

A continuación, se siembran las células en una placa de polipropileno de 96 pocillos Nunc™ Microwell™ y se incuban durante 48h en una atmósfera del 5% de CO_2 a 37 °C. Transcurridos estos dos días, se elimina el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta multicanal y se lava cada pocillo con 100 μ L de medio sin nutrientes. Seguidamente, se añaden 50 μ L de cada una de las muestras a analizar: el control positivo (estaurosporina), donde se favorece la muerte celular, el control negativo (medio de cultivo) donde las células deben permanecer vivas, así como las disoluciones de AuNP a estudiar a concentración 2 μ g/mL (ver Figura 22). El análisis de cada una de las muestras se realiza en seis pocillos distintos; esto es así para poder sacar un resultado promedio junto con la desviación típica para cada una de las muestras a analizar. Seguidamente, la placa se deja en incubación durante 3 horas en una atmósfera de CO_2 del 5% a 37 °C. Tras ello, se retiran la disolución de control positivo, negativo y de AuNP a analizar, y se lavan de nuevo los pocillos con 100 μ L de medio sin nutrientes. Finalmente, se añade en los pocillos 100 μ L de medio de cultivo con nutrientes y se deja en incubación 48 horas en una

atmósfera de CO₂ del 5% a 37 °C. Trascendido el tiempo, se añaden 20 µL de colorante azul CellTiterBlue a cada pocillo y se incuba durante tres horas en una atmósfera de CO₂ del 5% a 37 °C. A continuación, se mide la emisión a 590 nm de cada uno de los pocillos a una longitud de onda de excitación de 560 nm haciendo uso de un Lector Multilabel EnVision 2103. Los valores de emisión obtenidos se corrigen restando la emisión correspondiente al medio de cultivo. Por último, se calcula el porcentaje de viabilidad celular respecto a los controles positivo y negativo.

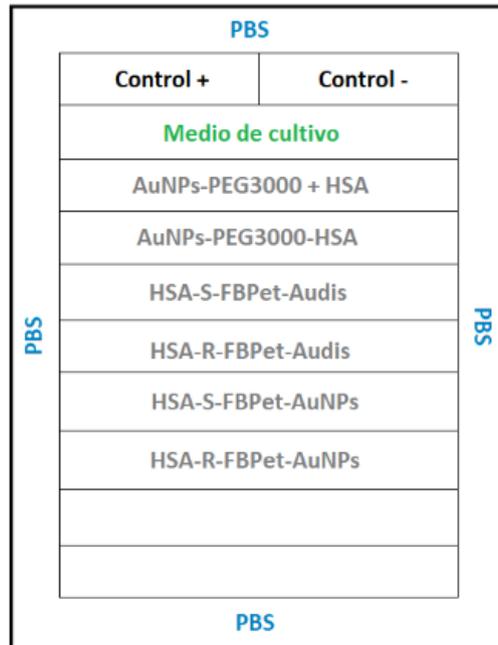


Figura 22. Esquema de la placa de 96 pocillos indicando las muestras utilizadas en el estudio

CAPÍTULO III. RESULTADOS **EXPERIMENTALES**

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1 Caracterización fotofísica de las AuNPs funcionalizadas con PEG3000

3.1.1 Espectroscopía de absorción UV-vis

En la *Figura 23* se presenta el espectro de absorción de las nanopartículas esféricas de oro funcionalizadas con PEG3000 (AuNPs-PEG3000). Como se puede observar, la absorbancia de las nanopartículas va aumentando progresivamente en la zona del espectro UVB y UVC. No obstante, en el espectro se observa la existencia de un pequeño hombro alrededor de 520 nm que corresponde a la banda de plasmón de AuNPs-PEG, que se forma como consecuencia de la oscilación de los electrones libres de las AuNPs al iluminarlos con un haz de luz. Dado que se trata de AuNPs cuya forma es esférica, se espera que presenten únicamente una banda de plasmón. Del mismo modo, dado que el diámetro de las nanopartículas sintetizadas es muy pequeño (2-4 nm), la resonancia de plasmón superficial es muy débil, presentándose en el espectro como una banda muy poco intensa.

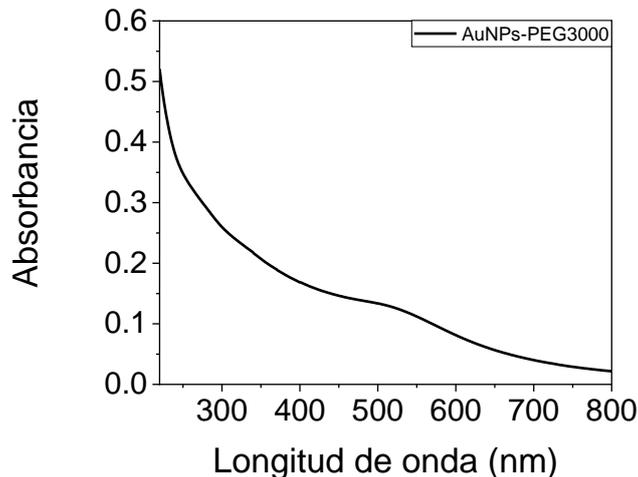


Figura 23. Espectro de absorción de AuNPs funcionalizadas con PEG3000.

3.2 Estudio fotofísico de las AuNPs funcionalizadas con distintas proteínas y FBPet

3.2.1 Espectroscopía de absorción UV-vis

En la *Figura 24* se muestra los espectros de absorción UV-vis de las nanopartículas de oro funcionalizadas con PEG3000 (AuNPs-PEG3000) junto con el de HSA en disolución acuosa (HSA-Agua) y el espectro de AuNP-PEG3000 con HSA anclada covalentemente a la molécula de PEG (AuNPs-PEG3000-HSA). Como se puede observar, la proteína presenta su valor máximo de absorción sobre los 275 nm. El hecho de anclar HSA a la molécula de PEG3000 no modifica el tamaño de la nanopartícula, ya que el espectro de AuNP-PEG3000-HSA coincide con el de AuNP-PEG3000 entre el rango de 800-400 nm; además, como se puede apreciar, la banda de plasmón (*ca.* 525 nm), que como se ha comentado anteriormente es un indicativo directo del tamaño de AuNP, no se ve afectada. Por otro lado, el máximo de absorción de la proteína no cambia por estar unida covalentemente a la superficie de la nanopartícula.

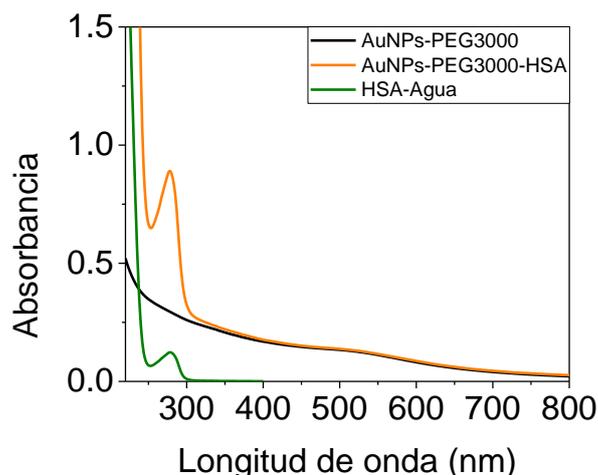


Figura 24. Espectro de absorción de AuNPs-PEG3000 (negro), HSA en medio acuoso (verde) y AuNPs-PEG3000-HSA (naranja).

Se ha seguido el mismo procedimiento para anclar otras proteínas transportadoras a la superficie de la nanopartícula por mediación de la molécula de PEG. En este sentido, se ha escogido BSA, RatSA y RabSA. De la misma forma que ocurría con HSA, el tamaño de AuNP-PEG300 no se ha visto afectado por el hecho de anclar covalentemente dichas proteínas a la nanopartícula. Adicionalmente, se ha estudiado el comportamiento fotofísico de todas estas nanopartículas en presencia de cantidades equimolares entre proteína y el fármaco (*S*)- y (*R*)-FBPet en medio acuoso. Para ello, y con el fin de conocer la concentración aproximada de proteína anclada a AuNP-PEG3000, se ha hecho uso de las rectas de calibrado que se han presentado anteriormente (ver punto 3.2).

A continuación, se presentan los espectros de absorción UV-vis de AuNP-PEG3000 funcionalizadas con las diferentes proteínas estudiadas (HSA, BSA, RatSA y RabSA) en presencia de (*S*)- y (*R*)-FBPet. Con el fin de investigar si el fotocomportamiento del complejo FBPet@proteína varía según el medio en el que se encuentre, se ha estudiado sus propiedades fotofísicas en disolución acuosa, en presencia de AuNP-PEG3000 y estando covalentemente unidos a la superficie de AuNP-PEG3000.

En la *Figura 25* se muestran los espectros de absorción UV-vis de (*S*)- y (*R*)-FBPet formando un complejo 1:1 con HSA en medio acuoso (HSA_FBPet_Agua), así como cuando se encuentra en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución (HSA_FBPet_Audis) y cuando está covalentemente anclado a la superficie de la nanopartícula (HSA_FBPet_AuNPs). A la izquierda se presentan los resultados obtenidos con el enantiómero (*S*)-FBPet y a la derecha los registrados con el derivado (*R*)-FBPet. Además, se ha incluido el espectro de absorción de la proteína en disolución acuosa como referencia.

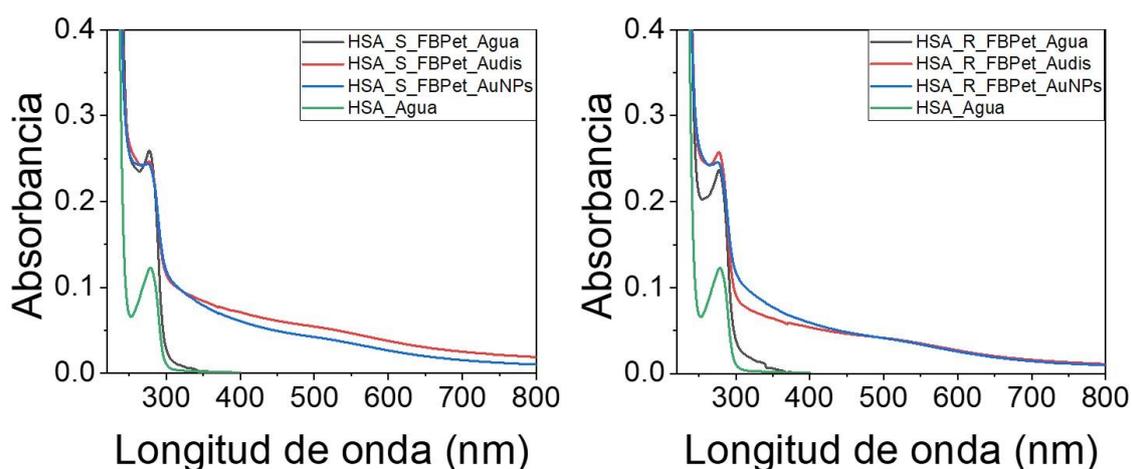


Figura 25. Espectros de absorción del complejo FBPet@HSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet. El espectro de HSA en disolución acuosa se muestra en verde.

Como se puede observar, y como ya se comentó en la introducción, HSA presenta un máximo de absorción sobre 275 nm, mientras que FBPet lo hace alrededor de 250 nm (ver Figura 8). Los espectros de absorción del complejo FBPet@HSA a una relación molar 1:1 son muy parecidos cuando está en presencia de una disolución acuosa de AuNP-PEG3000, formando la corona proteica (traza roja en Figura 25), o estando covalentemente unido a AuNP-PEG3000 (traza azul en Figura 25). Además, apenas se detectan diferencias entre los enantiómeros (S)- y (R)-FBPet en los distintos medios; por tanto, al margen de la formación del complejo FBPet@HSA, no existen interacciones significativas en el estado fundamental. Conviene mencionar que en el complejo FBPet@HSA 1:1, la proteína absorbe mayor cantidad de luz que FBPet; así, a 266 nm, HSA absorbe cerca del 80% de la luz, mientras que FBPet absorbe el 20% restante. Esto es importante tenerlo en cuenta para los resultados posteriores de fluorescencia. Este porcentaje de luz absorbida por la proteína o por FBPet se mantiene con el resto de proteínas estudiadas: BSA, RatSA y RabSA.

En la Figura 26, se muestran los espectros de absorción de los complejos en BSA en los diferentes medios de estudio para ambos enantiómeros (S)- y (R)-FBPet. Dado que la proteína utilizada también es una albúmina sérica, muy similar en estructura a HSA, los resultados son muy similares a los obtenidos con HSA. De nuevo, no se observan diferencias significativas en los espectros de absorción de los complejos (S)- y (R)-FBPet@BSA en presencia de AuNP-PEG3000 formando la corona proteica (traza roja) o estando covalentemente unido a AuNP-PEG3000 (traza azul). Además, tampoco se detecta estereodiferenciación en la interacción del enantiómero (S)- o (R)-FBPet en la nanopartícula. Lo mismo se ha detectado con la albúmina sérica de rata (ver Figura 27) y la de conejo (ver Figura 28). Sin embargo, conviene mencionar que en el caso de RatSA se detecta menos carga de proteína anclada a AuNP-PEG3000 en comparación con HSA, BSA y RabSA. En definitiva, los espectros UV-vis de los complejos (S)- y (R)-FBPet@proteína en presencia de AuNP-PEG3000 en corona proteica o anclado a la nanopartícula indican que no existen diferencias significativas entre los distintos enantiómeros.

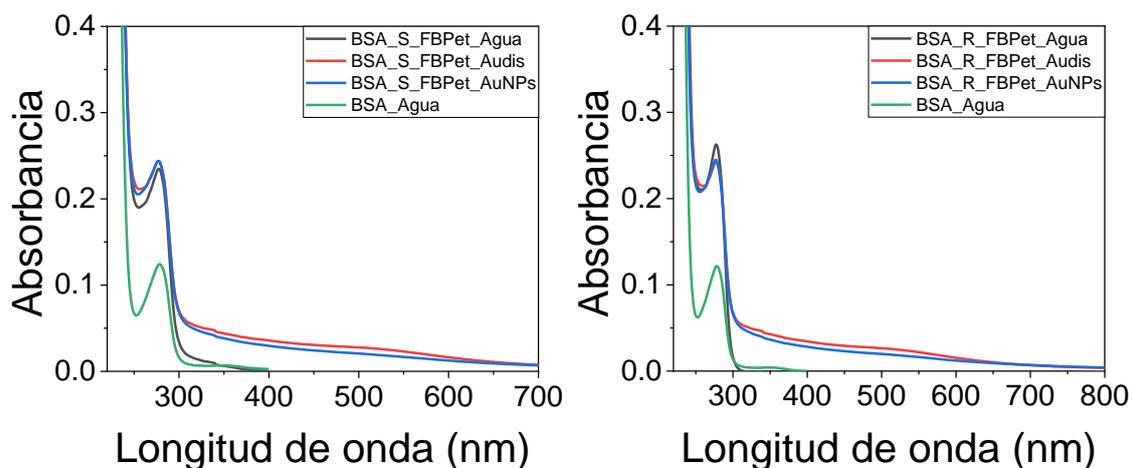


Figura 26. Espectros de absorción del complejo FBPet@BSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet. El espectro de BSA en disolución acuosa se muestra en verde.

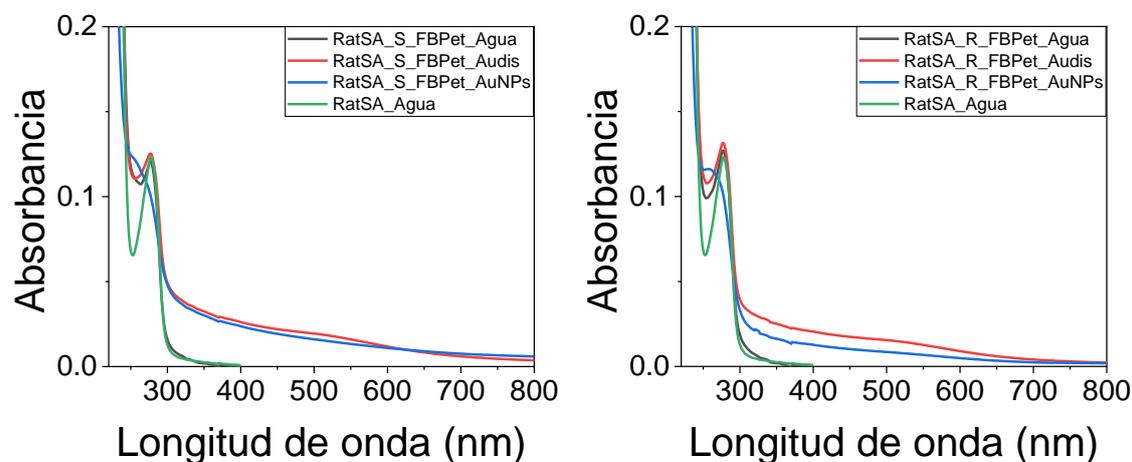


Figura 27. Espectros de absorción del complejo FBPet@RatSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet. El espectro de RatSA en disolución acuosa se muestra en verde.

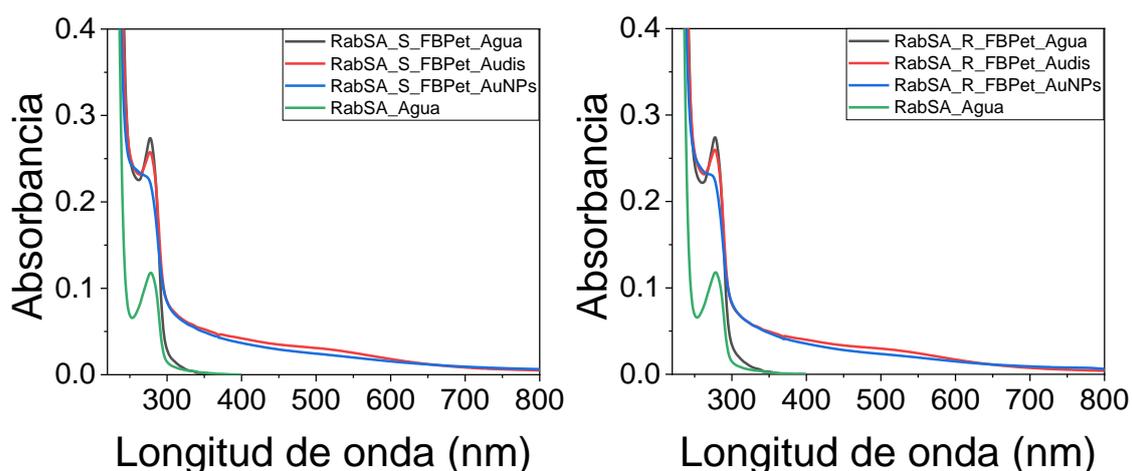


Figura 28. Espectros de absorción del complejo FBPet@RabSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet. El espectro de RabSA en disolución acuosa se muestra en verde.

3.2.2 Fluorescencia en estado estacionario

Conocidos los espectros de absorción UV-vis de los complejos en los diferentes medios, se procede a estudiar su fluorescencia. Para ello, se preparan disoluciones a la misma absorbancia en la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 265$ nm) conteniendo (S)- y (R)-FBPet en presencia de proteína (relación molar 1:1) en los diferentes medios: disolución acuosa, en presencia de AuNP-PEG3000 formado la corona proteica y anclada covalentemente a AuNP-PEG3000.

En la Figura 29 se muestran los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 265$ nm) de FBPet@HSA en los diferentes medios arriba mencionados. Tal y como se explicó en la introducción, la fluorescencia de HSA tiene una banda con un máximo centrado a 340 nm, mientras que el fármaco emite con un máximo centrado a 310 nm (ver Figura 8). Como se puede observar de la Figura 29, existe una diferencia importante en los espectros de emisión de (S)- y (R)-FBPet@HSA en función de si el complejo se encuentra en disolución acuosa (traza negra), en presencia de AuNP-PEG3000 (traza roja) o cuando la proteína está anclada covalentemente a la superficie de la nanopartícula (traza azul). Así, se observa mayor emisión de FBPet@HSA en disolución acuosa, siendo menor en presencia de AuNP y todavía mucho más baja cuando HSA está unida a AuNP. Es importante recordar que cuando se excita el complejo FBPet@HSA a 265 nm, aproximadamente un 80% de la luz la absorbe la proteína, mientras que el 20% restante lo absorbe FBPet. Los resultados obtenidos muestran que todos los espectros presentan un máximo sobre los 310 nm y una banda de emisión ancha que llega hasta los 475 nm, donde el FBPet no emite. Esto indica que FBPet contribuye bastante a la fluorescencia del complejo, pero también existe emisión importante por parte del residuo de Trp de HSA, ya que la emisión se extiende hasta los 475 nm. La menor emisión detectada en presencia de AuNPs en disolución y en la unión covalente del complejo con las nanopartículas puede ser indicativo de la existencia de un proceso de desactivación bien por formación de un complejo en el estado excitado que no emita, o bien porque tenga lugar un proceso de transferencia electrónica entre la nanopartícula metálica y el complejo FBPet@HSA. Finalmente, conviene destacar la existencia de pequeñas diferencias en cuanto al comportamiento del enantiómero (S)- y (R)-FBPet en los distintos medios. Así, el

isómero (*R*)- emite menos que el (*S*)- en el complejo en disolución acuosa, mientras que es algo mayor en presencia de AuNP-PEG3000 y anclado covalentemente.

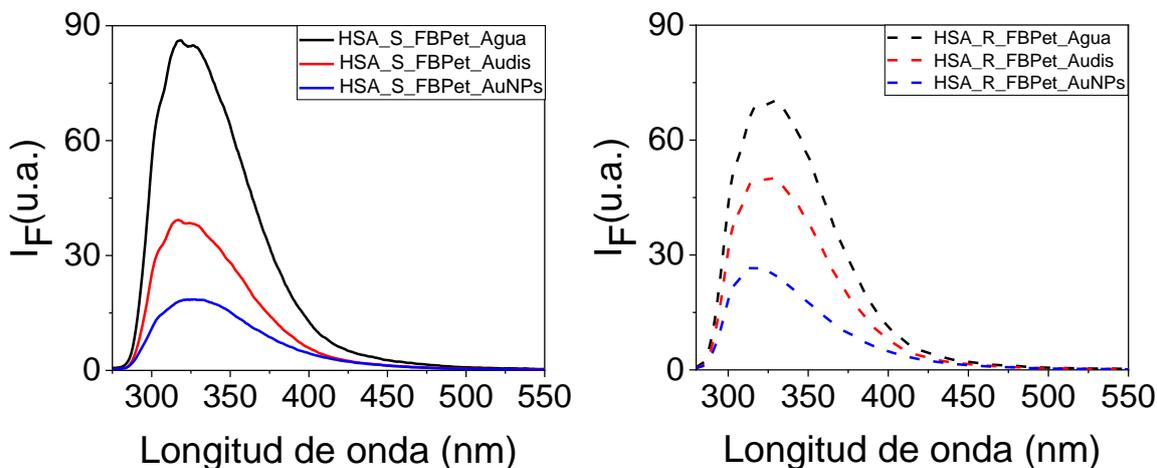


Figura 29. Espectros de emisión del complejo FBPet@HSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (*S*)-FBPet y a la derecha para (*R*)-FBPet.

Los resultados obtenidos con BSA se muestran en la *Figura 30*. En este caso, los máximos de emisión de FBPet@BSA en los diferentes medios están mayoritariamente centrados a 340 nm, donde la proteína presenta su mayor emisión. Adicionalmente, se observa un pequeño hombro sobre 310 nm, que se relaciona con la emisión de FBPet en el complejo, que en este caso tiene una contribución mucho menor que la observada para HSA. Esto puede deberse a una mayor desactivación del estado excitado singlete de FBPet ($^1\text{FBPet}^*$) al interaccionar con BSA, que puede derivar de un proceso de transferencia de energía de $^1\text{FBPet}^*$ a BSA, el cual parece ser más importante en BSA que en HSA. Este proceso se ha observado con anterioridad para el sistema FBP@HSA [30], y ocurre debido a que la energía de $^1\text{FBPet}^*$ es superior a la de $^1\text{Trp}^*$. De nuevo, se observan diferencias significativas en la emisión del fármaco en disolución acuosa, donde se observa una mayor fluorescencia de (*R*)-FBPet@BSA (traza negra discontinua en *Figura 30*) que la de su homólogo (*S*)- (traza negra continua en *Figura 30*). Sin embargo, estas diferencias parecen no existir cuando FBPet@BSA está en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución (trazas rojas) y unido covalentemente a la nanopartícula (trazas azules). Esto indica que en presencia de AuNP puede haber una desactivación de la emisión algo mayor para el enantiómero (*R*)- que para (*S*)-FBPet, ya que el primero emite más en disolución acuosa.

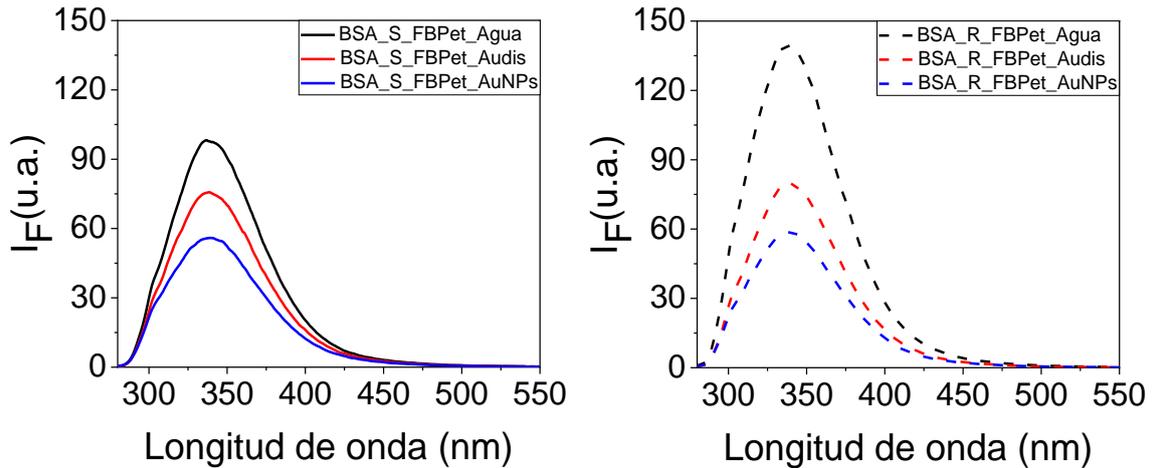


Figura 30. Espectros de emisión del complejo FBPet@BSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet.

Los resultados con RatSA y RabSA se muestran en las Figuras 31 y 32, respectivamente. En el caso de RatSA, se observa que existe contribución de FBPet y de RatSA en la emisión del complejo FBPet@RatSA en los diferentes medios. Sin embargo, existe una menor contribución de la emisión de la proteína cuando el complejo está covalentemente unido a AuNP (traza azul en Figura 31). En este caso, no se observan diferencias significativas en el fotocomportamiento de ambos enantiómeros (S)- y (R)-FBPet en los distintos medios.

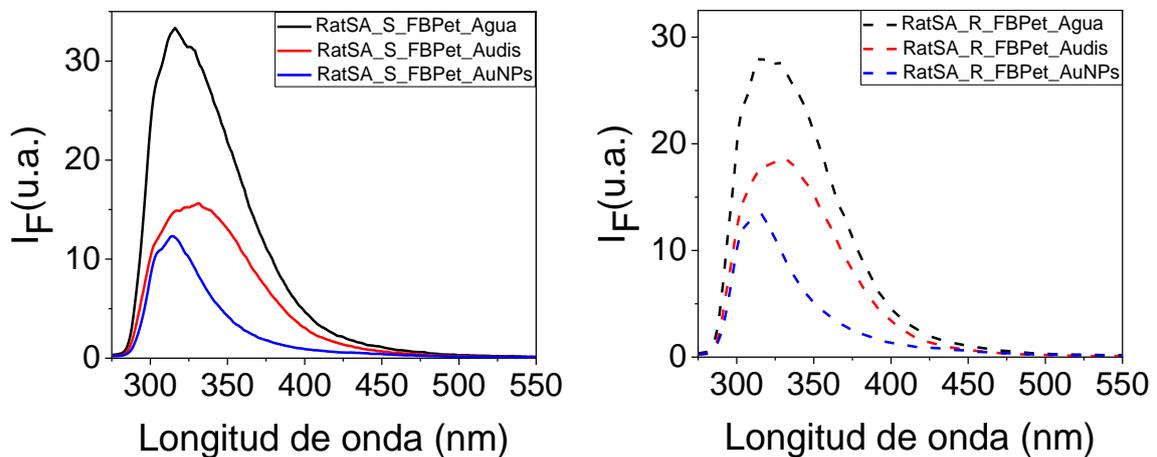


Figura 31. Espectros de emisión del complejo FBPet@RatSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet.

Finalmente, para RabSA se detecta contribución por parte de FBPet y de la proteína en la fluorescencia del complejo FBPet@RabSA, observándose mayor contribución por parte del fármaco que por parte de la proteína. De nuevo, apenas se detecta estereodiferenciación en el

fotocomportamiento de ambos enantiómeros. En general, se observan diferencias en la fluorescencia de los complejos FBPet@proteína en función de la proteína; además, los rendimientos cuánticos de emisión son menores en las dos últimas proteínas estudiadas, RatSA y RabSA.

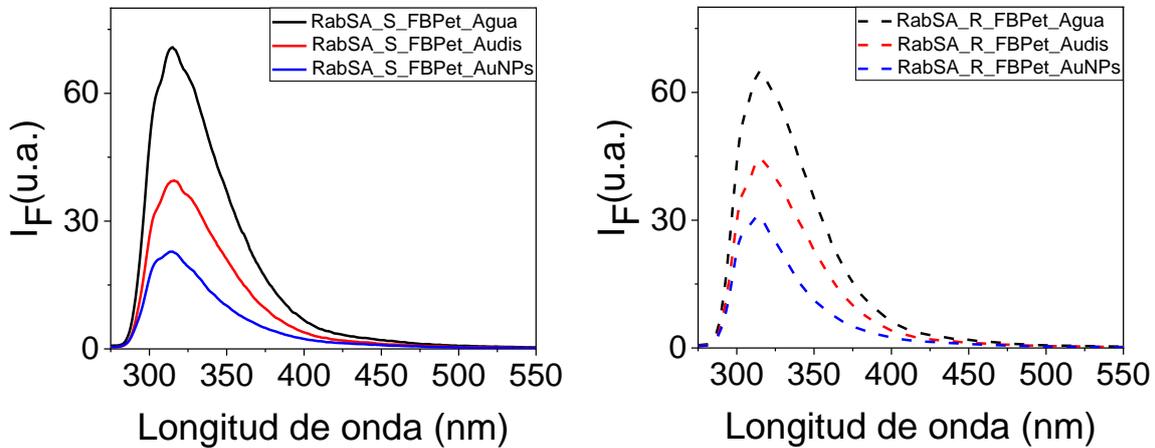


Figura 32. Espectros de emisión del complejo FBPet@RabSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); a la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet

3.2.3 Cinéticas de fluorescencia

A continuación, se muestran los resultados obtenidos respecto a las cinéticas de desactivación de la fluorescencia de los complejos (S)- y (R)-FBPet@proteína en los distintos medios tras excitar a 265 nm. La Figura 33 muestra las cinéticas de emisión de los complejos en presencia de HSA. Como se puede observar, el tiempo de vida de (S)- y (R)-FBPet@HSA en los diferentes medios, *i. e.* disolución acuosa (traza negra) y en presencia de AuNP (traza roja) es menor que el detectado para HSA en disolución (traza verde). Trabajos previos con FBP@HSA muestran resultados similares a los aquí obtenidos [30], donde se relacionó el menor tiempo de vida a una desactivación dinámica estereoselectiva debido a un proceso de transferencia electrónica y/o de formación de excíplejo. Así pues, la desactivación observada de la fluorescencia de los complejos tanto en disolución como en presencia de AuNP se puede relacionar de nuevo con un proceso de transferencia electrónica, que en este caso puede verse favorecido entre el complejo y el nanomaterial metálico. No se observan diferencias significativas en el comportamiento de los enantiómeros (S)- y (R)-FBPet en los distintos medios, hecho que podría deberse principalmente a la falta de resolución del equipo utilizado.

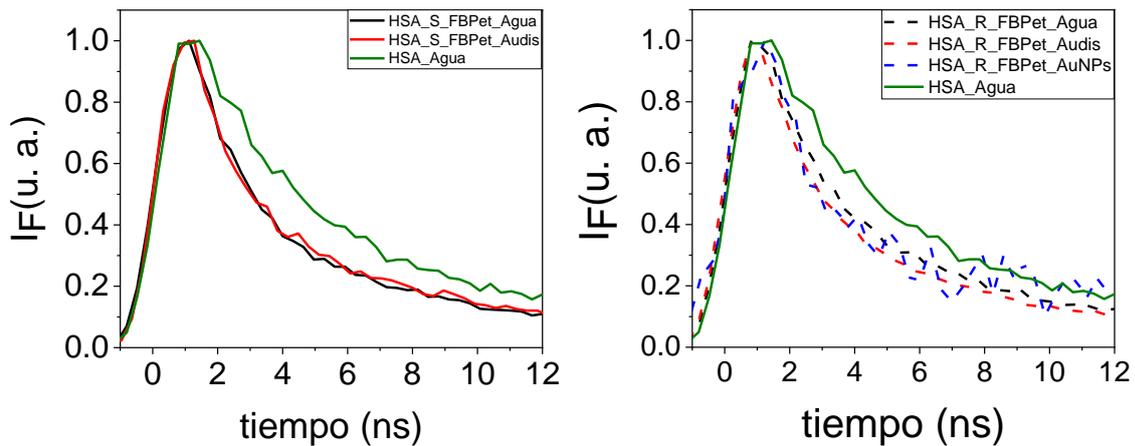


Figura 33. Cinéticas de fluorescencia del complejo FBPet@HSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); en verde se muestra la cinética de desactivación de HSA. A la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet

Para BSA se obtuvieron resultados muy similares (ver Figura 34). De nuevo, se observa la existencia de una desactivación no estereoselectiva de la fluorescencia de (S)- y (R)-FBPet@BSA en los distintos medios, la cual puede relacionarse nuevamente con un proceso de transferencia electrónica.

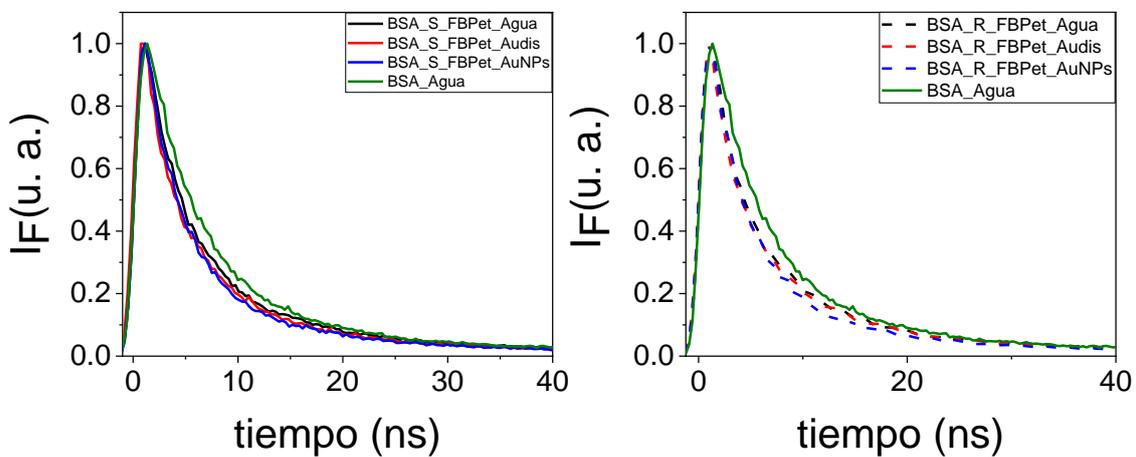


Figura 34. Cinéticas de fluorescencia del complejo FBPet@BSA 1:1 en medio acuoso (negro), en presencia de AuNP-PEG3000 (rojo) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (azul); en verde se muestra la cinética de desactivación de HSA. A la izquierda se muestran los resultados para (S)-FBPet y a la derecha para (R)-FBPet

Se obtuvieron también resultados muy similares para (S)- y (R)-FBPet en presencia de RatSA y RabSA. La Tabla 6 muestra los valores de los tiempos de vida medio para el complejo (S)- y (R)-FBPet@proteína en los diferentes medios.

Tabla 6. Valores de los tiempos medio de vida en nanosegundos para el complejo (S)- y (R)-FBPet@proteína

	HSA		BSA		RatSA		RabSA	
	(S)-FBPet	(R)-FBPet	(S)-FBPet	(R)-FBPet	(S)-FBPet	(R)-FBPet	(S)-FBPet	(R)-FBPet
Agua	1.8	1.9	2.4	2.5	1.6	1.7	1.1	1.3
Audis	1.77	1.6	1.8	2	1.7	1.9	1.6	1.3
AuNPs	-	1.8	2.4	2.2	0.7	1.2	1	1.1

Tabla 7. Valores de los tiempos medios de vida para las distintas proteínas en medio acuoso

	Tiempo (ns)
HSA	2.5
BSA	3.7
RatSA	2.1
RabSA	1.6

3.2.4 Fotólisis de destello láser (FDL)

En el siguiente apartado se presentan los espectros de absorción y las cinéticas de desactivación de las especies transitorias generadas tras excitar a 266 nm (12 mJ por pulso de láser) los complejos (S)- y (R)-FBPet@proteína en los distintos medios (en disolución acuosa, en presencia de AuNP-PEG3000 y con el complejo unido covalentemente a la superficie de AuNP). Para realizar estas medidas, se preparan disoluciones isoabsortivas a 266 nm (~0.4) de cada una de las muestras a estudiar. Como cabía esperar, tras excitar los sistemas FBPet@proteína, se detecta principalmente la absorción triplete-triplete de FBPet ($^3\text{FBPet}^*$), que presenta un máximo centrado en 380 nm [31]. Sin embargo, las cinéticas de desactivación a 380 nm varían en función del medio investigado.

En la *Figura 35*, se muestran los espectros de absorción de $^3[(\text{S})\text{-FBPet}]^*\text{@HSA}$ en disolución acuosa (HSA_FBPet_Agua), en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución (HSA_FBPet_Audis) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (HSA_FBPet_AuNPs). Como se puede apreciar, no existen diferencias significativas en la forma del espectro de $^3\text{FBPet}^*$ en los distintos medios, ya que en todos se detecta un máximo de absorción sobre los 380 nm. Para el isómero (R)- se observa un comportamiento muy similar (espectros no mostrados).

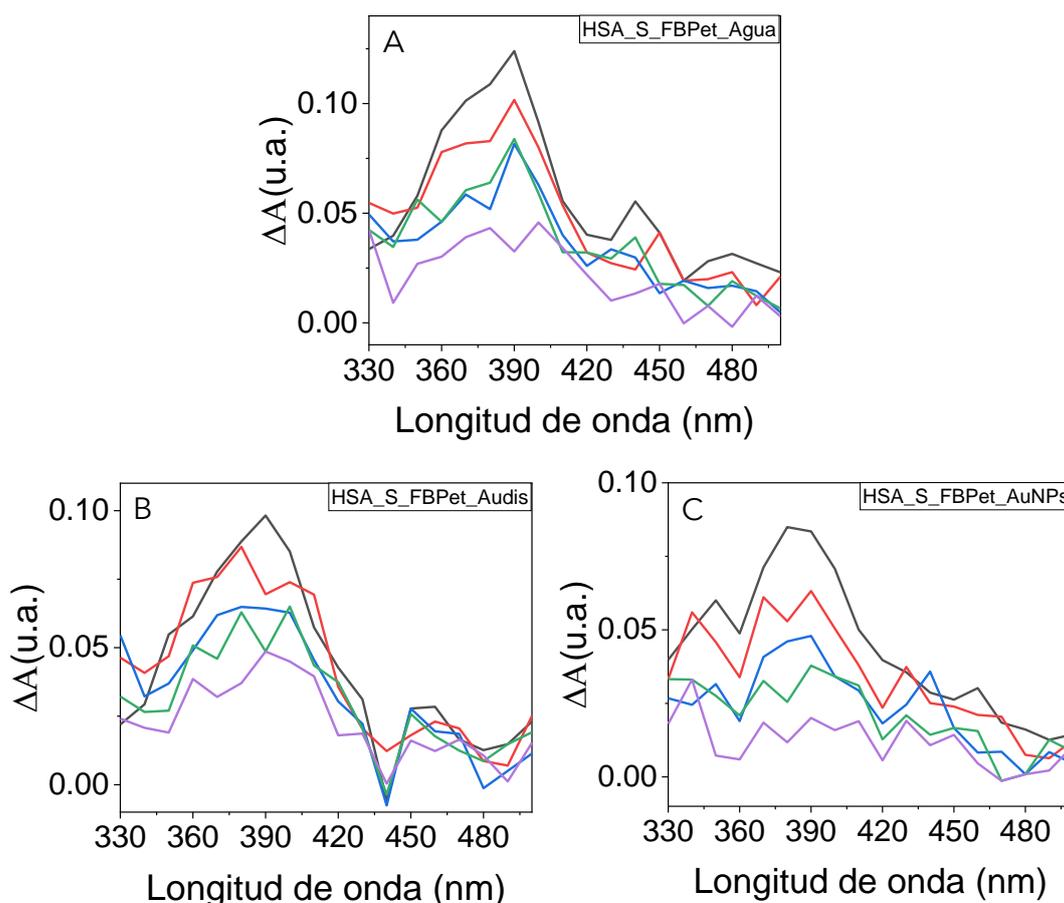


Figura 35. Espectros de fotólisis de destello láser de (S)-FBPet@HSA en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C), registrados 0.3 μ s (negro), 0.9 μ s (rojo) 1.8 μ s (azul), 2.5 μ s (verde) y 6.5 μ s (morado) tras el pulso del láser a $\lambda_{exc} = 266$ nm en condiciones aeróbicas.

En la Figura 36, se muestran las cinéticas de desactivación a 380 nm de $^3\text{FBPet}^*\text{@HSA}$ para ambos enantiómeros (S)- y (R)- en los distintos medios. Se detecta una clara disminución del tiempo de vida de triplete de FBPet en presencia de AuNP. Así, para FBPet@HSA en disolución (Figura 36A), la señal de triplete es insignificante a partir de 30 μ s; sin embargo, estos tiempos son mucho menores para FBPet@HSA en presencia de AuNP-PEG3000 (Figura 36B), con tiempos de $^3\text{FBPet}^*$ sobre los 3.8 μ s, y todavía menores para FBPet@HSA unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (Figura 36C), donde $^3\text{FBPet}^*$ se desactiva en apenas 1.5 μ s. Así pues, $^3\text{FBPet}^*$ sufre un proceso de desactivación mucho más importante cuando el complejo FBPet@HSA está covalentemente unido a la nanopartícula, hecho que podría deberse a una transferencia electrónica entre FBPet y la nanopartícula metálica. Dicho proceso pasa a ser algo menos eficiente cuando el complejo no se encuentra anclado covalentemente a la nanopartícula. No se observa enantiodiferenciación en los tiempos de vida de $^3\text{FBPet}^*$ para (S)- y (R)-FBPet en los distintos ambientes.

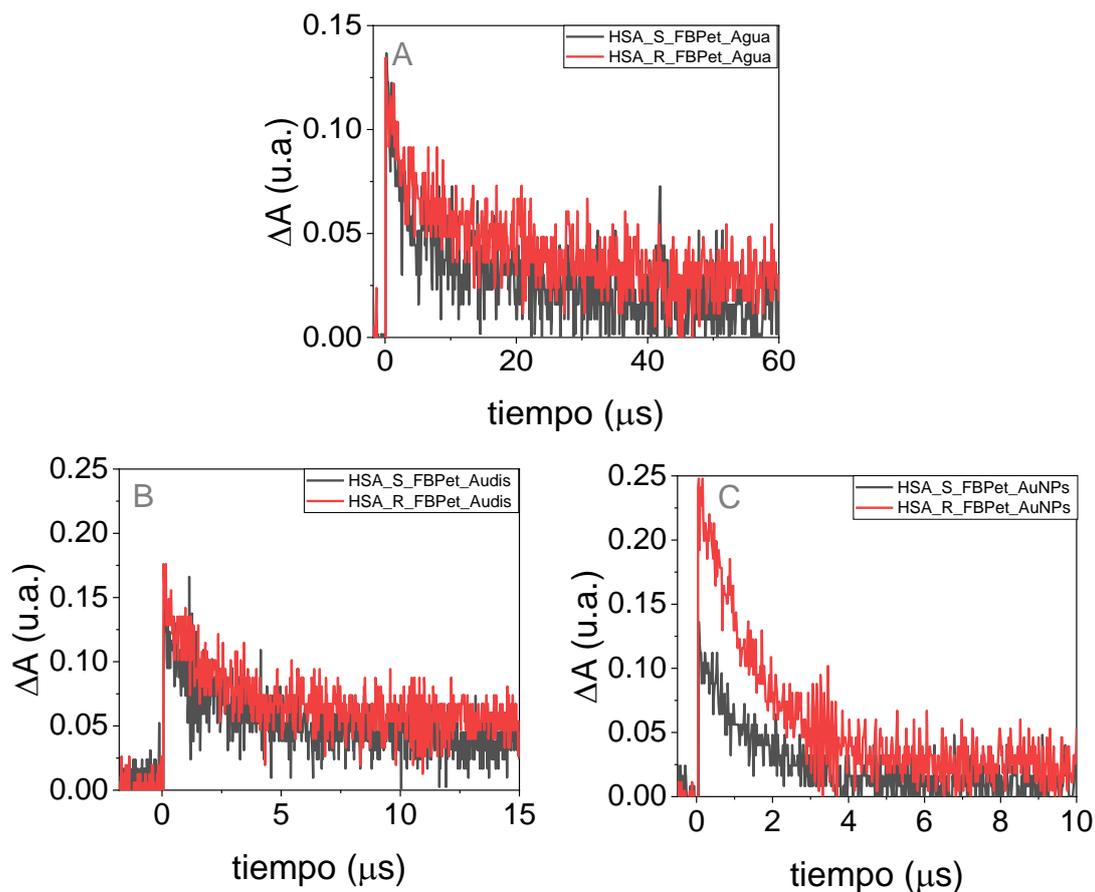


Figura 36. Cinéticas de desactivación de (S)- y (R)-FBPet@HSA (negro y rojo, respectivamente) en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C) registrados a 380 nm por FDL tras excitar a 266 nm en condiciones aeróbicas.

Al igual que ocurría en HSA, la excitación por FDL a 266 nm de los complejos FBPet@BSA en los distintos ambientes da lugar a la formación del primer estado triplete de FBPet, cuya banda de absorción presenta su máximo *ca.* 380 nm. La *Figura 37* muestra los espectros de absorción de (S)-FBPet@BSA en disolución acuosa, en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución y unido covalentemente a AuNP-PEG3000. De nuevo, el enantiómero (R)- muestra un comportamiento muy similar a su homólogo (S)- (espectros no mostrados).

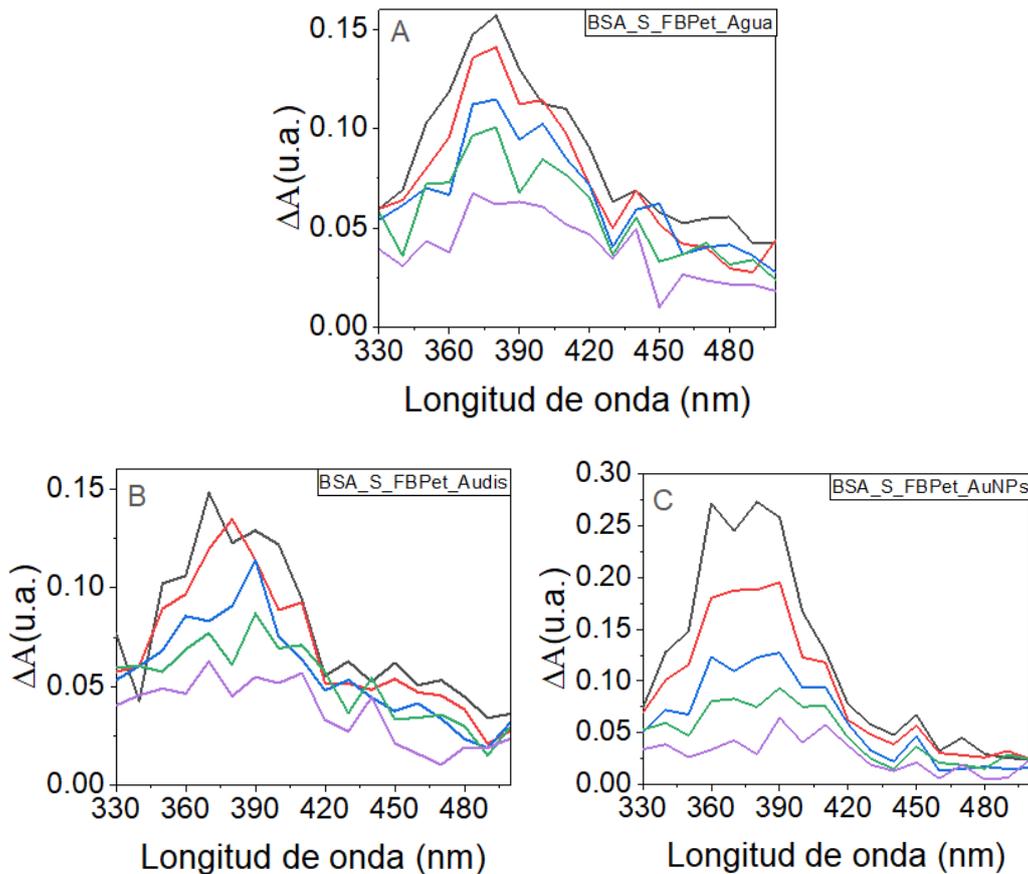


Figura 37. Espectros de FDL de (S)-FBPet@BSA en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C), registrados $0.3 \mu\text{s}$ (negro), $0.9 \mu\text{s}$ (rojo) $1.8 \mu\text{s}$ (azul), $2.5 \mu\text{s}$ (verde) y $6.5 \mu\text{s}$ (morado) tras el pulso del láser a $\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$ en condiciones aeróbicas

Las cinéticas de desactivación de $^3\text{FBPet}^*\text{@BSA}$ en los distintos medios se muestran en la Figura 38. Las cinéticas de $^3\text{FBPet}^*\text{@BSA}$ en disolución acuosa (Figura 38A) se ajustan bien con una función biexponencial; esto puede deberse a la presencia de FBPet en disolución acuosa, cuyo tiempo de vida es corto, mientras que la componente más larga, con un tiempo de vida de unos $20 \mu\text{s}$, corresponderá a FBPet unido a BSA [27]. Por el contrario, en las mismas condiciones de concentración de FBPet, parece que éste interacciona mejor con BSA en presencia de nanopartícula (ver Figuras 38B y 38C), ya que se registran cinéticas de desactivación que se ajustan bien a una función monoexponencial. Sorprendentemente, el tiempo de vida de $^3\text{FBPet}^*\text{@BSA}$ en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución parece que se desactiva de forma muy similar a cuando está en medio acuoso, ya que desaparece con un tiempo de vida de unos $20 \mu\text{s}$ (muy similar al tiempo de vida de la componente larga de $^3\text{FBPet}^*\text{@BSA}$ en disolución acuosa). Sin embargo, y al igual que ocurría con HSA, $^3\text{FBPet}^*\text{@BSA}$ unido covalentemente a AuNP-PEG3000 sufre una fuerte desactivación ya que su tiempo de vida es de unos $1.5 \mu\text{s}$. De nuevo, esta desactivación puede deberse a un proceso de transferencia electrónica entre $^3\text{FBPet}^*$ y la nanopartícula metálica. No se observa enantiodiferenciación en ninguno de los procesos estudiados.

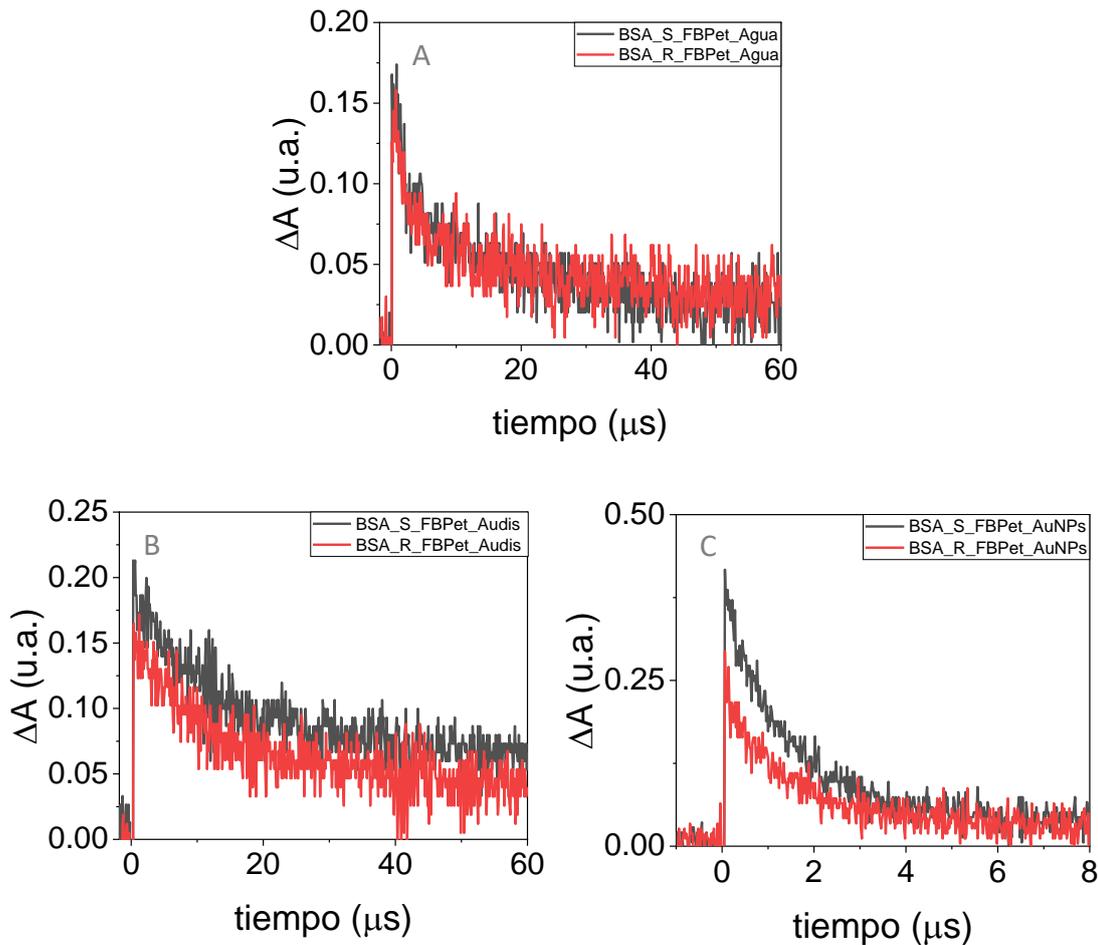


Figura 38. Cinéticas de desactivación de (S)- y (R)-FBPet@BSA (negro y rojo, respectivamente) en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C) registrados a 380 nm por FDL tras excitar a 266 nm en condiciones aeróbicas.

Finalmente, para las proteínas RatSA y RabSA se han obtenido resultados similares en cuanto a los espectros de absorción triplete-triplete del FBPet en los distintos medios (espectros no mostrados), pero presentan pequeñas diferencias en cuanto a las cinéticas de desactivación a 380nm. Las Figuras 39 y 40 muestran las cinéticas de desactivación de (S)- y (R)-FBPet@RatSA y de (S)- y (R)-FBPet@RabSA en los distintos medios tras excitar a 266 nm. Para el caso de RatSA, parece que existen pequeñas diferencias en cuanto a las cinéticas de los complejos en medio acuoso (Figura 39A) y en presencia de AuNP-PEG3000 en disolución (Figura 39B). Como se ha observado en las proteínas anteriores, en especial en HSA, existe un proceso de desactivación de ³FBPet*@RatSA en presencia de AuNP, tanto en disolución como anclado covalentemente, ya que los tiempos de vida de triplete son menores (ca. 5 y 1.6 μs, respectivamente) en comparación al complejo en disolución acuosa, que muestra tiempos de 12 y 15 μs para los enantiómeros (S)- y (R)-, respectivamente.

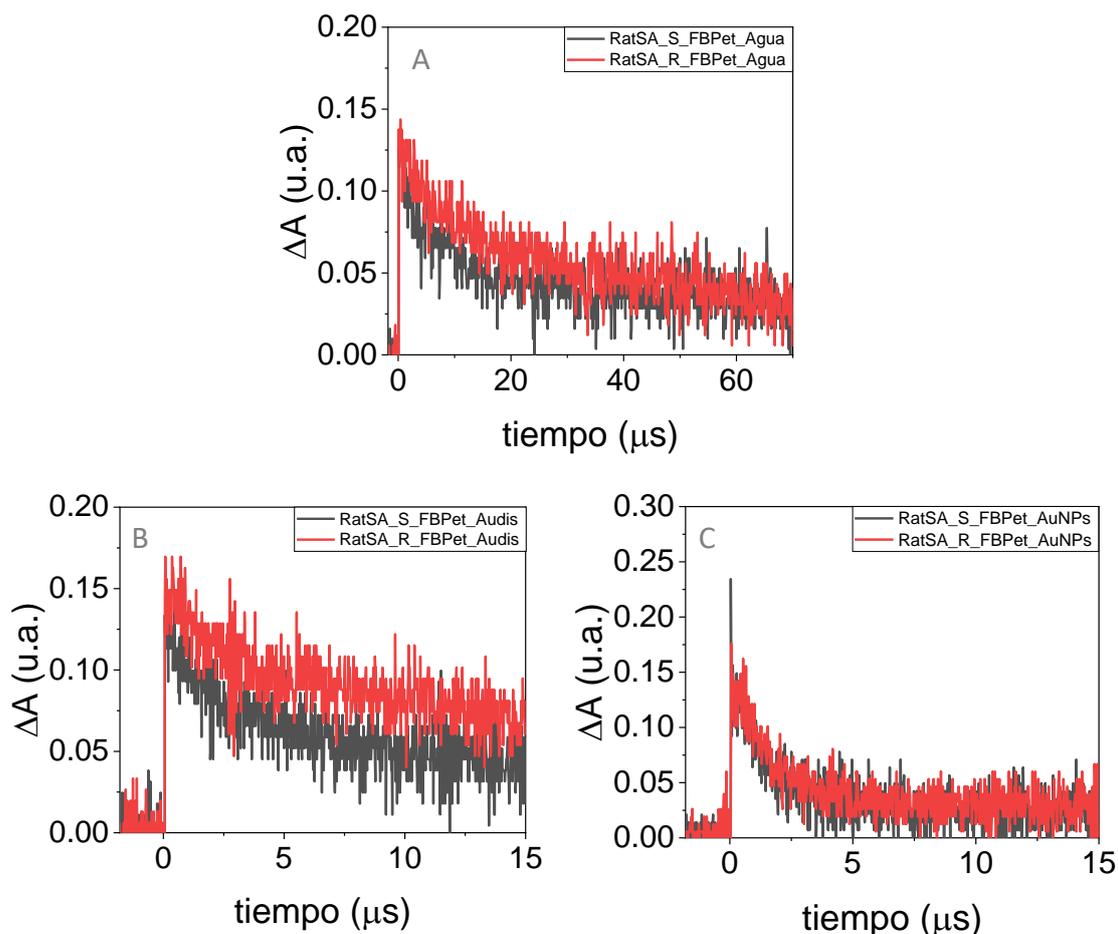


Figura 39. Cinéticas de desactivación de (S)- y (R)-FBPet@RatSA (negro y rojo, respectivamente) en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C) registrados a 380 nm por FDL tras excitar a 266 nm en condiciones aeróbicas.

Finalmente, por lo que respecta a las cinéticas a 380 nm de (S)- y (R)-FBPet@RabSA (Figura 40), no se observa esterodiferenciación alguna ni diferencias significativas en los tiempos de vida de $^3\text{FBPet}^*\text{@RabSA}$, ya que son muy similares en los tres medios investigados.

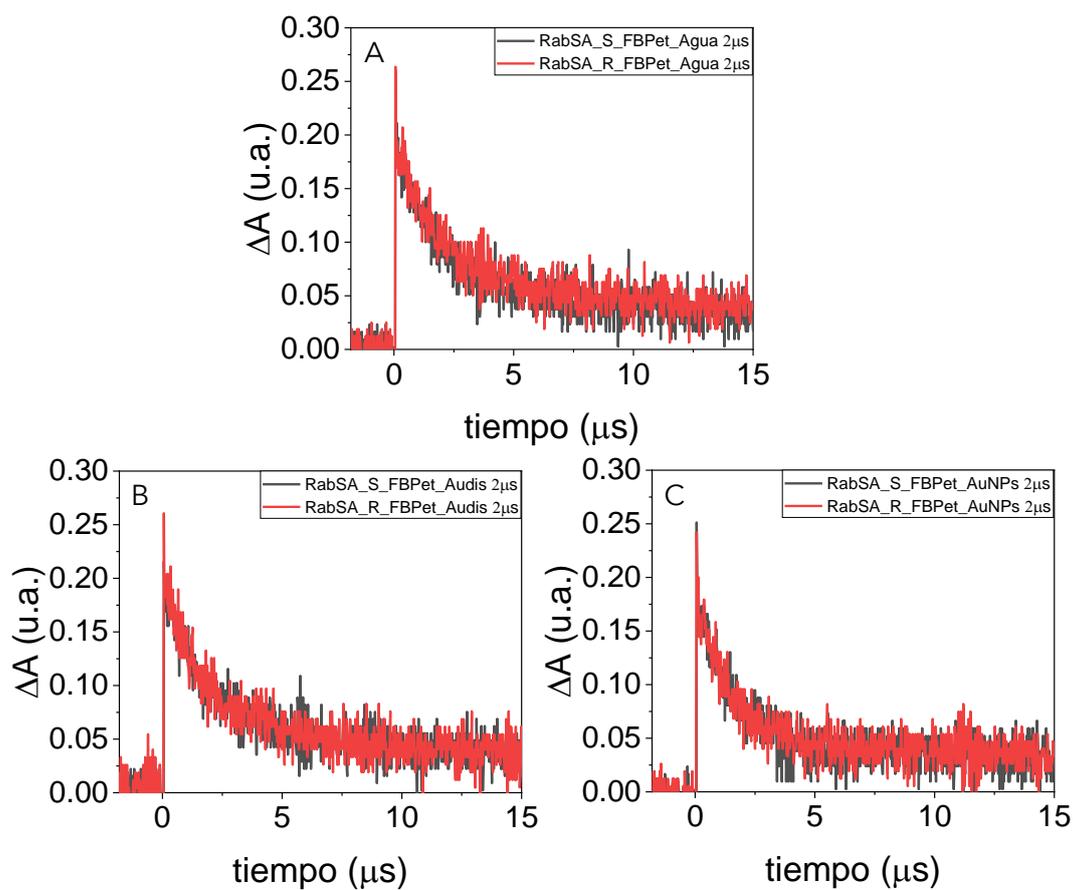


Figura 40. Cinéticas de desactivación de (S)- y (R)-FBPet@RabSA (negro y rojo, respectivamente) en disolución acuosa (A), en presencia de AuNP-PEG3000 (B) y unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (C) registrados a 380 nm por FDL tras excitar a 266 nm en condiciones aeróbicas.

3.3 Estudios de viabilidad celular

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los estudios de citotoxicidad realizados siguiendo el procedimiento de cultivo celular y siembra explicado en el apartado 2.4.

Para poder obtener estos resultados, es necesario tratar previamente los datos de emisión del colorante CellTiterBlue registrados con el lector de placas. En primer lugar, se corrigen las medidas de emisión de las muestras restando a cada una el valor de la emisión del medio de cultivo. A continuación, se calcula el valor de emisión promedio de una misma muestra y su desviación típica, ya que las medidas de cada muestra se realizan por triplicado. Conocidos estos valores, se calcula la tasa de supervivencia celular. Para ello, se toman como referencia los controles positivo y negativo, siendo el positivo las células tratadas con estauroesporina para inducir su muerte completa, y el negativo aquellas células SKBr-3 que no se han tratado y que por tanto están vivas. En este trabajo, se ha calculado el porcentaje de supervivencia celular para células SKBr-3 tratadas con las siguientes muestras con una concentración aproximada de 2 μM : los complejos (S)- y (R)-FBPet@HSA en presencia de AuNP-PEG3000 (AuNP-PEG+HSA/FBP-Et), unido covalentemente a AuNP-PEG3000 (AuNP-PEG-HSA/FBP-Et), así como nanopartículas únicamente con HSA, tanto anclada (AuNP-PEG-HSA) como no anclada (AuNP-PEG+HSA).

En la *Figura 41* se presentan los resultados obtenidos en forma de diagrama de barras, representando así la tasa de supervivencia de las células cancerosas SKBr-3 junto con la desviación típica. Como se puede observar, la menor tasa de supervivencia corresponde a aquellas nanopartículas que están funcionalizadas con HSA anclada covalentemente a la superficie de AuNP. Por el contrario, cuando HSA está en disolución en presencia de AuNP-PEG, apenas induce la muerte celular. Sorprendentemente, en estas mismas condiciones, pero en presencia de FBPet, la tasa de supervivencia es menor que para AuNP-PEG+HSA. Sin embargo, ocurre lo contrario para el caso de tener HSA covalentemente anclada a AuNP; así, como ya se ha comentado, AuNP-PEG-HSA presenta la mayor tasa de mortalidad, mientras que al tener complejo FBPet, ésta disminuye drásticamente.

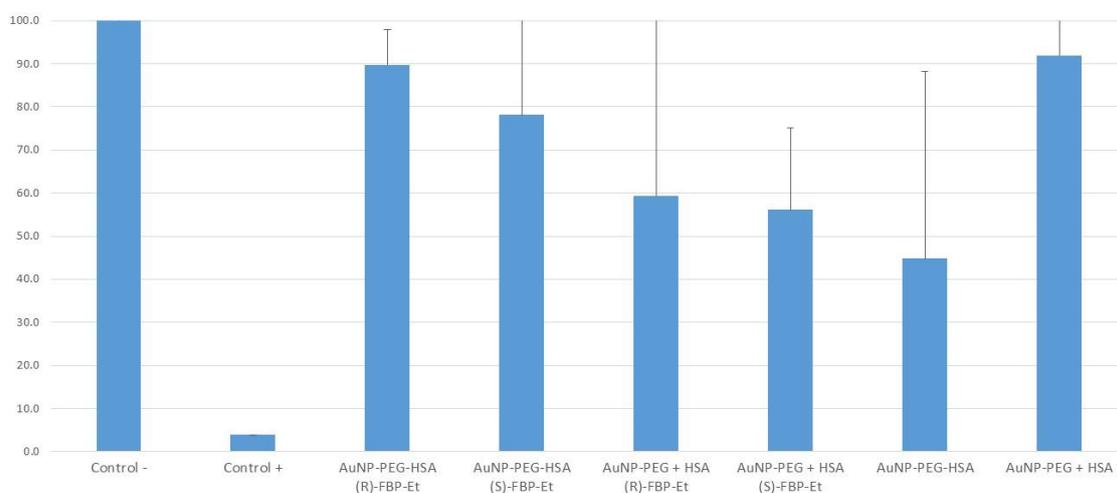


Figura 41. Tasa de supervivencia de las células humanas de cáncer de mama SKBr-3 en diferentes condiciones

Conviene mencionar que, debido a la pandemia de Covid-19, los experimentos biológicos se han podido realizar una sola vez, por lo que los resultados obtenidos no son del todo concluyentes ya que no se ha podido comprobar su reproducibilidad.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA DE FUTURO

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA DE FUTURO

4.1 Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo consistía en el diseño de nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con proteínas y un derivado farmacológico del flurbiprofeno con el fin de investigar su fotorreactividad en distintos medios y estudiar su posible uso en aplicaciones biológicas. Este estudio se ha realizado en presencia de distintas proteínas (HSA, BSA, RatSA y RabSA) y en diferentes medios: acuoso, con nanopartícula en disolución y con la proteína anclada a la superficie de la nanopartícula. Finalmente, se ha realizado un estudio de viabilidad celular con células cancerosas de mama humana, SKBr-3, con el fin de conocer el potencial de dichas nanopartículas para un posible uso futuro en terapia o en otras aplicaciones biológicas.

Tras llevar a cabo los correspondientes estudios asociados a este trabajo, se concluye que:

- Se han sintetizado nanopartículas esféricas de oro de diámetro 2-4 nm siguiendo el método de síntesis de Brust-Schiffrin y se han funcionalizado con PEG. Se ha comprobado que el tamaño de las AuNPs obtenidas era el deseado haciendo uso de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de la espectroscopía de absorción UV-vis.
- Se ha logrado unir covalentemente las distintas proteínas a la superficie de las nanopartículas a través de la molécula de PEG. Posteriormente, se ha funcionalizado el sistema con el derivado farmacológico FBPet. Esta funcionalización se ha podido comprobar mediante los espectros de absorción UV-vis obtenidos.
- Se observa cierta enantiodiferenciación en cuanto a la emisión de FBPet en las distintas proteínas, tanto en disolución como en presencia de AuNP, especialmente en HSA y BSA, siendo mucho menor en RatSA y RabSA. En general, la emisión del complejo FBPet@proteína es mayor en disolución que en AuNP. Además, se suele observar mayor desactivación de la fluorescencia cuando el complejo está covalentemente anclado a la superficie de la nanopartícula. Este hecho se relaciona con un proceso de transferencia electrónica entre el complejo y la nanopartícula. En este sentido, las cinéticas de desactivación de la fluorescencia están de acuerdo con esta conclusión, aunque tampoco se puede descartar la formación de un complejo en el estado excitado que no emita.
- Los estudios de FDL indican que la excitación de FBPet@proteína en los distintos medios da lugar a la formación del primer estado excitado triplete de FBPet ($^3\text{FBPet}^*$), cuyo máximo se encuentra a 380 nm. Asimismo, las cinéticas de desactivación de $^3\text{FBPet}^*$ en los distintos sistemas muestran que generalmente su tiempo de vida es menor cuando el complejo se encuentra anclado a la nanopartícula. Este hecho se observa especialmente para las proteínas HSA y BSA. De nuevo, este proceso puede deberse a un proceso de transferencia electrónica entre $^3\text{FBPet}^*$ y la nanopartícula metálica. Tras realizar el estudio con ambos enantiómeros de FBPet, no se observa la existencia de enantiodiferenciación en ninguno de los medios estudiados.

- Al realizar el estudio de citotoxicidad con células SKBr-3, se observa que la tasa de supervivencia celular aumenta al tratar las células con el complejo unido covalentemente a la superficie de la nanopartícula. La tasa de supervivencia disminuye cuando el complejo no está anclado covalentemente a AuNP. Así, existe una diferencia importante entre tener el complejo anclado a la nanopartícula o formando la corona proteica. Dado que se trata de un estudio preliminar, para obtener resultados concluyentes se debería realizar un estudio con mayor profundidad.

4.2 Perspectiva de futuro

Tras haber realizado el trabajo, sería necesario llevarlo a cabo con mayor profundidad con el fin de comprobar su viabilidad futura para fototerapias contra el cáncer.

Las nanopartículas sintetizadas en el presente trabajo podrían ser de uso en terapia fotodinámica, tras dirigirlas a un tumor localizado y liberar allí el fármaco correspondiente. No obstante, podrían realizarse estudios que llevaran a cabo la unión de receptores celulares a las nanopartículas de forma que las AuNPs se dirigieran al lugar deseado por sí solas.

Del mismo modo, con el fin de determinar si la tasa de mortalidad incrementaría, podría realizarse un estudio de viabilidad celular irradiando las células.

CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] "Nanomateriales - European Observatory for Nanomaterials."
- [2]https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/22264/Frontiers_2017_CH2_SP.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- [3] A. Dowling, R. Clift, and R. Grobert, "Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties," The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004.
- [4] <https://nuevatecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/>
- [5] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, Arabian J. Chem. 12, pp 908-931, 2019.
- [6] M. Ramos and C. Castillo, "Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas," no. 72, pp. 629–646, 2011.
- [7] Autor: Juana Arroyo García de Mateos TRABAJO FIN DE GRADO "NANOMEDICINAS PARA EL CÁNCER DE MAMA"
- [8]<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia/hoja-informativa-hipertemia>
- [9] J. Gao, M. Xu, Metal Nanoparticles of Various Shapes, ECE-580 Mid-term Paper.
- [10] <http://www.campusmoncloa.es/es/noticias/plasmones-de-superficie-en-nanoparticulas-metalicas-que-son-y-para-que-sirven/207/>
- [11] A. A. Yaqoob, H. Ahmad, T. Parveen, A. Ahmad, M. Oves, I. M. I. Ismail, H. A. Qari, K. Umar and M. N. Mohamad Ibrahim, Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review, Front. Chem. Vol. 8, 2020.
- [12] A. Sharma, A. K. Goyal and G. Rath, Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy, J. Drug Target. Vol. 26, pp 617-632, 2018.
- [13] L. Tamarit Mayo, Trabajo de Fin de Master "Diseño de nanopartículas de oro funcionalizadas con AINEs y proteínas para su uso en biomedicina," UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, 2018.
- [14] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim and H. Park, Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy, Front. Chem. vol 7, 167, 2019.
- [15] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT)," Alexandria J. Med., vol. 47, no. 1, pp. 1–9, 2011.
- [16] R. González Antón. Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1-dodecanotiol en un sistema bifásico. Desarrollo de sensores electroquímicos. Universidad Valladolid. (2016)
- [17] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard and D. G. Fernig. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. Anal. Chem. Vol. 79, 4215-4221, 2007.
- [18] <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/22049/Capitulo2.pdf>
- [19] P. Zhao, N. Li, D. Astruc, State of the art in gold nanoparticle synthesis, Coord. Chem. Rev., vol. 257, pp 638-665, 2013.

- [20] A. Pérula Jiménez. Síntesis, Caracterización y funcionalización de nanopartículas de DyVO4 y HoVO4. Universidad de Sevilla. (2017)
- [21] D. Mansukhani Chetwani, Síntesis, modificación superficial y caracterización de nanopartículas de oro. Universidad de Oviedo. (2015)
- [22] D. Ficai, A. Ficai, E. Andronescu. Avances en el tratamiento del cáncer: papel de las nanopartículas.
- [23] X. Gonzalez Velázquez, "Diseño, síntesis y caracterización físico-química de un hidrogel nanofuncionalizado basado en polietilenglicol" (2016)
- [24] <http://www.ehu.eus/biomoleculas/proteinas/prot3.htm>
- [25] <https://biologydictionary.net/carrier-protein/>
- [26] K. Bolaños *et al.*, Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties, *Int. J. Nanomedicine*. Vol. 14, pp 6387-6406, 2019
- [27] Vayá, I. "Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas" UPV (2007).
- [28] M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá, *J. Am. Chem. Soc.* vol. 127, 29, pp, 10134-10135, 2005.
- [29] M. Marjanovic, B. Zorc, L. Pejnovic, M. Zovko, M. Kralj, Fenoprofen and Ketoprofen Amides as Potential Antitumor Agents, *Chem. Biol. Drug Des.* Vol. 69, pp 222-226, 2007.
- [30] I. Vayá, P. Bonancia, M. C. Jimenez, D. Markovitsi, T. Gustavsson and M. A. Miranda, Excited state interactions between flurbiprofen and tryptophan in drug-protein complexes and in model dyads. Fluorescence studies from the femtosecond to the nanosecond time domains, *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 15, pp 4727-4734, 2013.
- [31] M.C. Jiménez, M.A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, Characterisation of the lowest singlet and triplet excited states of S-flurbiprofen, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, pp 1038-1041.
- [32] K. C. Fernández, Tesis doctoral "Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas", 2013.
- [33] <https://nanocomposix.com/pages/nanoparticle-characterization-techniques#spectroscopic-analysis>
- [34] <https://www.agsanalitica.com/que-es-la-fluorescencia>

ANEXO. FUNDAMENTOS **FOTOFÍSICOS**

Con el fin de comprender el motivo por el cual tiene lugar una reacción fotoquímica, así como para entender los procesos fotofísicos que surgen de la interacción de una molécula orgánica con luz de una determinada energía, resulta de gran utilidad conocer los intermedios de reacción y las especies transitorias que se pueden formar cuando un sistema absorbe luz UV-vis. La ciencia encargada de estudiar estos procesos físico-químicos es la fotoquímica. Una reacción fotoquímica puede tener lugar cuando una molécula que se encuentra en su estado de energía fundamental es irradiada por luz electromagnética de tal forma que la excita a un estado mayor de energía, que además es más inestable. El exceso de energía que posee la molécula puede disiparse de dos formas: fotoquímicamente o fotofísicamente [25]. Si la molécula pierde su exceso de energía mediante cambios en su estructura química, se dice que es un proceso fotoquímico, mientras que, si la molécula emite luz o calor, se desactivará fotofísicamente. En ambos casos, tras perder ese exceso de energía, la molécula volverá a su estado fundamental de energía [8].

Los procesos fotofísicos pueden clasificarse en radiantes o no radiantes, según la molécula emita o no energía al pasar de su estado excitado a su estado fundamental. Los procesos radiantes más comunes son la absorción, la fluorescencia y la fosforescencia. Respecto a los procesos no radiantes más frecuentes, estos incluyen la conversión interna, el entrecruzamiento entre sistemas y la relajación vibracional. En la *Figura 42* se muestran todos estos procesos fotofísicos en el Diagrama de Jablonski [13].

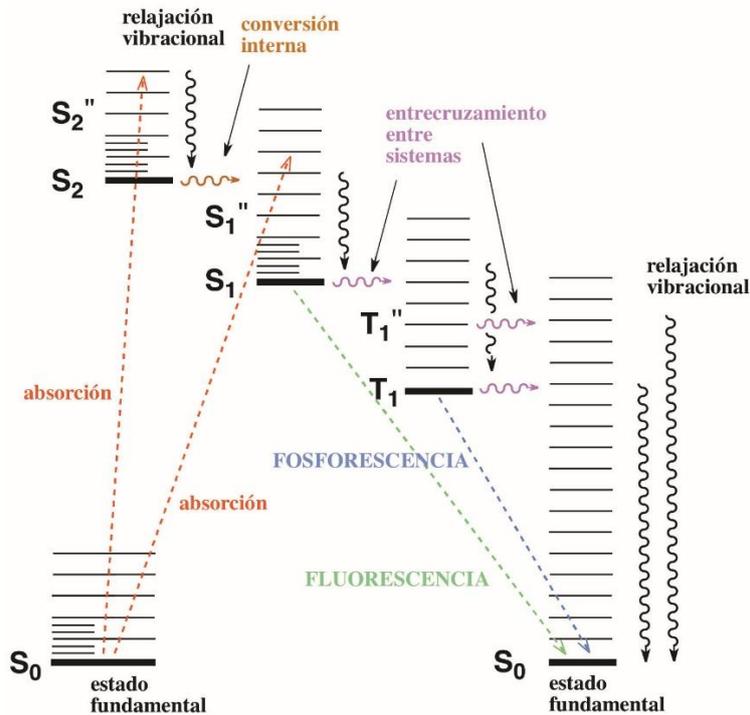


Figura 42. Diagrama de Jablonski donde se representan los procesos fotofísicos radiantes (líneas discontinuas) y no radiantes (líneas continuas) entre los estados excitados singlete (S_n) y triplete (T_n).

La absorción es un proceso radiante que se encuentra asociado a las transiciones electrónicas entre diferentes estados energéticos en ciertos grupos de una molécula. Según la regla del espín,

estas transiciones pueden ser permitidas si suceden entre estados singlete-singlete (ec. 1) o prohibidas si ocurren entre estados singlete-triplete (ec. 2).



La fluorescencia es un proceso radiante común que se encuentra asociado a la emisión de luz UV-vis como consecuencia de la desactivación del estado excitado singlete, que pasa a su estado fundamental (ec. 3).



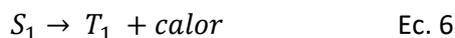
La fosforescencia es un proceso radiante en el que se emite energía en forma lumínica al desactivarse una especie excitada desde el primer estado excitado triplete (T_1) hasta el estado fundamental S_0 (ec. 4). Según la regla de espín, este proceso forma parte de las transiciones prohibidas.



La conversión interna es un proceso no radiante permitido, en el cual se libera calor a las moléculas del entorno al realizarse una transición de un estado energético excitado singlete (o triplete) a un estado de menor energía (ec. 5).



El entrecruzamiento entre sistemas es un proceso no radiante en el cual se libera calor al realizarse la transición entre un estado excitado singlete (generalmente S_1) al estado excitado triplete (generalmente T_1) (ec. 6), o bien al pasar del estado excitado triplete T_1 al estado fundamental S_0 (ec. 7).



La relajación vibracional es un proceso no radiante que consiste en la transición desde un nivel excitado vibracional hasta otro de menor energía [25].

La *Tabla 8* muestra el tiempo en que generalmente suelen ocurrir los procesos fotofísicos arriba mencionados.

Tabla 8. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos

Proceso fotofísico	Tiempo (s)
Absorción	10^{-15}
Relajación vibracional	10^{-15} - 10^{-10}
Fluorescencia	10^{-10} - 10^{-7}
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9}
Cruce intersistemas	10^{-12} - 10^{-8}
Tiempo de vida del estado excitado T ₁	10^{-6}

DOCUMENTO II. PRESUPUESTO

1. Introducción al presupuesto

En el presente presupuesto se calculan los costes que supone llevar a cabo este proyecto. Para ello, se realizan diferentes presupuestos parciales referentes al material de laboratorio, equipos, mano de obra y reactivos que han sido utilizados tanto para la síntesis y caracterización de las diferentes nanopartículas, como en los estudios de viabilidad celular.

Los precios de los reactivos químicos se han obtenido de la base de datos de Sigma-Aldrich, mientras que los precios del material de laboratorio se han consultado en la empresa Labbox.

Una vez obtenido el valor del presupuesto de ejecución material (PEM), se ha calculado el presupuesto por ejecución de contrata (PEC) considerando que los gastos generales son un 15% y que el beneficio industrial es del 6%. Finalmente, aplicando un 21% de IVA sobre el PEC, se ha obtenido el presupuesto base de licitación.

Además, en cada apartado del presupuesto se han considerado unos costes directos complementarios del 3% correspondientes a elementos imposibles de cuantificar y que, por tanto, no se incluyen en la descomposición del presupuesto.

2. Presupuesto descompuesto

2.1 Material

Tabla 1. Importe total del material de laboratorio utilizado en el proyecto

Material	Precio unitario (€)	Cantidad	Importe (€)
ud Bata de laboratorio	16.48	1	16.48
ud Guantes desechables de nitrilo (100 uds.)	6.44	2	12.88
ud Gafas de seguridad	8.9	1	8.9
ud Mascarilla respiratoria FFP2 (20uds.)	15.45	2	30.9
ud Vial de vidrio de 3.5 mL (306 uds.)	38.41	1	38.41
ud Vial de vidrio de 5mL (306 uds.)	38.41	1	38.41
ud Vial de vidrio de 16 mL (195 uds.)	37.8	1	37.8
ud Pipeta ajustable de volumen 1-5mL	45	1	45
ud Micropipeta de volumen 2-20µL	87.4	1	87.4
ud Micropipeta de volumen 20-200µL	87.4	1	87.4
ud Punta pipeta ajustable 1-5mL (205 uds.)	12.99	1	12.99
ud Punta micropipeta de volumen 2-20µL (1000 uds.)	4.22	1	4.22
ud Punta micropipeta de volumen 20-200µL (1000 uds.)	6.9	1	6.9
ud Microespátula con cuchara de acero inoxidable	7.78	1	7.78
ud Matraz de fondo redondo de 100mL (10 uds.)	39.87	0.2	7.974
ud Soporte de corcho para matraz de 100mL	4.75	3	14.25
ud Pinza de plástico para esmerilados de boca 14/23	14.96	1	14.96
ud Barras de agitación magnética	1.63	4	6.52
ud Viva-spin para centrifuga 5000 MWCO turbo 4	9.24	6	55.44

ud	Viva-spin para centrífuga 10000 MWCO turbo 15	17.75	6	106.5
ud	Gradilla para tubos de ensayo	14.95	1	14.95
ud	Pipeta cuentagotas desechable	0.89	150	133.5
ud	Cubeta de cuarzo de 3mL (2 uds.)	90.42	2	180.84
ud	Cubeta de cuarzo de 0.7mL (2 uds.)	161.71	1	161.71
ud	Portacubetas de PET	2.15	1	2.15
ud	Filtro de PTFE 13mm y tamaño de poro 0.22µm	0.53	20	10.6
ud	Jeringuilla desechable 10mL	0.13	20	2.6
ud	Aguja 0,6 x 25 mm BD Microlance	0.03	20	0.6
ud	Tubo de vidrio para RMN	1.92	3	5.76
ud	Pipeta multicanal TACTA	664	1	664
ud	Pipeta serológica estéril 5, 10 y 20 mL	120	3	360
ud	Pipeta serológica estéril de 20, 100 y 1000µL	246	3	738
ud	Matraz de cultivo celular estéril	347	1	347
ud	Placa de 96 pocillos estéril	167	1	167
ud	Bata estéril	35	1	35
ud	Jeringuilla estéril 2 y 5mL	20	2	40
ud	Contador manual	17.99	1	17.99
ud	Cámara Neubauer	50	1	50
ud	Depósitos de reactivos desechables (50 uds.)	254	0.25	63.5
%	Costes Directos Complementarios	3636.31	3	109.09
			TOTAL	3745.40

2.2 Equipos

En este apartado se detalla el coste total asociado al uso de los equipos en el proyecto. Para calcular el precio unitario, se establece un periodo de vida útil de los equipos de 10 años. Dividiendo el coste total del equipo (ver Tabla 2) entre la vida útil se obtiene el precio por unidad. Se ha considerado que un año posee 250 días hábiles y que 1 día equivale a 8 horas de trabajo.

Tabla 2. Importe total de los equipos utilizados en el proyecto

	Equipos	Coste del equipo (€)	Precio unitario (€)	Cantidad	Importe (€)
h	Evaporador rotativo	4700	0.23	1.5	0.35
h	Placa calefactora y agitadora	1100	0.05	32	1.76
h	Centrífuga de velocidad máxima de giro 6000 rpm	12000	0.6	31	18.60
h	Espectrofotómetro UV-vis	6000	0.3	62	18.60
h	Balanza analítica con resolución 0.01mg	1850	0.092	5	0.46
h	Resonancia magnética nuclear	400000	20	1.5	30.00

SISTEMAS FOTOACTIVOS PARA ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR CON CÉLULAS CANCEROSAS
SKBR-3

h	Fluorímetro en estado estacionario	25000	1.25	2.5	3.13
h	Fluorímetro de tiempo resuelto	20000	1	10	10.00
h	Baño de ultrasonidos digital Ultrasons-HD con calefacción	977.5	0.048	0.25	0.01
h	Fotólisis de destello láser	90000	4.5	9	40.50
h	Microscopio	4000	0.2	1	0.20
h	Baño termostático	300	0.015	4	0.06
h	Incubador	12000	0.6	336	201.60
h	Lector de placas	35000	1.75	1	1.75
h	Servicio de microscopía electrónica de transmisión TEM		30	3	90.00
%	Costes Directos Complementarios		417.02	3	12.51
				TOTAL	429.53

2.3 Mano de obra

Tabla 3. Importe total de la mano de obra partícipe en el proyecto

	Mano de obra	Precio unitario (€/ud.)	Cantidad	Importe (€)	
h	Núria Belda Marqués	10	190	1900	
h	Tutor proyecto	20	100	2000	
h	Tutor experimental	15	120	1800	
%	Costes Directos Complementarios	5700	3	171	
				TOTAL	5871.00

2.4 Reactivos químicos

Tabla 4. Importe total de los reactivos químicos empleados en el proyecto

	Reactivos	Precio unitario (€)	Cantidad	Importe (€)
mg	HAuCl ₄	43.2	3.3	142.56
mg	NaBH ₄	6.76	6.12	41.37
mg	HS-PEG-COOH	1.48	23.3	34.48
mL	DMF	4.69	3	14.07
mg	EDC	26.2	0.87	22.79
mg	NHS	4.12	0.69	2.84
mg	Albúmina sérica bovina	0.01	56.95	0.57
mg	Albúmina sérica humana	0.5	62.94	31.47
mg	Albúmina sérica de rata	0.01	44.99	0.45

mg	Albúmina sérica de conejo	0.01	51.43	0.51
mg	(S)-Flurbiprofeno etilado	0.18	2.32	0.42
mg	(R)-Flurbiprofeno etilado	0.18	1.93	0.35
mL	Acetonitrilo	0.68	8	5.44
ud	Línea celular SKBr3	350	1	350.00
ud	Medio de cultivo HyClone McCoy's 5A	19.5	2	39.00
ud	PBS	115	1	115.00
ud	Tripsina EDTA 0.25%	16	1	16.00
ud	CellTiter Blue	395	1	395.00
L	Acetona	46	3	138.00
L	Etanol	8	4	32.00
%	Costes Directos Complementarios	1382.33	3	41.47
			TOTAL	1423.80

3. Resumen del presupuesto

En este apartado se detalla el cálculo del presupuesto total del proyecto. Para ello, en primer lugar, se suman los importes de cada presupuesto parcial y se obtiene el presupuesto de ejecución material (PEM). A continuación, se aplica el porcentaje correspondiente a los gastos generales y al beneficio industrial sobre el PEM. Como resultado de la suma del PEM + GG + BI se obtiene el presupuesto de ejecución por contrata (PEC). Finalmente, al aplicar el 21% de IVA sobre el PEC y sumando el valor resultante al PEC se obtiene el presupuesto base de licitación del proyecto. Todos los resultados se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Cálculo del presupuesto total del proyecto

Presupuesto total	Importe (€)
Material	3745.4
Equipos	429.53
Mano de obra	5871
Reactivos	1423.8
Presupuesto ejecución material (PEM)	11469.73
Gastos generales (15%)	1720.46
Beneficio Industrial (6%)	688.18
Presupuesto ejecución por contrata (PEC)	13878.37
Impuesto Valor Añadido (IVA) (21%)	2914.46
Presupuesto base de licitación	TOTAL 16792.83

El presupuesto base de licitación del proyecto asciende a DIECISÉIS MIL SETECIENTOS NOVENTA Y DOS EUROS CON OCHENTA Y TRES CÉNTIMOS.