

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

INSTITUTO INTERUNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE  
RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO



**Nanomotores Janus de platino y sílice  
mesoporosa como plataforma para la entrega  
de fármacos en aplicaciones biomédicas**

**TESIS DOCTORAL**

*Presentada por:*

**ANDREA ESCUDERO NOGUERA**

*Directores:*

**Prof. Ramón Martínez Máñez**

**Dra. Paula Díez Sánchez**

Valencia, Abril 2024



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Ramón Martínez Máñez, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València

Paula Díez Sánchez, Doctora en Química por la Universidad Complutense de Madrid e Investigadora del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico

Certifican:

Que el trabajo ***“Nanomotores Janus de platino y sílice mesoporosa como plataforma para la entrega de fármacos en aplicaciones biomédicas”*** presentado por Andrea Escudero Noguera se ha realizado bajo su dirección en el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València como Proyecto de Tesis para la obtención del grado de Doctor en Química en la Universitat Politècnica de València.

Valencia, Abril 2024

Prof. Ramón Martínez Máñez

Director

Dra. Paula Díez Sánchez

Directora

*A mi familia*

*“A fuerza de golpes, fuerte,  
y a fuerza de sol, bruñido,  
con una ambición de muerte  
despedaza un pan reñido”*

Miguel Hernández

*“La ciencia se compone de errores, que  
a su vez, son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

## TABLA DE CONTENIDO

<i>Resumen</i>	<b>6</b>
<i>Resum</i>	<b>8</b>
<i>Abstract</i>	<b>10</b>
<i>Publicaciones científicas</i>	<b>12</b>
<i>Abreviaturas y acrónimos</i>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>I.1 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES: CONCEPTOS BÁSICOS</b>	<b>19</b>
<b>I.2 NANOMEDICINA</b>	<b>22</b>
I.2.1 Requisitos para la aplicación de los nanomateriales en nanomedicina	22
I.2.2 Nanomateriales más usados en nanomedicina	24
I.2.2.1 Nanomateriales lipídicos para la liberación de fármacos	25
I.2.2.2 Nanomateriales poliméricos para la liberación de fármacos	26
I.2.2.3 Estructuras virales para la liberación de fármacos	27
<b>I.3 NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE SÍLICE PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS</b>	<b>27</b>
I.3.1. Síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice	27
I.3.2. Propiedades de las nanopartículas mesoporosas de sílice	28
I.3.3. Biocompatibilidad, biodistribución y relevancia clínica de las nanopartículas mesoporosas de sílice	29
I.3.4. Funcionalización de las nanopartículas mesoporosas de sílice	31
I.3.5 Liberación de fármacos en respuesta a estímulos: «puertas moleculares»	32
I.3.5.1 Puertas moleculares sensibles a cambios en el potencial redox	34
I.3.5.2 Puertas moleculares sensibles a cambios en el pH	35
I.3.5.3 Puertas moleculares sensibles a enzimas	36
I.3.5.4 Puertas moleculares sensibles a moléculas y biomoléculas	36
I.3.5.5 Puertas moleculares sensibles a temperatura	37
I.3.5.6 Puertas moleculares sensibles a luz	37
I.3.5.7 Puertas moleculares sensibles a campos magnéticos	38
I.3.5.8 Puertas moleculares sensibles a ultrasonidos	38
<b>I.4 BARRERAS BIOLÓGICAS: PRINCIPAL OBSTÁCULO PARA LOS NANOSISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS</b>	<b>39</b>
I.4.1 Matriz extracelular de biopelículas	39
I.4.2 Matriz extracelular de tumores	40
<b>I.5 NANO- Y MICROMOTORES: UN AVANCE FRENTE A LOS SISTEMAS PASIVOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS</b>	<b>41</b>
I.5.1 Motores propulsados por métodos físicos	43
I.5.1.1 Motores propulsados por luz	43
I.5.1.2 Motores propulsados por campos magnéticos	44
I.5.1.3 Motores propulsados por ultrasonidos	45
I.5.1.4 Motores propulsados por campos eléctricos	47

I.5.2 Motores biohíbridos	47
I.5.3 Motores propulsados por reacciones químicas	49
I.5.3.1 Mecanismos de propulsión de los motores catalíticos	50
I.5.3.2 Motores metálicos	52
I.5.3.3 Motores enzimáticos	55
I.5.4 Otras aplicaciones de los nano- y micromotores	59
<b><u>CAPÍTULO II: OBJETIVOS</u></b>	<b>61</b>
<b><u>CAPÍTULO III: DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMOTORES</u></b>	
<b>JANUS PT-MSN</b>	<b>64</b>
<b>III.1 RESUMEN GRÁFICO</b>	<b>65</b>
<b>III.2 RESUMEN</b>	<b>65</b>
<b>III.3 INTRODUCCIÓN</b>	<b>67</b>
III.3.1 Nanomotores catalíticos: importancia de romper la simetría	67
III.3.1.1 Técnicas de síntesis	67
III.3.1.2 Nanopartículas Janus	69
III.3.2 Movimiento en la nanoescala	70
III.3.2.1 Factores que afectan al movimiento	70
III.3.2.2 Técnicas para estudiar el movimiento	71
III.3.2.3 Parámetros que definen el movimiento	73
<b>III.4 OBJETIVOS</b>	<b>77</b>
<b>III.5 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>78</b>
III.5.1 Reactivos	78
III.5.2 Síntesis de nanopartículas	78
III.5.2.1 Síntesis de Pt	78
III.5.2.2 Síntesis de MSN	79
III.5.2.3 Síntesis de NM	79
III.5.2.4 Síntesis de NM <sub>Ru-PEG</sub>	80
III.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales	81
III.5.3.1 Microscopía electrónica	82
III.5.3.2 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo	82
III.5.3.3 Difracción de rayos X de polvo	82
III.5.3.4 Porosimetría: análisis de isothermas de adsorción-desorción de N <sub>2</sub>	82
III.5.3.5 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier	83
III.5.3.6 Análisis termogravimétrico	83
III.5.3.7 Dispersión dinámica de luz	84
III.5.3.8 Espectroscopía UV-visible	84
III.5.3.9 Espectroscopía de fluorescencia	84
III.5.4 Caracterización del movimiento de los nanomotores	84
III.5.4.1 Ensayo de actividad peroxidasa	84

III.5.4.2 Adquisición de vídeos ópticos y cálculo del desplazamiento cuadrático medio y el coeficiente de difusión	85
III.5.4.3 Estudio de los cambios en el diámetro hidrodinámico por DLS	85
III.5.5 Ensayos de liberación	86
III.5.6 Ensayos <i>in vitro</i>	87
III.5.6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	87
III.5.6.2 Ensayos de viabilidad celular	87
III.5.7 Análisis estadístico	88
<b>III.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
III.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor	89
III.6.2 Caracterización estructural del nanomotor	92
III.6.3 Caracterización funcional del nanomotor	103
III.6.3.1 El nanomotor se autopropulsa en respuesta a la catálisis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	103
III.6.3.2 El nanomotor libera la carga encapsulada ante el reconocimiento de un estímulo específico	111
III.6.4 Caracterización de la biocompatibilidad del nanomotor	113
<b>III.7 CONCLUSIONES</b>	<b>116</b>
<b><u>CAPÍTULO IV: NANOMOTORES JANUS PT-MSN PARA EL TRATAMIENTO DE</u></b>	
<b>    <u>    BIOPELÍCULAS BACTERIANAS</u></b>	<b>117</b>
<b>    IV.1 RESUMEN GRÁFICO</b>	<b>119</b>
<b>    IV.2 RESUMEN</b>	<b>119</b>
<b>    IV.3 INTRODUCCIÓN</b>	<b>121</b>
IV.3.1 Biopelículas: importancia de perturbar su ECM	121
IV.3.1.1 Biopelículas en salud dental: infecciones endodónticas	122
IV.3.2 Abordaje de las infecciones mediadas por biopelículas mediante el uso de nanomotores	125
<b>    IV.4 OBJETIVOS</b>	<b>127</b>
<b>    IV.5 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>128</b>
IV.5.1 Reactivos	128
IV.5.2 Síntesis de nanopartículas	128
IV.5.2.1 Síntesis de NM <sub>CHX-F</sub>	128
IV.5.2.2 Síntesis de NM <sub>CHX-βCD</sub>	129
IV.5.2.3 Síntesis de NM <sub>F</sub>	129
IV.5.2.4 Síntesis de MSN <sub>CHX-F</sub>	129
IV.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales	130
IV.5.3.1 Determinación de la cantidad de βCD unida a ficina	130
IV.5.3.2 Determinación de la actividad proteasa	130
IV.5.4 Caracterización del movimiento de los nanomotores	130
IV.5.5 Ensayos de liberación	131
IV.5.5.1 Determinación de la carga	131
IV.5.6 Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	131
IV.5.6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	131

IV.5.6.2 Ensayos de citotoxicidad	132
IV.5.7 Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i>	132
IV.5.7.1 Modelo animal y administración de los nanomotores	132
IV.5.7.2 Análisis sanguíneo e histológico	133
IV.5.8 Ensayos antimicrobianos	133
IV.5.8.1 Modelo <i>ex vivo</i> de biopelículas polimicrobianas orales derivadas de saliva	133
IV.5.8.2 Modelo <i>ex vivo</i> de biopelículas endodónticas de <i>Streptococcus mutans</i> crecidas sobre dentina	135
IV.5.9 Análisis estadístico	136
<b>IV.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
IV.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor	137
IV.6.2 Caracterización estructural del nanomotor	139
IV.6.3 Caracterización funcional del nanomotor	144
IV.6.3.1 NM <sub>CHX-F</sub> se autopropulsa por la descomposición catalítica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	144
IV.6.3.2 NM <sub>CHX-F</sub> libera CHX a pH ácido	150
IV.6.4 Caracterización de la biocompatibilidad del nanomotor	152
IV.6.5 Caracterización de las habilidades antimicrobianas del nanomotor	156
IV.6.5.1 NM <sub>CHX-F</sub> elimina biopelículas orales derivadas de saliva	158
IV.6.5.2 NM <sub>CHX-F</sub> elimina biopelículas endodónticas crecidas sobre dentina	160
<b>IV.7 CONCLUSIONES</b>	<b>165</b>
<b><u>CAPÍTULO V: NANOMOTORES JANUS PT-MSN PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES SÓLIDOS</u></b>	<b>167</b>
<b>V.1 RESUMEN GRÁFICO</b>	<b>169</b>
<b>V.2 RESUMEN</b>	<b>169</b>
<b>V.3 INTRODUCCIÓN</b>	<b>171</b>
V.3.1 Tumores sólidos: importancia de penetrar en su ECM	171
V.3.2 Nanomotores para terapia oncológica: necesidad de emplear combustibles biocompatibles y biodisponibles	174
<b>V.4 OBJETIVOS</b>	<b>177</b>
<b>V.5 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>178</b>
V.5.1 Reactivos	178
V.5.2 Síntesis de nanopartículas	178
V.5.2.1 Síntesis de NM <sub>Doxo-GOx</sub>	178
V.5.2.2 Síntesis de NM <sub>GOx</sub>	179
V.5.2.3 Síntesis de NM <sub>Doxo-BSA</sub>	179
V.5.2.4 Síntesis de NM <sub>Doxo-GOx-IN</sub>	179
V.5.2.5 Síntesis de NM <sub>PA-GOx</sub> y NM <sub>PA-GOx-IN</sub>	179
V.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales	180
V.5.3.1 Determinación de la cantidad de enzima	180
V.5.4 Caracterización del movimiento inducido por glucosa	181
V.5.4.1 Ensayo de actividad enzimática GOx	181

V.5.4.2 Cálculo del MSD y el $D_0/D_{eff}$	181
V.5.4.3 Estudio del movimiento en un entorno similar a la ECM	182
V.5.5 Ensayos de liberación	182
V.5.5.1 Determinación de la carga	182
V.5.6 Ensayos <i>in vitro</i>	183
V.5.6.1 Cultivo de células cancerosas 2D	183
V.5.6.2 Esferoides tumorales 3D	184
V.5.7 Ensayos <i>in vivo</i>	185
V.5.7.1 Modelo animal	185
V.5.7.2 Formación de los tumores y administración de los tratamientos	185
V.5.7.3 Evaluación de la penetración de los nanomotores en tumores	186
V.5.7.4 Evaluación de la liberación de Doxo en tumores	186
V.5.7.5 Evaluación de la muerte celular en tumores	187
V.5.7.6 Evaluación de la generación de ROS en tumores	187
V.5.8 Análisis estadístico	187
<b>V.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>188</b>
V.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor	188
V.6.2 Caracterización estructural del nanomotor	190
V.6.3 Caracterización funcional del nanomotor	195
V.6.3.1 $NM_{Doxo-GOx}$ se autopropulsa por la transformación enzimática de glucosa	195
V.6.3.2 $NM_{Doxo-GOx}$ libera Doxo en respuesta a actividad proteolítica	205
V.6.4 Caracterización de las habilidades antitumorales del nanomotor	207
V.6.4.1 $NM_{Doxo-GOx}$ reduce la población de células cancerosas	208
V.6.4.2 El nanomotor exhibe una mayor penetración tumoral que las nanopartículas pasivas	213
V.6.4.3 $NM_{Doxo-GOx}$ exhibe actividad anticancerígena <i>in vivo</i>	216
<b>V.7 CONCLUSIONES</b>	<b>223</b>
<b><u>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES</u></b>	<b>225</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>229</b>

## RESUMEN

La presente tesis doctoral titulada «*Nanomotores Janus platino-sílice mesoporosa como plataforma para la entrega de fármacos en aplicaciones biomédicas*» se centra en el diseño, síntesis, caracterización y validación en entornos relevantes de una innovadora nanopartícula multifuncional autopropulsada, *i.e.*, nanomotor. El nanodispositivo está basado en una nanopartícula anisotrópica tipo Janus, integrada por una nanopartícula de platino (Pt) y una nanopartícula mesoporosa de sílice (MSN). Su multifuncionalidad radica en que es capaz de propulsarse y liberar fármacos de forma controlada. Por un lado, la cara de Pt es responsable del movimiento al catalizar la descomposición de  $H_2O_2$  en  $O_2$  y, por otro lado, la cara de MSN es responsable de producir la entrega de la carga únicamente ante el reconocimiento de estímulos endógenos específicos.

En el capítulo I se expone el estado del arte del área de los nanomateriales para la liberación de fármacos, haciendo hincapié en las propiedades más importantes de las MSNs. Entre las cuales destaca la posibilidad de funcionalización con entidades moleculares que permiten controlar a demanda el transporte de masa, *i.e.*, «*puertas moleculares*». Además, se presenta una visión general de los tipos de nano- y micromotores, centrándose en la procedencia de la fuerza que los impulsa: física, biohíbrida y química. También se presentan los mecanismos de propulsión, la composición y los combustibles más comunes de los motores catalíticos.

En el capítulo II se describe el objetivo general del trabajo: ampliar el conocimiento en el campo de los nanomotores biomédicos y emplear su fuerza motriz para difundir a través de barreras biológicas (BB) favoreciendo la entrega de agentes terapéuticos en localizaciones diana de difícil acceso. En particular, esta aproximación está dirigida a la zona interna de las biopelículas bacterianas y los tumores sólidos, que en ambos casos está protegida por una matriz extracelular (ECM) prácticamente impenetrable. Los objetivos planteados se abordan en los siguientes apartados experimentales.

En el capítulo III se introducen los conceptos básicos que definen el movimiento en la nanoescala, así como las principales técnicas y parámetros empleados para su caracterización. También se describen los métodos más usados para la fabricación de nanomotores. En concreto, se aplica la técnica de emulsión de Pickering para sintetizar de forma toposelectiva el nanomotor Janus Pt-MSN propuesto. Éste se carga con una molécula modelo (hexahidrato de tris(2,2'-bipiridil) diclorouranio (II)) y se funcionaliza con una puerta molecular sensible a estímulos redox, formada por o-(2-mercaptoetil)-o'-metilhexa(etilenglicol) unido a la superficie externa de la cara de MSN mediante enlaces disulfuro. En esta sección se confirma la estructura del nanomotor (tipo «*muñeco de nieve*») y su doble funcionalidad: difusión incrementada en respuesta a la adición de  $H_2O_2$  y salida selectiva de la carga en respuesta a la adición de una especie reductora (glutatión). Asimismo, se demuestra que el movimiento del nanomotor acelera el proceso de liberación.

En el capítulo IV se presenta la problemática de la ECM de las biopelículas bacterianas y la aplicación de los nanomotores como potencial herramienta para la desinfección en endodoncias. En particular, se propone cargar el nanomotor Janus Pt-MSN con un antiséptico

(clorhexidina) y bloquear sus poros con una nanoválvula sensible al pH, formada por un complejo de inclusión establecido entre grupos benzimidazol y  $\beta$ -ciclodextrinas unidas a la proteasa ficina. En este caso, la puerta molecular es capaz de hidrolizar los componentes proteicos de la ECM bacteriana y de inducir la liberación de la carga específicamente a pH ácido, rasgo característico de la zona interna de las biopelículas endodónticas. Los experimentos llevados a cabo prueban que la triple funcionalidad sinérgica del nanomotor resulta en una eficaz eliminación de los microorganismos alojados en las biopelículas endodónticas.

En el capítulo V se describe la implicación de la ECM tumoral como obstáculo para el éxito de los tratamientos antineoplásicos y el uso de los nanomotores como posible solución. Además, se expone la urgente necesidad de emplear combustibles biocompatibles y biodisponibles que no generen efectos nocivos indeseados en los pacientes. En concreto, se propone el diseño de un nanomotor propulsado por glucosa, un metabolito ubicuo y abundante en los seres vivos. Para ello, se une la enzima glucosa oxidasa a la superficie externa de la cara mesoporosa del nanomotor Janus Pt-MSN mediante enlaces amida. Aquí, la enzima desempeña una doble función. Por una parte, constituye el primer elemento de la cascada que induce el movimiento, al catalizar la transformación enzimática de glucosa en  $H_2O_2$ . Sucesivamente, el  $H_2O_2$  autogenerado es descompuesto por la cara de Pt del nanomotor propulsándolo. Por otra parte, actúa como puerta molecular sensible a actividad proteolítica, bloqueando la salida del fármaco anticancerígeno encapsulado (doxorubicina) e induciendo su liberación específica en los lisosomas celulares. Los resultados obtenidos evidencian la habilidad del nanomotor para eliminar eficazmente las células cancerosas que conforman los tumores sólidos.

En el último capítulo se enumeran las conclusiones derivadas de esta tesis doctoral. Los resultados presentados suponen un avance significativo en la incipiente área de conocimiento que nos ocupa, ya que se ha materializado un nanomotor altamente versátil con 2 ventajas prominentes frente al resto de nanodispositivos descritos hasta la fecha: (i) una amplia área catalítica capaz de inducir una difusión efectiva incrementada y (ii) una amplia área susceptible de ser funcionalizada con diferentes puertas moleculares. Además, se ha demostrado la capacidad de los nanomotores diseñados para atravesar BB, logrando un efecto terapéutico tanto en infecciones endodónticas como en cáncer. Del mismo modo, se ha probado que dicho efecto es mayor que el causado por los componentes de los nanomotores administrados independientemente y por distintas nanopartículas control privadas de alguno de sus elementos fundamentales.

Esperamos que los datos aportados contribuyan al desarrollo de nuevas estrategias o a la mejora de las ya existentes para, en conjunto, ayudar a solventar el reto de la entrega de agentes terapéuticos en áreas enfermas inaccesibles, un problema clínico sin solución definitiva en la actualidad.

## RESUM

La present tesi doctoral titulada «*Nanomotors Janus platí-sílice mesoporosa com a plataforma per al alliberament de fàrmacs en aplicacions biomèdiques*» se centra en el disseny, síntesi, caracterització i validació en entorns rellevants d'una innovadora nanopartícula multifuncional autopropulsada, *i.e.*, nanomotor. El nanodispositiu està basat en una nanopartícula anisotròpica tipus Janus, integrada per una nanopartícula de platí (Pt) i una nanopartícula de sílice mesoporosa (MSN). La seua multifuncionalitat radica en el fet que és capaç d'impulsar-se i alliberar fàrmacs de manera controlada. D'una banda, la cara de Pt és responsable del moviment catalitzant la descomposició de  $H_2O_2$  en  $O_2$  i, d'altra banda, la cara de MSN és responsable de produir el alliberament de la càrrega només davant el reconeixement d'estímuls endògens específics.

En el capítol I s'exposa l'estat de l'art en l'àrea dels nanomaterials per a l'alliberament de fàrmacs, posant èmfasi en les propietats més importants de les MSN. Entre les quals destaca la possibilitat de funcionalització amb entitats moleculars que permeten controlar a demanda el transport de massa, *i.e.*, «*portes moleculars*». Així mateix, es presenta una visió general dels tipus de nano- i micromotors, centrant-se en la procedència de la força que els impulsa: física, biohíbrida i química. A més, es presenten els mecanismes de propulsió, la composició i els combustibles més comuns dels motors catalítics.

En el capítol II es descriu l'objectiu general del treball: ampliar el coneixement en el camp dels nanomotors biomèdics i emprar la seua força motriu per a difondre a través de barreres biològiques (BB), afavorint l'alliberament d'agents terapèutics en localitzacions diana de difícil accés. En particular, aquesta aproximació està dirigida a la zona interna de les biopel·lícules bacterianes i els tumors sòlids, que en tots dos casos està protegida per una matriu extracel·lular (ECM) pràcticament impenetrable. Els objectius plantejats són abordats en els següents apartats experimentals.

En el capítol III s'introdueixen els conceptes bàsics que defineixen el moviment en la nanoescala, així com les principals tècniques i paràmetres emprats per a la seua caracterització. També es descriuen els mètodes més usats per a la fabricació de nanomotors. En concret, s'aplica la tècnica d'emulsió de Pickering per a sintetitzar de forma toposelectiva el nanomotor Janus Pt-MSN proposat. Aquest es carrega amb una molècula model (hexahidrat de tris (2,2'-bipiridil) diclorouteni (II)) i es funcionalitza amb una porta molecular sensible a estímuls redox, formada per o-(2-mercaptoetil)-o-metilhexa (etilenglicol) unit a la superfície externa de la cara de MSN mitjançant enllaços disulfur. En aquesta secció es confirma l'estructura del nanomotor (tipus «*ninot de neu*») i la seua doble funcionalitat: difusió incrementada en resposta a l'addició de  $H_2O_2$  i eixida selectiva de la càrrega en resposta a l'addició d'una espècie reductora (glutatió). Així mateix, es demostra que el moviment del nanomotor accelera el procés d'alliberament.

En el capítol IV es presenta la problemàtica de l'ECM de les biopel·lícules bacterianes i l'aplicació dels nanomotors com a potencial ferramenta per a la desinfecció en endodòncies. En particular, es proposa carregar el nanomotor Janus Pt-MSN amb un antisèptic (clorhexidina) i bloquejar els seus porus amb una nanovàlvula sensible al pH, formada per un complex d'inclusió establert entre grups benzimidazol i  $\beta$ -ciclodextrines unides a la proteasa ficina. En aquest cas, la

porta molecular és capaç d'hidrolitzar els components proteics de l'ECM bacteriana i d'induir l'alliberament de la càrrega específicament a pH àcid, tret característic de la zona interna de les biopel·lícules endodòntiques. Els experiments duts a terme proven que la triple funcionalitat sinèrgica del nanomotor resulta en una eficaç eliminació dels microorganismes allotjats en les biopel·lícules endodòntiques.

En el capítol V es descriu la implicació de l'ECM tumoral com a obstacle per als tractaments antineoplàsics i l'ús dels nanomotors com a possible solució. A més, s'exposa la urgent necessitat d'emprar combustibles biocompatibles i biodisponibles que no generen efectes nocius no desitjats en els pacients. En concret, es proposa el disseny d'un nanomotor propulsat per glucosa, un metabòlit ubic i abundant en els éssers vius. Per a això, s'uneix l'enzim glucosa oxidasa a la superfície externa de la cara mesoporosa del nanomotor Janus Pt-MSN mitjançant enllaços amida. Ací, l'enzim exerceix una doble funció. D'una banda, constitueix el primer element de la cascada que indueix el moviment, en catalitzar la transformació enzimàtica de glucosa en  $H_2O_2$ . Successivament, el  $H_2O_2$  autogenerat és descompost per la cara de Pt del nanomotor propulsant-ho. D'altra banda, actua com a porta molecular sensible a activitat proteolítica, bloquejant l'eixida del fàrmac anticancerígen encapsulat (doxorubicina) e induint el seu alliberament específic en els lisosomes cel·lulars. Els resultats obtinguts evidencien l'habilitat del nanomotor per a eliminar eficaçment les cèl·lules canceroses que conformen els tumors sòlids.

En l'últim capítol s'enumeren les conclusions derivades d'aquesta tesi doctoral. Els resultats presentats suposen un avanç significatiu en la incipient àrea de coneixement que ens ocupa, ja que s'ha materialitzat un nanomotor altament versàtil amb 2 avantatges prominents enfront de la resta de nanodispositius descrits fins hui: (i) una àmplia àrea catalítica capaç d'induir una difusió efectiva incrementada i (ii) una àmplia àrea susceptible de ser funcionalitzada amb diferents portes moleculars. A més, s'ha demostrat la capacitat dels nanomotors dissenyats per a travessar BB, aconseguint un elevat efecte terapèutic tant en infeccions endodòntiques com en càncer. De la mateixa manera, s'ha provat que aquest efecte és major que el causat pels components dels nanomotors administrats independentment i per diferents nanopartícules control privades d'algun dels seus elements fonamentals.

Esperem que les dades aportades contribuïsqen al desenvolupament de noves estratègies o a la millora de les ja existents per a, en conjunt, ajudar a solucionar el repte del lliurament d'agents terapèutics en àrees malaltes inaccessibles, un problema clínic sense solució definitiva en l'actualitat.

## ABSTRACT

The present PhD thesis entitled «Platinum-mesoporous silica Janus nanomotors as a platform for drug delivery in biomedical applications» focuses on the design, synthesis, characterization, and validation in relevant environments of an innovative multifunctional self-propelled nanoparticle, *i.e.*, nanomotor. The nanodevice is based on an anisotropic Janus-type nanoparticle, integrated by a platinum nanoparticle (Pt) and a mesoporous silica nanoparticle (MSN). Its multifunctionality lies in the fact that it can propel itself and releasing drugs in a controlled manner. On the one hand, the Pt face is responsible for the movement by catalyzing the decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  into  $\text{O}_2$  and, on the other hand, the MSN face is responsible for producing cargo delivery only upon recognition of specific endogenous stimuli.

Chapter I presents the state of the art in nanomaterials for drug delivery, emphasizing the most important properties of MSNs. Among which the possibility of functionalization with molecular entities that allow on-demand control of mass transport, *i.e.*, «gatekeepers», stands out. An overview of the types of nano- and micromotors is also presented, focusing on the origin of the driving force: physical, biohybrid and chemical. In addition, the propulsion mechanisms, composition, and most common fuels of catalytic engines are presented.

Chapter II describes the general objective of the work: to expand knowledge in the field of biomedical nanomotors and employ their driving force to diffuse through biological barriers (BB), favoring the delivery of therapeutic agents to hard-to-reach target sites. This approach targets the inner zone of bacterial biofilms and solid tumors, which in both cases is protected by an impenetrable extracellular matrix (ECM). The objectives are addressed in the following experimental sections.

Chapter III introduces the basic concepts that define nanoscale motion, as well as the main techniques and parameters used for its characterization. The most used methods for the fabrication of nanomotors are also described. In particular, the Pickering emulsion technique is applied to synthesize the proposed Janus Pt-MSN nanomotor in a toposelective way. It is loaded with a model molecule (tris(2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium(II) hexahydrate) and functionalized with a redox-stimuli-sensitive molecular gate formed by *o*-(2-mercaptoethyl)-*o'*-methylhexa(ethylene glycol) attached to the outer surface of the MSN face *via* disulfide bonds. In this section, we confirm the structure of the nanomotor («snowman» type) and its dual functionality: increased diffusion in response to the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and selective cargo release in response to the addition of reducing species (glutathione). It is also shown that the movement of the nanomotor accelerates the cargo-release process.

Chapter IV presents the problem of the ECM of bacterial biofilms and the application of nanomotors as a potential tool for endodontic disinfection. It is proposed to load the Janus Pt-MSN nanomotor with an antiseptic (chlorhexidine) and to block its pores with a pH-sensitive nanovalve formed by an inclusion complex established between benzimidazole groups and  $\beta$ -cyclodextrins bound to ficin protease. In this case, the molecular gate can hydrolyze the protein components of the bacterial ECM and induce the cargo-release specifically at acidic pH, a characteristic feature of the inner zone of endodontic biofilms. The experiments carried out

prove that the triple synergistic functionality of the nanomotor results in an effective elimination of microorganisms hosted in endodontic biofilms.

Chapter V describes the implication of tumor ECM as an obstacle to antineoplastic treatments and the use of nanomotors as a possible solution. In addition, the urgent need to use biocompatible and bioavailable fuels that do not generate harmful effects in patients is presented. Specifically, the design of a nanomotor powered by glucose, a ubiquitous and abundant metabolite in living beings, is proposed. For this purpose, the enzyme glucose oxidase is attached to the outer surface of the mesoporous face of the Janus Pt-MSN nanomotor *via* amide bonds. Here, the enzyme plays a dual role. On the one hand, it constitutes the first element of the movement-inducing cascade by catalyzing the enzymatic transformation of glucose into  $H_2O_2$ . Subsequently, the self-generated  $H_2O_2$  is decomposed by the Pt face of the nanomotor propelling it. On the other hand, it acts as a molecular gate sensitive to proteolytic activity, blocking the scape of the encapsulated anticancer drug (doxorubicin) and inducing its specific release in the cellular lysosomes. The results obtained demonstrate the ability of the nanomotor to effectively eliminate the cancer cells in solid tumors.

The last chapter provides the conclusions derived from this PhD thesis. The results presented represent a significant advance in the incipient area of knowledge that concerns us, since a highly versatile nanomotor has materialized with 2 prominent advantages over the others nanodevices described to date: (i) a wide catalytic area capable of inducing an increased effective diffusion and (ii) a wide area susceptible to be functionalized with different gatekeepers. In addition, the ability of engineered nanomotors to pass through BB has been demonstrated, achieving a high therapeutic effect in both endodontic infections and cancer. Likewise, it has been proven that this effect is greater than that caused by the components of the nanomotors administered independently and by different control nanoparticles deprived of some of their fundamental elements.

We hope that the data provided will contribute to the development of new strategies or to the improvement of existing ones to help solve the challenge of delivering therapeutic agents to inaccessible diseased areas, a clinical problem without a definitive solution at present.

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Los resultados de esta tesis doctoral y otras colaboraciones han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y patentes de invención:

- Paula Díez, Elena Lucena-Sánchez, **Andrea Escudero**, Antoni Llopis-Lorente, Reynaldo Villalonga y Ramón Martínez-Máñez. Ultrafast Directional Janus Pt–Mesoporous Silica Nanomotors for Smart Drug Delivery. *ACS Nano* 2021, 15, 3, 4467-4480.
- Blanca Escriche-Navarro, **Andrea Escudero**, Elena Lucena-Sánchez, Félix Sancenón, Alba García-Fernández y Ramón Martínez-Máñez. Mesoporous Silica Materials as an Emerging Tool for Cancer Immunotherapy. *Advanced Science* 2022, 9, 2200756.
- Migle Ziemyte,\* **Andrea Escudero**,\* Paula Díez, María D. Ferrer, José R. Murguía, Vicente Martí-Centelles, Alex Mira y Ramón Martínez-Máñez. Ficin–Cyclodextrin-Based Docking Nanoarchitectonics of Self-Propelled Nanomotors for Bacterial Biofilm Eradication. *Chemistry of Materials* 2023, 35, 11, 4412-4426. \*Ambas autoras han contribuido por igual.
- **Andrea Escudero**, Elena Lucena-Sánchez, Alba García-Fernández, Francisco J. Hicke, Sandra Pradana-López, Antoni Llopis-Lorente, Paula Díez y Ramón Martínez-Máñez. Glucose-fueled Gated Nanomotors for *In Vivo* Cancer Therapy. *Submitted* 2023.
- Alex Mira, Ramón Martínez-Máñez, María D. Ferrer, Paula Díez, Migle Ziemyte, **Andrea Escudero**, Elena Aznar-Gimeno y José R. Murguía. Nanopartículas para su uso en el tratamiento de infecciones causadas por biofilms. Nº referencia nacional: P202230450. Fecha de registro: 26/05/2022.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

## A

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
<b>ADC</b>	Conjugado anticuerpo-fármaco
<b>ADME</b>	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMF</b>	Campo magnético alterno
<b>AMR</b>	Resistencia a antimicrobianos
<b>APTES</b>	(3-aminopropil) trietoxisilano
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATCC</b>	« <i>American Type Culture Collection</i> »
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>ATRP</b>	Polimerización por radicales de transferencia atómica

## B

<b>BB</b>	Barreras biológicas
<b>BCA</b>	Ensayo del ácido bicinconínico
<b>βCD</b>	β-ciclodextrinas
<b>BET</b>	Brunauer-Emmett-Teller
<b>BHI</b>	Medio « <i>Brain Heart Infusion Broth</i> »
<b>BIBB</b>	Bromuro de bromoisobutirilo

**BJH** Barrett-Joyner-Halenda

**BNZ** Benzimidazol

## C

**CARPA** Pseudoalergia relacionada con la activación del complemento

**CAR-T** Terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos

**CB** Curcubiturilos

**CBS** Cistationina β-sintasa

**CD** Ciclodextrina

**CFU** Unidad formadora de colonias

**CH** Hidróxido de calcio

**CHX** Digluconato de clorhexidina

**CLR** Claritromicina

**CLSM** Microscopía confocal láser de barrido

**CTAB** Bromuro de cetiltrimetilamonio

**CV** Cristal violeta

## D

**D** Coeficiente de difusión

**D<sub>0</sub>** Coeficiente de difusión en equilibrio

**DAPI** 4', 6'-diamidino-2-fenilindol

**DCF** 2', 7'-diclorofluoresceína

**DCFDA** Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína

**D<sub>eff</sub>** Coeficiente de difusión efectivo

<b>DI</b>	Agua desionizada	<b>FDA</b>	« <i>Food and Drug Administration</i> »
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz	<b>F<sub>drag</sub></b>	Fuerza de resistencia de los fluidos
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina	<b>FE-SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
<b>DMEM</b>	Medio « <i>Eagle</i> » modificado por Dulbecco	<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>F<sub>prop</sub></b>	Fuerza de propulsión de los nanomotores
<b>DNAasa</b>	Desoxirribonucleasa	<b>FPS</b>	Fotogramas por segundo
<b>Doxo</b>	Doxorrubicina	<b>FTIR</b>	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfatidilcolina		
<b>DPPE</b>	1,2-Bis(difenilfosfino)etano		
<b>DSMZ</b>	« <i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> »		
<b>DTT</b>	Ditiotreitol		
<b>E</b>		<b>G</b>	
<b>e-beam</b>	Deposición física de vapor por haz de electrones	<b>GA</b>	Glutaraldehído
<b>ECM</b>	Matriz extracelular	<b>GOx</b>	Glucosa oxidasa
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrócloruro	<b>GRAS</b>	Generalmente reconocidas como seguras
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>GSH</b>	L-glutatión reducido
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento	<b>GTPMS</b>	(3-glicicloxipropil) trimetoxisilano
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares	<b>H</b>	
<b>F</b>		<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular media
<b>FA</b>	Ácido fólico   Fosfatasa alcalina	<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal	<b>HR-TEM</b>	Microscopía electrónica de alta resolución
<b>FCS</b>	Espectroscopía de correlación de fluorescencia	<b>I</b>	
		<b>IC</b>	Índice celular
		<b>ICEP</b>	Electroforesis de carga inducida

<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo	<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>IFP</b>	Presión de fluido intersticial	<b>MSD</b>	Desplazamiento cuadrático medio
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa	<b>MSN</b>	Nanopartícula mesoporosa de sílice
<b>IR</b>	Radiación infrarroja	<b>N</b>	
<b>iRNA</b>	Ácido ribonucleico de interferencia	<b>NA</b>	Nanodispositivo no ensamblado
<b>J</b>		<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>JAM</b>	« <i>Junctional adhesion molecules</i> »	<b>NHS</b>	N-hidroxisucinimida
<b>K</b>		<b>NIR</b>	Luz infrarroja cercana
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten	<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>L</b>		<b>NTA</b>	Análisis de seguimiento de nanopartículas
<b>LbL</b>	« <i>Layer by layer</i> »	<b>O</b>	
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dosis letal para el 50 % de la población	<b>OCT</b>	« <i>Optimal cutting temperature</i> »
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa	<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad	<b>P</b>	
<b>LSPR</b>	Resonancia plasmónica superficial localizada	<b>PA</b>	PTDA modificado con APTES
<b>M</b>		<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>MCM</b>	« <i>Mobile Composition of Matter</i> »	<b>PASP</b>	Ácido poliaspártico
<b>MET</b>	Metronidazol	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>MN</b>	Nitrato de miconazol	<b>PDA</b>	Polidopamina
<b>MOF</b>	Marcos organometálicos	<b>PDT</b>	Terapia fotodinámica
<b>MPTMS</b>	Mercaptopropil trimetoxisilano	<b>PEG</b>	Poli(etilenglicol)
		<b>PEI</b>	Poli(eterimida)
		<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones

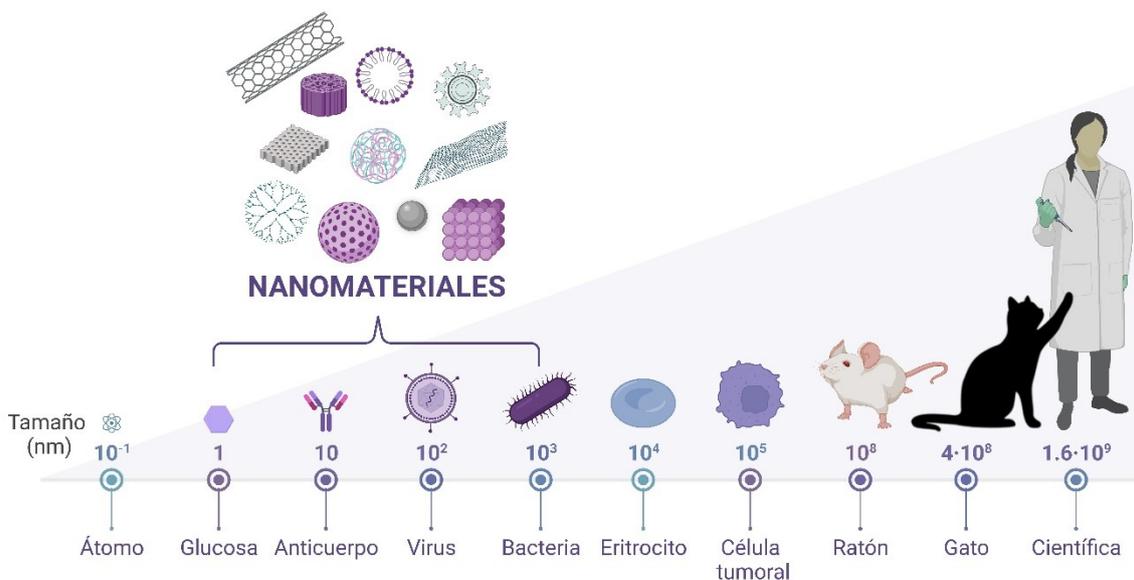
<b>PFA</b>	Paraformaldehído	<b>SPION</b>	Nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro
<b>PI</b>	Punto isoeléctrico	<b>STEM-EDX</b>	Microscopía electrónica de transmisión de barrido acoplada a espectroscopía electrónica de rayos x
<b>PIPS</b>	Transmisión fotoacústica inducida por fotones	<b>STM</b>	Microscopio de efecto túnel
<b>PLGA</b>	Poliácido láctico-co-glicólico	<b>SWEEPS</b>	Emisión fotoacústica mejorada por onda de choque
<b>PMAM</b>	Poliamidoamina	<b>T</b>	
<b>PNIPAM</b>	Poli(N-isopropilacrilamida)	<b>TAP</b>	Pasta triple antibiótica
<b>PS</b>	Poliestireno	<b>TBOS</b>	Tetrabutyl ortosilicato
<b>PTDA</b>	Dianhídrido 3,4,9,10-perilenotetracarboxílico	<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>PTT</b>	Terapia fototérmica	<b>TEOS</b>	Tetraetil ortosilicato
<b>PVP</b>	Poli(vinilpirrolidona)	<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>PXRD</b>	Difracción de rayos X de polvo	<b>TMOS</b>	Tetrametil ortosilicato
<b>R</b>		<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Rh</b>	Rodamina B	<b>U</b>	
<b>RNAse</b>	Ribonucleasa	<b>US</b>	Ultrasonidos
<b>Re</b>	Número de Reynolds	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno	<b>V</b>	
<b>RPMI</b>	Medio « <i>Roswell Park Memorial Institute</i> »	<b>V</b>	Velocidad (instantánea y balística)
<b>S</b>		<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo	<b>VLP</b>	Partículas basadas en virus
<b>SD</b>	Desviación estándar	<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa	<b>W</b>	
<b>SEM</b>	Error estándar de la media	<b>Wt</b>	Porcentaje en peso
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear		
<b>SI</b>	Sistema inmunitario		

**CAPÍTULO I:**  
**INTRODUCCIÓN**  
**GENERAL**



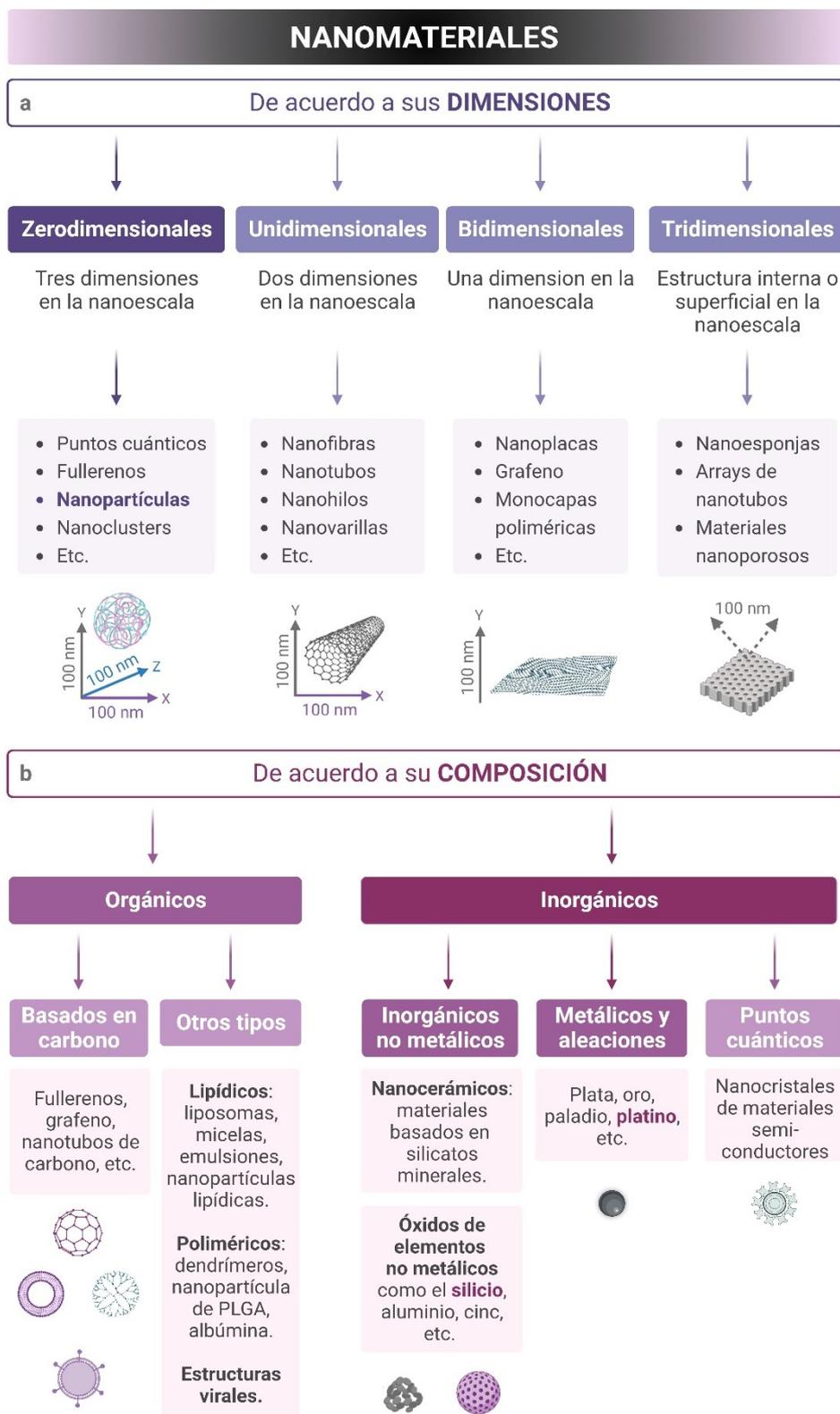
## I.1 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES: CONCEPTOS BÁSICOS

La **nanotecnología** consiste en manipulación de la materia a escala atómica y/o molecular.<sup>1</sup> Este concepto fue introducido por Feynman a la comunidad científica a mediados del siglo XX con la conocida frase «*There is plenty of room at the bottom*».<sup>2</sup> El término nanotecnología fue acuñado años después por Taniguchi.<sup>3</sup> Sin embargo, no alcanzó popularidad hasta finales del siglo XX, gracias, entre otros, a los trabajos de Drexler<sup>4</sup> y al desarrollo del microscopio de efecto túnel (STM) por Binnig y Rohrer.<sup>5</sup> Desde entonces, la nanotecnología ha experimentado un gran auge, lográndose importantes avances en su estudio y aplicación. Se trata de un área de investigación altamente multidisciplinar que engloba disciplinas como la física, la química, la ingeniería y la biología. Entre ellas destaca la ciencia de los materiales con el diseño y construcción de nuevos **nanomateriales sintéticos**. Como su prefijo nano- del latín *nanus* («enano») indica, los nanomateriales se definen como estructuras que tienen al menos una de sus dimensiones (x, z e y) en la escala nanométrica (1 nanómetro =  $10^{-9}$  metros). Es decir, aproximadamente entre 1 y 100 nm. Sin embargo, existe controversia entre distintas organizaciones regulatorias para establecer el umbral superior, pudiendo alguna de ellas definir nanomateriales con dimensiones de hasta  $10^3$  nm (**Figura I.1**). En cambio, si su tamaño se encuentra entre  $10^3$  y  $10^6$  nm son considerados micromateriales ( $1 \mu\text{m} = 10^6$  nm).<sup>6</sup>



**Figura I.1. Esquema comparativo del rango de tamaño de los nanomateriales ( $\sim 1\text{-}10^3$  nm) y distintos elementos.**

Los nanomateriales se pueden clasificar en función de diferentes parámetros, entre los que destacan sus dimensiones espaciales y su composición. En este sentido, los nanomateriales se dividen en zerodimensionales (0D), si todas sus dimensiones están incluidas en la nanoescala, como las **nanopartículas**; unidimensionales (1D), si una de ellas no lo está, como las nanofibras; o bidimensionales (2D), si dos de ellas no lo están, como las nanoplacas. Los materiales nanoestructurados o tridimensionales (3D) tienen sus 3 dimensiones excluidas del rango nanométrico, pero se consideran nanomateriales si sus estructuras internas o superficiales se encuentran en la nanoescala (**Figura I.2a**).

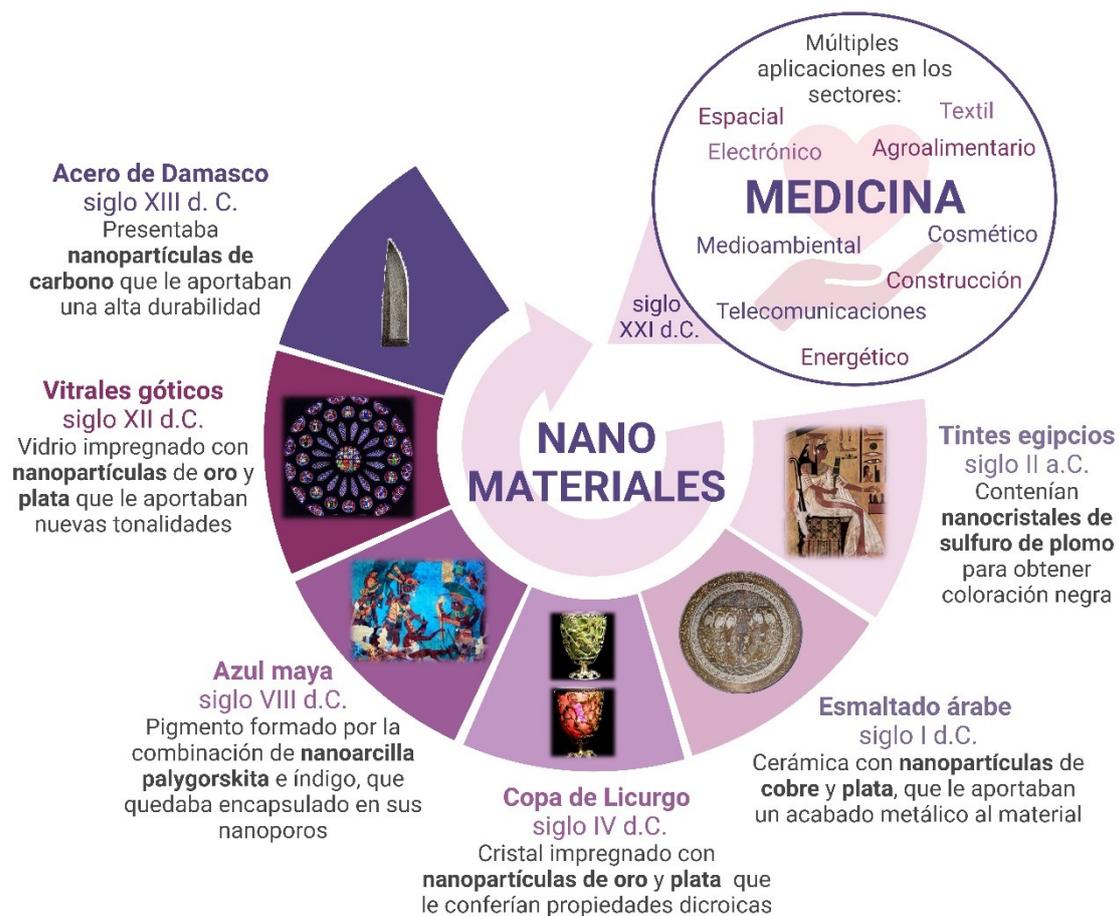


**Figura 1.2. Clasificación de los nanomateriales. a** En función de sus dimensiones. **b** En función de su composición.

En función de su composición química, los nanomateriales se categorizan en 2 grupos principales: orgánicos e **inorgánicos**. A su vez, éstos pueden clasificarse en distintos subgrupos, así como combinarse entre ellos. Algunos ejemplos son los nanomateriales orgánicos basados

en carbono, los lipídicos, los poliméricos, los dendrímeros, los **inorgánicos no metálicos**, los **metálicos** y aleaciones y los «*quantum dots*» (**Figura I.2b**).<sup>6</sup> Cabe destacar que, además de tener un origen manufacturado, los nanomateriales pueden encontrarse de forma natural en el medioambiente, como las partículas emitidas por las erupciones volcánicas, o generarse de forma fortuita como subproducto de otros procesos, como las partículas de carbono emitidas por la combustión de combustibles fósiles.<sup>7</sup>

El reducido tamaño de los nanomateriales y, por tanto, el confinamiento espacial de sus átomos hace que presenten nuevas propiedades mecánicas, ópticas, magnéticas, eléctricas, térmicas y catalíticas.<sup>8</sup> Estas características únicas están ausentes a escala macroscópica y convierten a los nanomateriales en herramientas con un gran potencial en sectores estratégicos. Algunos de los sectores en los que se aplican son el energético, el electrónico, el de las telecomunicaciones, el espacial, el de la construcción, el textil, el cosmético, el agroalimentario, el medioambiental y el de la medicina, entre otros. Cientos de productos que contienen nanomateriales sintéticos ya se usan en catálisis, baterías, revestimientos, sensores, cremas, tejidos y dispositivos médicos; y se espera que ese número crezca exponencialmente en los próximos años.<sup>9</sup> No obstante, el empleo práctico de los nanomateriales se remonta mucho atrás, encontrándose ejemplos en distintas civilizaciones a lo largo de la historia (**Figura I.3**).<sup>10</sup>



**Figura I.3. Escala temporal mostrando el uso de nanomateriales para distintas aplicaciones en las Edades Antigua, Media y Contemporánea.**

## I.2 NANOMEDICINA

En la actualidad una de las aplicaciones más relevantes de los nanomateriales es el campo de la salud, dando lugar a la **nanomedicina**. Esto se debe a que, debido a sus propiedades, los nanomateriales son capaces de interactuar a nivel molecular con elementos extra- e intracelulares de los sistemas biológicos generando efectos de gran interés biomédico. La nanomedicina mejora el rendimiento de los dispositivos médicos tradicionales, enfocándose en dos áreas generales: el diagnóstico de enfermedades, nanodiagnóstico; y su tratamiento, **nanoterapia**. La nanoterapia incluye nanodispositivos con efecto terapéutico por sí mismos y nanodispositivos con la habilidad de transportar y entregar fármacos y otras moléculas bioactivas. Además, se avanza hacia el diseño de estrategias teragnósticas que combinan terapia y diagnóstico en un mismo nanomaterial (**Figura I.4**).<sup>11</sup>

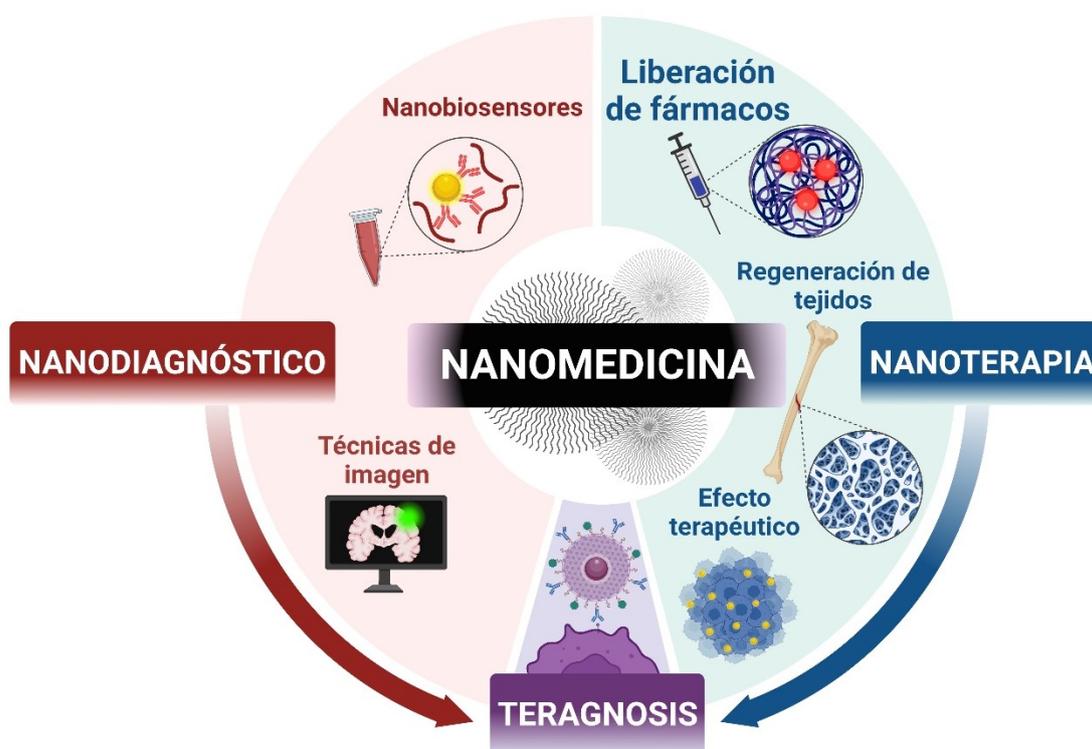
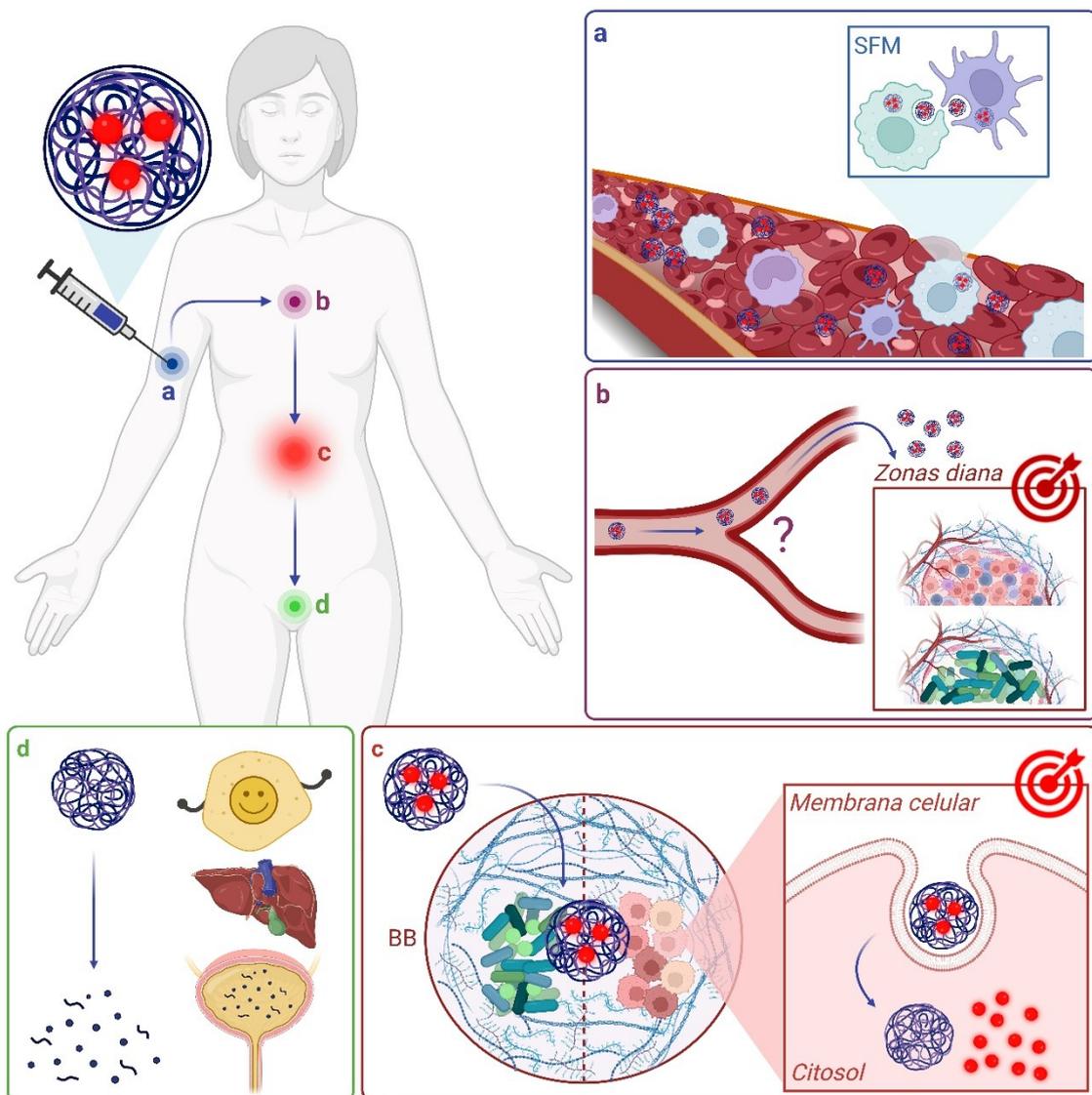


Figura I.4. Áreas de aplicación de la nanomedicina: nanodiagnóstico, nanoterapia y teragnosis.

### I.2.1 Requisitos para la aplicación de los nanomateriales en nanomedicina

Para una implementación segura y eficaz de los nanomateriales en nanomedicina, éstos tienen que cumplir necesariamente una serie de requerimientos, que han de ser evaluados en profundidad de forma previa a su aplicación.<sup>12,13</sup> En primer lugar, se ha de asegurar su biocompatibilidad, descartando posibles efectos citotóxicos, inmunogénicos, hemolíticos o trombogénicos tanto de los nanomateriales como de sus productos de degradación.<sup>14</sup> También ha de estudiarse su farmacocinética y farmacodinámica, determinándose su tasa de absorción (A), su distribución (D) en sangre y tejidos, su metabolismo (M) y su excreción (E) (parámetros ADME). En ese sentido se ha de garantizar la biodegradabilidad y eliminación última del organismo de los nanomateriales una vez han desempeñado su función, descartando su posible bioacumulación.<sup>15</sup>

Por último, para una implementación efectiva de los nanomateriales, éstos tienen que superar ciertos obstáculos biológicos y físicos para realizar sus operaciones específicas. Por un lado, su captación por macrófagos y células dendríticas del sistema fagocítico mononuclear (SFM), que se encargan de eliminar cuerpos extraños del torrente sanguíneo por opsonización y posterior fagocitosis.<sup>16</sup> Por otro lado, su extravasación desde la sangre a los tejidos y la posterior superación de **barreras biológicas (BB)** hasta llegar a las áreas de interés terapéutico donde han de llevar a cabo sus funciones, lo que supone uno de los principales retos de la nanomedicina.<sup>17</sup> Finalmente, en el caso de los nanomateriales destinados a objetivos intracelulares, éstos han de cruzar las membranas de las células diana para poder acceder al citosol (**Figura I.5**).



**Figura I.5. Aspectos que han de reunir los nanomateriales para su implementación segura y eficaz en nanomedicina. a** Sobrevivir en un ambiente hostil: secuestro por las células del SFM. **b** Alcanzar las áreas terapéuticas: navegar por el torrente sanguíneo y extravasarse en las zonas diana. **c** Superar las BB, acceder al interior celular y llevar a cabo sus funciones. **d** Ser degradados y eliminados del organismo sin inducir toxicidad.

Más de 20 nanoterapias han superado los requisitos expuestos y ya han sido aprobadas para uso clínico por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), **Tabla I.1.**<sup>12</sup> Cabe por ejemplo destacar, por su gran efectividad e impacto en la sociedad, las vacunas contra el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), que consisten en nanopartículas lipídicas para la entrega de ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Asimismo, en la actualidad más de 150 nanomateriales están siendo evaluados en ensayos clínicos activos y miles en estudios preclínicos. Una cifra indicativa de la dimensión de este campo es que en 2022 se publicaron más de 25.000 artículos de investigación sobre nanomateriales terapéuticos (*fuentes: «Web of Science»*). En conjunto, estos datos evidencian la enorme importancia y proyección de la nanomedicina, así como la necesidad de continuar la investigación para lograr la traslación clínica segura y efectiva de los nuevos nanodispositivos.

**Tabla I.1. Lista de nanoterapias representativas aprobadas por la EMA.** Fuente: *ema.europa.eu*.

NANOTERAPIA	TIPO	CARGA	APLICACIÓN
<b>mRNA-1273</b> (Moderna)	Nanopartículas lipídicas	ARNm	Vacuna COVID-19
<b>BNT-162b2</b> (Pfizer-BioNTech)	Nanopartículas lipídicas	ARNm	Vacuna COVID-19
<b>ALN-TTR02</b> (AlnylamPharmaceuticals)	Nanopartículas lipídicas	ARN de interferencia (iRNA)	Amiloidosis
<b>Myocet</b> (Teva)	Liposomas	Doxorubicina	Cáncer de mama
<b>Mepact</b> (Millenium)	Liposomas	Mifamurtida	Osteosarcoma
<b>Vyxeos</b> (Jazz Pharmaceuticals)	Liposomas	Daunorrubicina y citarabina	Leucemia mieloide aguda
<b>Abraxane</b> (Celgene)	Nanopartículas de albúmina	Paclitaxel	Cáncer de pulmón no microcítico avanzado, cáncer de mama metastático y cáncer de páncreas metastático
<b>NanoTherm</b> (Magforce)	Nanopartículas de óxido de hierro	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Glioblastoma, cáncer de próstata y cáncer de páncreas
<b>AmBisome</b> (GileadSciences)	Liposomas	Anfotericina B	Infecciones fúngicas
<b>Visudyne</b> (Bauschand Lomb)	Liposomas	Veteporcina	Degradación macular

### I.2.2 Nanomateriales más usados en nanomedicina

Los nanomateriales para diagnóstico se implementan en nanobiosensores que reconocen biomoléculas específicas y las transforman en señales cuantificables, como la prueba de diagnóstico por antígenos de SARS-CoV-2 que incorpora nanopartículas de oro coloidal;<sup>18</sup> o bien como agentes de contraste o marcadores fluorescentes en técnicas de diagnóstico por imagen médica. En ese caso, los ejemplos más conocidos son las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro<sup>19</sup> para resonancia magnética de imagen (MRI) y los

puntos cuánticos.<sup>20</sup> En general, el nanodiagnóstico permite la identificación de nuevos analitos y supera en precisión y sensibilidad a los métodos tradicionales, facilitando la detección precoz y fiable de múltiples patologías.

Muchos nanomateriales para terapia se orientan a la medicina regenerativa y a la eliminación de células tumorales o patógenos. Por sus óptimas propiedades biomecánicas y biomiméticas, los nanodispositivos actúan como soporte para inducir la proliferación celular, reparando y reemplazando tejidos y órganos enfermos o dañados. Destaca el uso de materiales nanocerámicos como las nanopartículas de hidroxiapatita en implantes óseos y dentales.<sup>21,22</sup> En cambio, por sus propiedades electromagnéticas y térmicas, los nanomateriales son muy empleados en terapias con fines citotóxicos. Destaca el uso de nanopartículas metálicas en cáncer. Concretamente, de oro para terapia fotodinámica (PDT),<sup>23</sup> de oro y óxido de hierro para terapia fototérmica (PTT)<sup>24</sup> y de óxido de hafnio para radioterapia.<sup>25</sup> Las nanopartículas de plata cuentan con actividad antibacteriana intrínseca, siendo muy empleadas para tratamientos antimicrobianos.<sup>26</sup>

Sin embargo, el objeto principal de la investigación en nanoterapia es el desarrollo de **nanomateriales para la liberación de fármacos y/o biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas**. Esta aplicación ha surgido debido a la necesidad de resolver los inconvenientes que presenta la administración de agentes terapéuticos de forma libre: inespecificidad, biodistribución inadecuada, rápido metabolismo y eliminación, y efectos no deseados en tejidos sanos. En conjunto, las características que hacen a los nanomateriales tan atractivos para este sector son: su elevada relación superficie/volumen, su gran capacidad y eficacia de cargado y la posibilidad de incorporar ligandos específicos en su superficie, que lleva a la orientación de los nanodispositivos hacia las dianas de interés. Además, es remarcable que la encapsulación de los fármacos los protege frente a su posible degradación enzimática o inactivación química, aumentando su estabilidad, su biodisponibilidad y su farmacocinética. Todo ello da lugar a la entrega de fármacos a las dosis adecuadas en localizaciones específicas, mejorando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios de los tratamientos.<sup>27</sup>

Existen numerosos ejemplos de nanomateriales para la liberación de moléculas de interés. Los de tipo orgánico son los más usados en cáncer e inmunoterapia. Entre ellos destacan los compuestos por lípidos<sup>28-31</sup> y los basados en polímeros naturales o sintéticos.<sup>32-35</sup> Adicionalmente, en últimos años se está explorando la aplicación de partículas basadas en virus (VLP).<sup>36</sup> Los nanomateriales inorgánicos como los metálicos, los «*quantum dots*» y los nanocerámicos son menos empleados por su toxicidad y/o mayor adecuación a otros fines. No obstante, entre todos sobresalen las **nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)**.<sup>37</sup> A continuación, se describen los tipos de nanomateriales para la entrega de moléculas más usados.

### I.2.2.1 Nanomateriales lipídicos para la liberación de fármacos

Dentro de este grupo de nanomateriales, los liposomas son los más comunes. Se trata de vesículas esféricas formadas por una bicapa de fosfolípidos que pueden modificarse sucesivamente con más capas concéntricas formando liposomas multilamerales. Tienen un tamaño entre 50 y 450 nm y muestran una gran biocompatibilidad y biodegradabilidad al estar

compuestos por elementos endógenos de los seres vivos, aunque pueden presentar cierta toxicidad derivada del surfactante empleado en su síntesis. Poseen alta capacidad de carga y carácter anfipático que permite el transporte dual de moléculas hidrofílicas en su interior polar y de moléculas hidrofóbicas en su exterior apolar.<sup>38</sup> Sus inconvenientes son: alto grado de polidispersidad en tamaño; fuga de la carga; baja estabilidad en sangre, al sufrir un alto grado de captación por las células del SFM e interactuar con otras vesículas como las lipoproteínas de alta (HDL) y baja (LDL) densidad; y aparición de un síndrome de hipersensibilidad aguda tras su administración repetitiva, el cual depende de la activación de la respuesta inmunitaria innata a través del sistema de complemento (CARPA).<sup>39</sup>

Otros nanomateriales lipídicos son las micelas,<sup>40</sup> las emulsiones<sup>41</sup> y las nanopartículas lipídicas sólidas.<sup>42</sup> Las micelas están compuestas por lípidos anfipáticos autoensamblados. Están indicadas para el transporte de sustancias hidrofóbicas y pueden ser administradas de forma intravenosa, transdérmica o mediante inhalación. Su principal desventaja es que en ocasiones no son capaces de liberar sus cargas debido a la fuerza de las interacciones hidrofóbicas que éstas establecen con los núcleos de las micelas.<sup>40,43</sup> Las emulsiones están compuestas por mezclas de lípidos, surfactantes, cosolventes y fármacos. En ellas las drogas quedan incluidas en la estructura del nanomaterial, lo que puede afectar a su funcionalidad. Son interesantes para la administración oral, aunque pueden producir cierta toxicidad por su rápida asimilación digestiva.<sup>41,43</sup> Las nanopartículas lipídicas sólidas exhiben mayor estabilidad que el resto de los nanomateriales lipídicos, así como posibilidad de administración por diversas rutas.<sup>42</sup> Sin embargo, todavía no han alcanzado un alto grado de desarrollo.

### **I.2.2.2 Nanomateriales poliméricos para la liberación de fármacos**

Estos nanomateriales actúan mediante la conjunción de fármaco y polímero formando «profármacos poliméricos». Es un grupo muy diverso que incluye polímeros naturales, como proteínas, ácidos nucleicos, celulosa, glucanos o almidones;<sup>44-48</sup> y artificiales o sintéticos, como poliésteres, poliaminas, polietilenglicol (PEG), polietilenimina (PEI), poliacrilamida y combinaciones metalorgánicas (MOF).<sup>49-53</sup> En general tienen un tamaño entre 10 y 1000 nm y son muy biocompatibles y biodegradables.

Entre los nanomateriales poliméricos naturales destacan las nanopartículas de albúmina<sup>54</sup> y los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).<sup>55</sup> Las nanopartículas de albúmina se emplean para el transporte de fármacos poco hidrosolubles, ya que la albúmina cuenta con residuos hidrofóbicos. Presentan la ventaja de ser fácilmente captadas por las células gracias a la existencia de receptores específicos para albúmina.<sup>54</sup> Los ADC están basados en la unión reversible de fármacos a anticuerpos y tienen una gran proyección por su simplicidad y elevada especificidad hacia las dianas terapéuticas.<sup>55</sup> Como inconveniente, resalta que estos nanomateriales están expuestos a una fácil degradación enzimática en sangre.

Entre los nanomateriales poliméricos sintéticos, destacan las nanopartículas de poliácido láctico-co-glicólico (PLGA)<sup>56</sup> y los dendrímeros de poliamidoamina (PMAM).<sup>57</sup> El PLGA es un copolímero hidrofóbico biodegradable y no tóxico que puede transportar eficazmente fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.<sup>56</sup> Varias formulaciones que contienen este polímero ya han sido aprobados para su uso por las agencias reguladoras. Sin embargo, todavía

existen problemas para estandarizar su producción industrial.<sup>58</sup> Los dendrímeros son polímeros esféricos muy ramificados y fácilmente modificables, cuya principal virtud es su alta versatilidad. A pesar de ser seguros habitualmente, pueden inducir inmunogenicidad y cierta toxicidad cuando su tamaño es elevado.<sup>57</sup>

### I.2.2.3 Estructuras virales para la liberación de fármacos

Esta estrategia aprovecha la eficacia de los virus para portar moléculas hasta las células, pero elimina su capacidad infecciosa. Las VLPs consisten en virus en los que el genoma se ha descartado o inactivado, manteniendo la cápside. Su tamaño está entre 20 y 150 nm y son muy homogéneas y estables. Tienen una gran cavidad interna que admite la carga de moléculas grandes y pueden producirse en grandes cantidades de forma biológica. Es muy interesante su aplicación en vacunología, terapia oncolítica y entrega dirigida al núcleo celular.<sup>59-61</sup> No obstante, el desarrollo de las VLPs aún es inmaduro y se enfrenta al reto de controlar la inducción de una respuesta inmunitaria descontrolada.

## I.3 NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE SÍLICE PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Las MSNs fueron descritas inicialmente por la compañía Mobil en los años 90 para su uso en catálisis petroquímica. Las denominaron familia de fases M41S y a sus distintos integrantes los codificaron como «*Mobile Composition of Matter*» (MCM). El rasgo común de todas ellas es la posesión de mesoporos, *i.e.*, poros con un tamaño comprendido entre 2 y 50 nm. Si las dimensiones de los poros son menores de 2 nm, los materiales se denominan microporosos y si superan los 50 nm, macroporosos.<sup>62</sup> En función de la estructura de los mesoporos algunos ejemplos son: MCM-50, con disposición laminar; MCM-48, con disposición cúbica; y **MCM-41** con **canales de poros unidireccionales con disposición hexagonal** (estructura similar a un panel).<sup>63,64</sup> Por sus propiedades fisicoquímicas, los materiales mesoporosos se han destinado a multitud de aplicaciones durante las últimas décadas. Se han usado para catalizar reacciones químicas,<sup>65</sup> adsorber gases y productos químicos,<sup>66</sup> detectar sustancias<sup>67</sup> y liberar fármacos.<sup>68</sup>

### I.3.1. Síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice

La síntesis de los materiales M41S está basada en el método de Stöber.<sup>69</sup> Es un proceso sol-gel en el que monómeros en solución (sol) se transforman en una red integrada (gel) en presencia de agente director de la estructura. Incluye dos pasos: condensación e hidrólisis en medio básico. En primer lugar, un surfactante catiónico o tensioactivo (generalmente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a baja concentración) forma micelas individuales en un disolvente polar. A su vez, las micelas se autoensamblan en supramicelas que siguen un patrón hexagonal. Éstas controlan la formación de los poros, pues el precursor de sílice (generalmente tetraetil ortosilicato (TEOS), tetrametil ortosilicato (TMOS), tetrabutil ortosilicato (TBOS), silicato de sodio o silicato de tetrametilamonio) condensa alrededor de ellas. Seguidamente se produce la hidrólisis de las moléculas de sílice formando grupos silanol (Si-OH) que polimerizan en red formando grupos siloxano (Si-O-Si) en torno a las supramicelas. Finalmente, se elimina el surfactante mediante calcinación o extracción en fase líquida, produciendo el material mesoporoso final. Para la síntesis de MCM-41, se emplea TEOS como precursor de sílice y las condiciones de reacción son temperatura de 80 °C y agitación durante 2 h (**Figura I.6**).<sup>70</sup> Este

procedimiento puede ser ligeramente modificado en función de la naturaleza del precursor de sílice, estructura de las supramicelas, temperatura, pH, tiempo de reacción, fuerza iónica, presencia de aditivos o ritmos de agitación para obtener variaciones en la estructura porosa o en la morfología del material.<sup>71</sup>

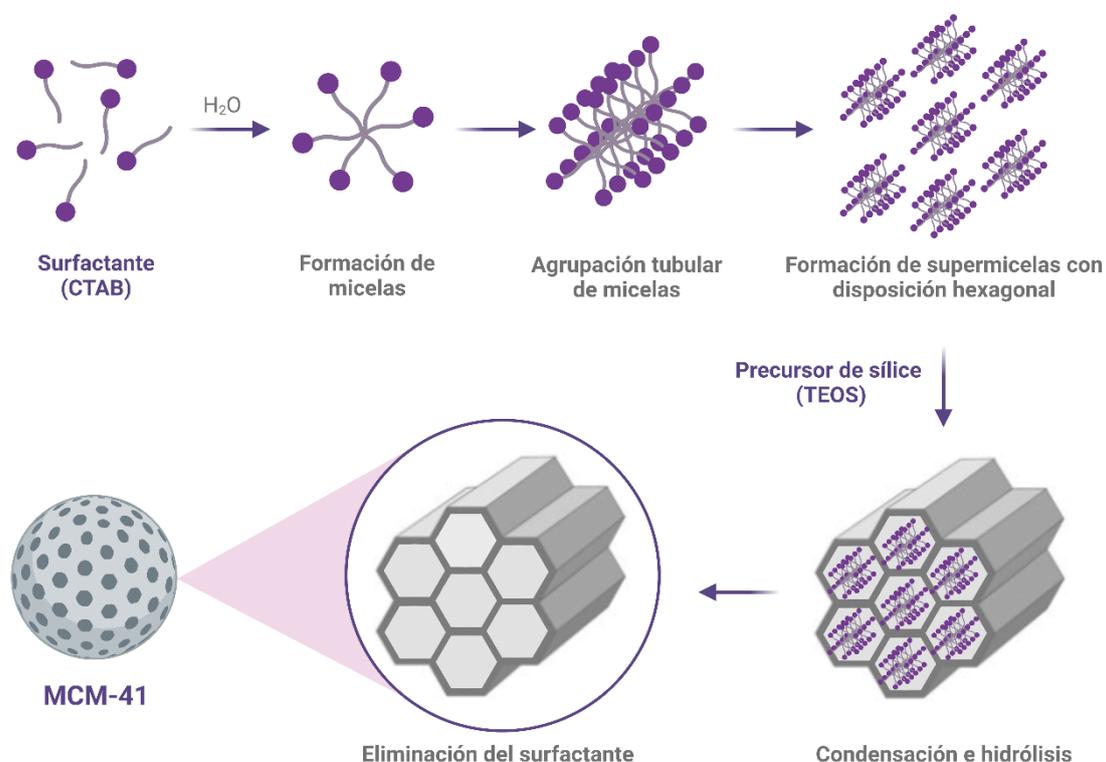


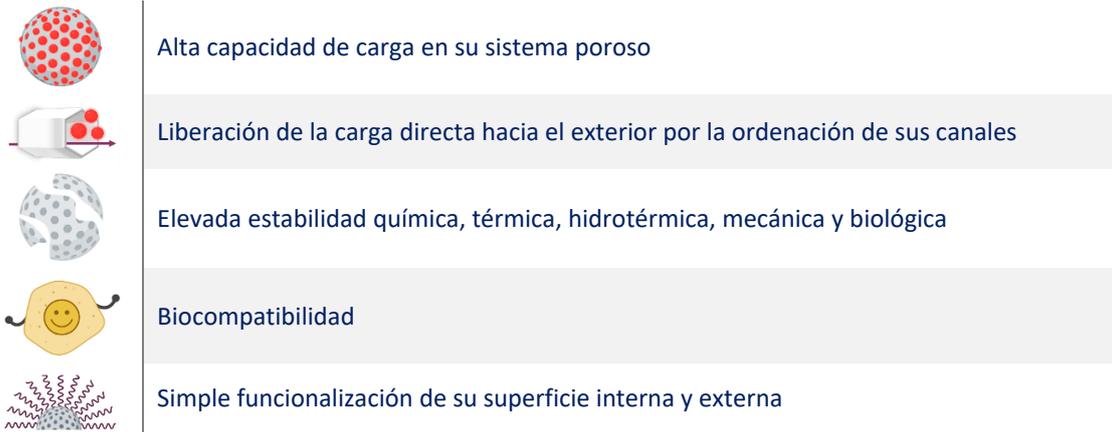
Figura I.6. Procedimiento para la síntesis de MCM-41.

### I.3.2. Propiedades de las nanopartículas mesoporosas de sílice

La aplicación de esta familia de materiales, y en concreto, de los de tipo MCM-41 para la encapsulación y liberación de fármacos en aplicaciones biomédicas ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas debido a que reúnen muchas de las cualidades idóneas para tal fin. A continuación, se detallan algunas de las más importantes (Tabla I.2).<sup>68,72</sup>

Tabla I.2. Lista de las propiedades de los materiales tipo MCM-41.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MATERIALES TIPO MCM-41	
	Fácil síntesis a partir de productos no tóxicos y económicos, que permite su escalado industrial
	Tamaño y forma modulable desde micro- a nanopartículas esféricas uniformes de 100 nm aproximadamente
	Elevada área superficial, hasta $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
	Elevado volumen de poro, alrededor de $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
	Canales de poros ordenados unidireccionales y uniformes con tamaño ajustable entre 2 y 10 nm



Las características fundamentales que hacen a las MSNs candidatas adecuadas para sustituir a los sistemas tradicionales de liberación de fármacos son: su **elevada capacidad de carga**, su **biocompatibilidad** y su **fácil funcionalización**. Debido a su amplia área superficial poseen un gran potencial de almacenaje en su sistema de canales ordenados. Esto conduce a la capacidad de encapsular altas concentraciones de fármacos (1000 veces superior que la de los liposomas), solucionando problemas de solubilidad y protegiéndolos de la degradación durante su transporte.<sup>72</sup> Además, las MSNs pueden adaptarse de forma sencilla para portar desde pequeñas moléculas orgánicas hasta ácidos nucleicos, como mARN, ARN de interferencia (iARN) o plásmidos; y proteínas, como citoquinas, factores de crecimiento o enzimas.<sup>73,74</sup>

### I.3.3. Biocompatibilidad, biodistribución y relevancia clínica de las nanopartículas mesoporosas de sílice

Al contrario que otros nanosistemas, las MSNs se consideran seguras para su aplicación *in vivo*. Los ensayos realizados hasta la fecha indican ausencia de toxicidad aguda o crónica a altas dosis (hasta 80 mg kg<sup>-1</sup> ratón),<sup>75</sup> aunque pueden generar cierto nivel de inflamación, estrés oxidativo, mutagénesis y daño hepático a muy altas concentraciones (500 mg kg<sup>-1</sup> ratón). Esos daños se asocian a la abundancia de grupos silanol (Si-OH) en su estructura que, al estar desprotonados, pueden interaccionar mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con componentes de la membrana y el citoesqueleto celular perturbando su estabilidad.<sup>76</sup> La dosis letal (LD<sub>50</sub>) fue determinada en 1000 mg kg<sup>-1</sup> en ratón.<sup>75</sup>

En cuanto a su modo de interacción con las células eucariotas, en general las MSNs se internalizan mediante pinocitosis. Si bien variaciones en su composición, forma y tamaño influyen las rutas de acceso celular.<sup>77</sup> El mecanismo más común es la endocitosis dependiente de clatrina, por el cual se forma una invaginación en la membrana celular que capta las nanopartículas presentes en el fluido extracelular. Seguidamente se forma una vesícula intracelular que se fusiona sucesivamente con endosomas tempranos y tardíos hasta convertirse en lisosomas, que presentan pH ácido y alta concentración enzimática. Una vez en ellos, las MSNs liberan su contenido. Sin embargo, en algunas aplicaciones esta ruta no es la ideal, pues las enzimas lisosomales pueden degradar ciertas cargas como los ácidos nucleicos. Para evitarla se han diseñado estrategias para inducir el escape lisosomal y liberar el contenido en el citoplasma.<sup>78</sup> Alternativamente, las nanopartículas pueden acceder a las células por fagocitosis,

mediante la formación de una evaginación en la membrana celular que capta una alta cantidad de nanopartículas, pero sólo ocurre en células especializadas como macrófagos y células dendríticas.<sup>77</sup> Por el contrario, las MSNs no son capaces de acceder a las células procariotas, debido a la ausencia de mecanismos de endocitosis y a la presencia de pared celular.<sup>79</sup>

En cuanto a su biodistribución, las MSNs administradas por vía sanguínea se distribuyen sistémicamente.<sup>80</sup> Como muchos nanomateriales, son rápidamente captadas por las células del SFM. Su opsonización se ve favorecida por la formación de una corona proteica alrededor de ellas por la atracción de proteínas del plasma y de los fluidos intercelulares. Esto supone un obstáculo a superar, ya que deriva a las nanopartículas hacia órganos donde los fagocitos son residentes, como los nódulos linfáticos, el bazo, los pulmones o el hígado, limitando la dosis que alcanza su destino. No obstante, las MSNs sufren este proceso en menor grado que los liposomas.<sup>16</sup> Principalmente, las MSNs se acumulan de forma pasiva en tumores sólidos grandes. Este fenómeno se conoce como efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR). Está debido a que los tumores presentan una vasculatura aberrante con vasos sanguíneos dañados y drenaje linfático ineficiente que favorece la extravasación de las nanopartículas desde el torrente sanguíneo hasta ellos.<sup>81</sup> Se ha demostrado que el EPR no solo ocurre en tumores sino también en otros tejidos dañados caracterizados por la presencia de inflamación. Este hecho es clave para la aplicación de las MSNs en la entrega de fármacos, pues de forma natural se dirigen hasta las zonas enfermas.<sup>82</sup> De nuevo, variaciones en su composición, forma y tamaño afectan a su biodistribución.<sup>83</sup>

En cuanto a su excreción, los estudios demuestran que un 90 % de la dosis inyectada es eliminada de forma rápida en 4 días aproximadamente, mientras que el resto puede llegar a encontrarse en el organismo hasta 1 mes después de su aplicación. En condiciones fisiológicas los grupos siloxano (Si-O-Si) se degradan a ácido ortosilícico (Si(OH)<sub>4</sub>) u oligómeros de sílice, que son solubles en agua y de un tamaño óptimo (< 6 nm) para su excreción a través del sistema renal. Por tanto, los productos de la degradación de las MSNs son mayoritariamente expulsados por la orina (70 %). De forma minoritaria (20 %) también se eliminan a través del sistema hepatobiliar.<sup>84</sup> En este punto, es importante recalcar que la mayoría de los estudios de biocompatibilidad y farmacodinámica se realizan en modelos murinos inmunodeficientes y hay que tener cautela para trasladar a humanos los resultados obtenidos.<sup>85</sup> De hecho, las nanopartículas de sílice todavía no han sido aprobadas para uso clínico, pero sí se han calificado como «*generalmente reconocidas como seguras*» (GRAS) por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU. y se permite su uso industrial en cosméticos y aditivos alimentarios (código: 14808-60-7). Además, varios nanomateriales basados en sílice para aplicaciones biomédicas se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos (**Tabla I.3**).

**Tabla I.3. Lista de nanoterapias basadas en MSNs en ensayos clínicos. Fuente: *clinicaltrials.gov*.**

TIPO	APLICACIÓN	FASE	ESTADO	CÓDIGO
<b>MSNs modificadas con nanopartículas de oro y hierro</b>	Tratamiento de la aterosclerosis	-	Completado 2011-2021	NCT01270139
<b>Gel nanocristalino de sílice e hidroxiapatita</b>	Tratamiento de los defectos periodontales	-	Completado 2015-2022	NCT02507596

<b>MSNs cargadas con fluoróforos</b>	Detección de tumores de próstata para guiar su eliminación quirúrgica	1	En reclutamiento 2021-previsto noviembre 2023	NCT04167969
<b>MSNs cargadas con fluoróforos</b>	Detección de las metástasis ganglionares de melanoma para guiar su eliminación quirúrgica	1 y 2	En reclutamiento 2014-previsto abril 2024	NCT02106598

### I.3.4. Funcionalización de las nanopartículas mesoporosas de sílice

Otra de las propiedades de mayor interés es la fácil incorporación de grupos orgánicos a la superficie de las MSNs, funcionalización. Generalmente se consigue en un paso postsíntesis que recibe el nombre de «*grafting*» (Figura I.7). Tiene lugar gracias a la presencia de una alta concentración superficial de grupos silanol (Si-OH) libres, los cuales pueden reaccionar covalentemente con organosilanos mediante una reacción de sustitución nucleofílica. Los más usados son derivados de trialcoxisilanos ((R'O)<sub>3</sub>-Si-R). Los fragmentos R contienen los nuevos grupos funcionales de interés, o bien pueden ser modificados sucesivamente con otras (bio)moléculas o complejos supramoleculares. Por este proceso, los grupos orgánicos se incorporan principalmente en la superficie externa de los materiales manteniendo la estructura mesoporosa inalterada.<sup>86</sup> Además, permite lograr una funcionalización distinta en el interior de los poros y superficie externa si tiene lugar antes de la eliminación del surfactante.<sup>87</sup> Alternativamente, la funcionalización se puede lograr por un proceso conocido como co-condensación, en el que los precursores de sílice y los organosilanos condensan de forma simultánea. Por este proceso, los grupos orgánicos se distribuyen de forma más homogénea pero la estabilidad estructural del material puede verse afectada.<sup>88</sup>

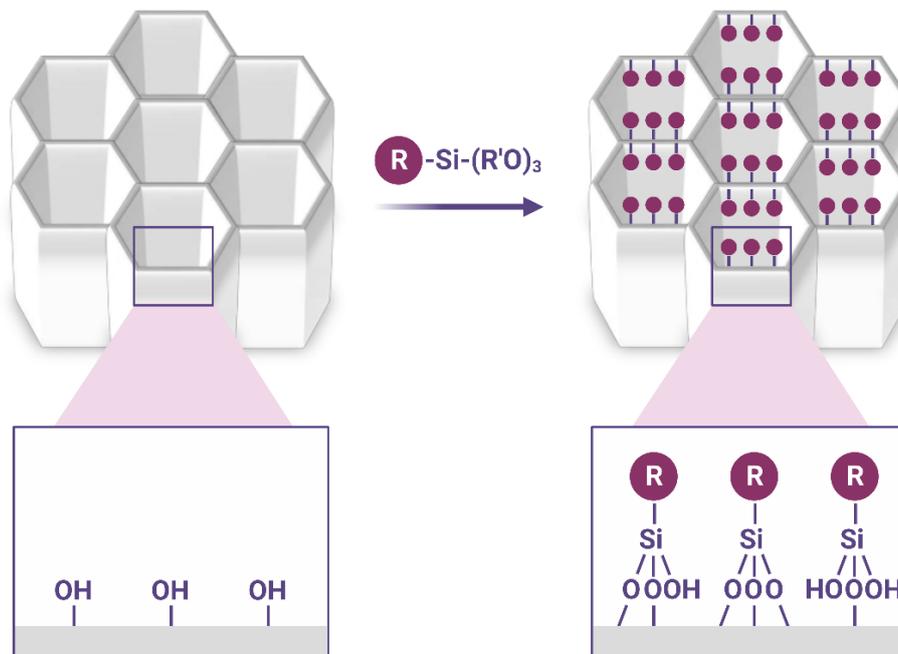


Figura I.7. Funcionalización de las MSNs con organosilanos mediante el procedimiento postsintético de «*grafting*».

Como resultado se generan **nanomateriales híbridos orgánicos-inorgánicos** que combinan las ventajas de los soportes inorgánicos citadas anteriormente con las aportadas por los ligandos orgánicos incorporados. Además, estos materiales híbridos pueden presentar conductas cooperativas que no se encuentran en sus componentes por separado. Entre las nuevas propiedades que estos nanomateriales híbridos pueden poseer se incluyen: diferente carga superficial, reactividad química específica, comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, suspendibilidad, acidez o basicidad, distinta estabilidad y capacidad de adaptar la afinidad por las moléculas a transportar según los requerimientos.<sup>89</sup> Estas nuevas características pueden resultar en cambios en las interacciones de las MSNs con los sistemas biológicos. Por ejemplo, su modificación superficial con grupos que aportan carga positiva favorece la interacción con las membranas celulares y, por tanto, su internalización, pero induce mayor toxicidad.<sup>37</sup> Por otro lado, su funcionalización con PEG incrementa el tiempo de circulación en sangre.<sup>90</sup>

Una de las habilidades más interesantes de los nanomateriales híbridos es la posibilidad de incorporar unidades de direccionamiento, como péptidos, anticuerpos o aptámeros. Estos ligandos son capaces de unirse específicamente a otras moléculas en localizaciones diana («*targeting*»), lo que mejora enormemente la selectividad de las terapias evitando efectos no deseados y daños en tejidos sanos.<sup>37,73</sup> No obstante, sobre todas las habilidades de los nanomateriales híbridos, prepondera el control a demanda del transporte de masa, que da lugar a **nanomateriales capaces de responder a estímulos**.<sup>91,92</sup>

En general los procesos de funcionalización proveen a los nanomateriales de gran versatilidad y funcionalidades avanzadas, abriendo camino al desarrollo de «*nanosistemas inteligentes*» que combinan distintas habilidades en un solo nanodispositivo.

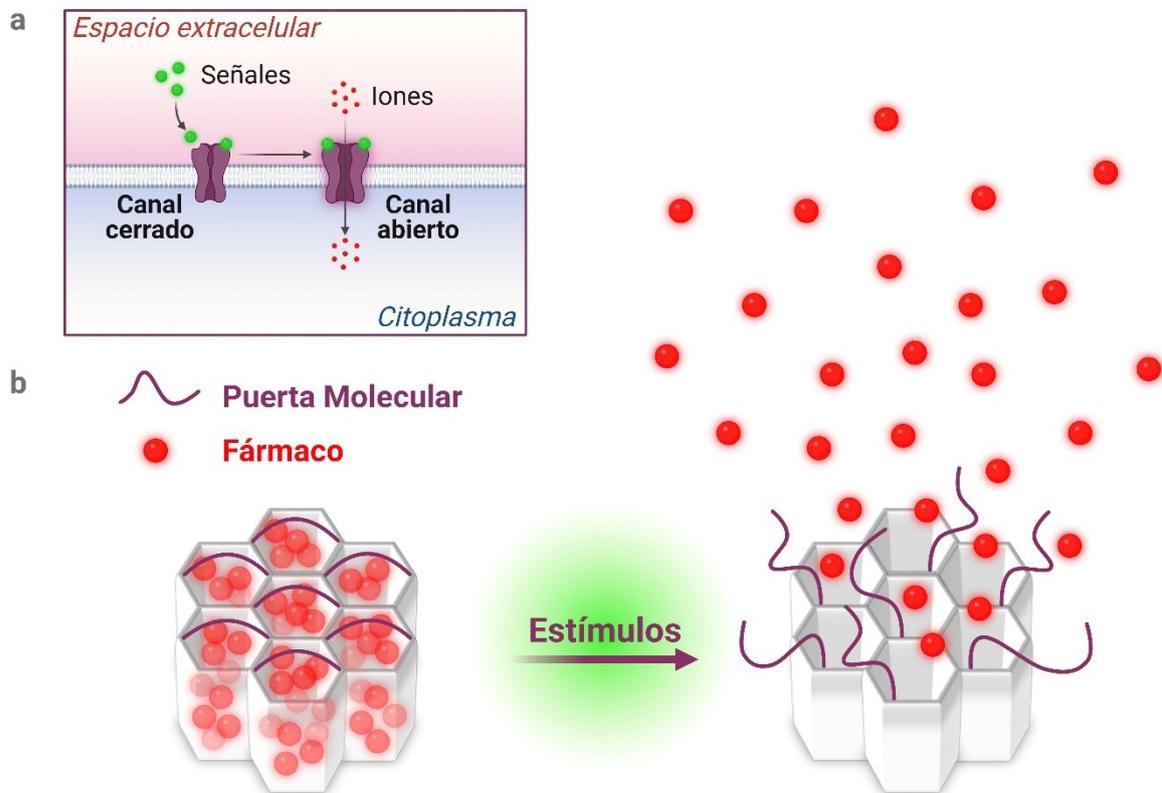
### I.3.5 Liberación de fármacos en respuesta a estímulos: «puertas moleculares»

Las MSNs son uno de los nanovehículos para la entrega de fármacos con mayor proyección porque pueden contar con la capacidad de **controlar la liberación** de su carga, lo cual es clave para lograr el efecto terapéutico deseado. Por el contrario, en el resto de los nanomateriales descritos previamente, la liberación del contenido se produce por simple difusión o por degradación del soporte.

Las MSNs consiguen controlar el momento y lugar de la liberación de su carga como consecuencia de su funcionalización superficial con entidades moleculares o supramoleculares conmutables denominadas «*puertas moleculares*».<sup>93</sup> El concepto de puerta molecular está inspirado en la naturaleza, donde el control del transporte de sustancias entre compartimentos celulares se logra a través de canales cuya apertura y cierre depende de cambios conformacionales tras el reconocimiento de estímulos específicos (**Figura I.8a**).

Del mismo modo, las MSNs modificadas con puertas moleculares están diseñadas para modular a demanda el movimiento de las especies químicas almacenadas hasta el medio exterior y viceversa. Las puertas moleculares cambian de tamaño, de forma o de conformación, o bien son desplazadas en respuesta a señales específicas. Pasando de un estado «*cerrado*», en el que bloquean los mesoporos impidiendo la salida de la carga, a un estado «*abierto*», que activa la liberación controlada de la carga (**Figura I.8b**). Los estímulos que desencadenan este

proceso pueden ser endógenos, como cambios en el potencial redox, pH, enzimas, unión a moléculas diana y temperatura; o exógenos, como temperatura, luz, campos magnéticos y ultrasonidos (US).<sup>94</sup>



**Figura I.8. Puertas moleculares.** **a** Inspiración en los canales de transporte naturales. **b** Descripción de su principio de funcionamiento.

Las puertas moleculares sensibles a **señales endógenas** son las más aplicadas para la liberación controlada de fármacos en sistemas biológicos porque posibilitan el **funcionamiento autónomo** de los nanodispositivos que las contienen. Éstos son capaces de reconocer por sí mismos ciertas condiciones intrínsecas de los seres vivos entregando su carga como consecuencia. En cambio, las puertas moleculares sensibles a señales exógenas son interesantes porque posibilitan el control espaciotemporal de la liberación de forma externa y no invasiva. Los nanodispositivos que las contienen no liberan su carga hasta que no se aplica el estímulo indicado desde fuera del organismo. En comparación con las señales endógenas, los estímulos exógenos son más precisos, pero presentan limitaciones como dificultad para que alcancen tejidos profundos y toxicidad derivada de ellos.<sup>95</sup>

A continuación, se detalla el mecanismo de acción de las puertas moleculares sensibles a ambos tipos de estímulos y se resumen algunos ejemplos de MSNs funcionalizadas con ellas (**Figura I.9**).

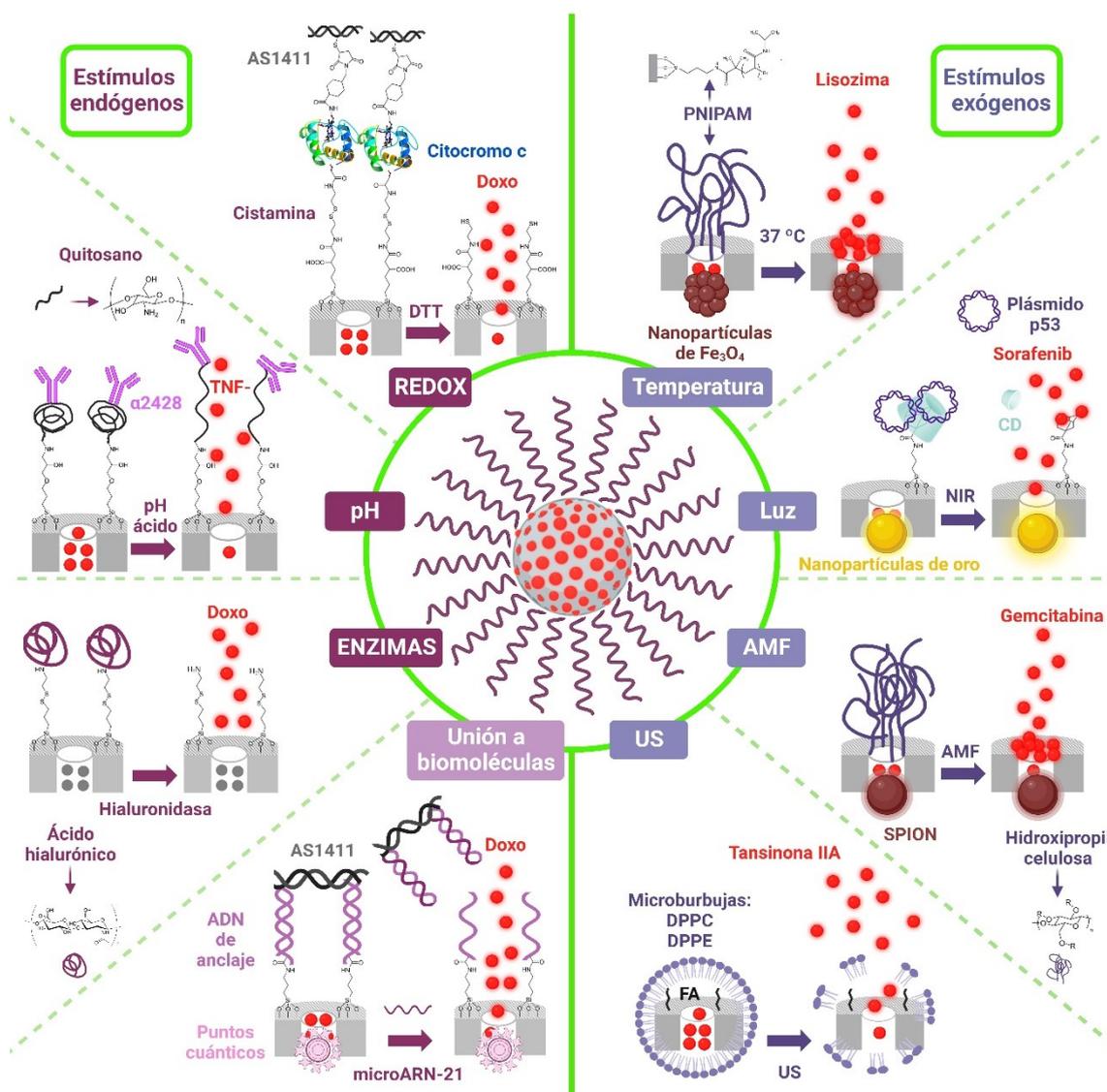


Figura I.9. Ejemplos de MSNs funcionalizadas con puertas moleculares en función de los estímulos a los que son sensibles. Adaptada de Chem. Rev. 2016, 116, 561-718.

### I.3.5.1 Puertas moleculares sensibles a cambios en el potencial redox

Las puertas moleculares que responden a estímulos electroquímicos están inspiradas en la presencia de altas concentraciones de especies con actividad reductora en el citosol celular. Además, las especies redox son más abundantes en células cancerosas y en el microambiente tumoral (TME) que en células y tejidos sanos. Por tanto, las MSNs funcionalizadas con ellas son capaces de liberar fármacos intracelularmente de manera controlada, especialmente en tumores. Los mecanismos de apertura se resumen en 2 tipos: (i) cambios en las interacciones tipo redox entre ligandos unidos a MSNs y complejos supramoleculares y (ii) ruptura de los enlaces disulfuro que unen las puertas moleculares a MSNs.<sup>94</sup>

Un ejemplo de puerta molecular sensible a especies redox fue descrito por Zhang y colaboradores.<sup>96</sup> Para su síntesis funcionalizaron la superficie de MSNs con ácidos carboxílicos siguiendo el método de co-condensación y unieron cistamina a ellos. Tras ello, anclaron la enzima citocromo c a los grupos amino aportados por la cistamina mediante un enlace amida.

Finalmente, unieron el aptámero AS1411 para dotar al nanodispositivo de direccionamiento específico hacia nucleonina, un biomarcador tumoral. Observaron que al poner en contacto el nanodispositivo con ditioneitol (DTT) *in vitro*, éste liberaba una carga modelo (isotiocianato de fluoresceína, FITC) al medio, mientras que en ausencia de DTT la liberación era insignificante. Asimismo, demostraron que el nanodispositivo era capaz de entregar doxorubicina (Doxo) en células cancerosas hepáticas Hep-G2 en respuesta a los altos niveles intracelulares de glutatión (GSH), disminuyendo su viabilidad en cultivo celular y reduciendo el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo murino de xenoinjerto.

En el **capítulo III** se describe en profundidad un nanomaterial que contiene una **puerta molecular accionada por cambios en el potencial redox**.

### I.3.5.2 Puertas moleculares sensibles a cambios en el pH

El diseño de puertas moleculares con grupos funcionales sensibles a procesos de protonación/desprotonación toma ventaja de las diferencias de pH que existen entre distintas áreas en los sistemas biológicos. Por ejemplo, en mamíferos el medio extracelular presenta pH neutro y los compartimentos intracelulares, como endosomas y lisosomas, presentan pH ácido. Igualmente, el tracto gastrointestinal cuenta con cambios abruptos de pH entre sus distintas partes y el TME es comúnmente ácido por la sobreproducción de ácido láctico. En bacterias como *Staphylococcus aureus*, la zona externa de las biopelículas que generan exhibe pH neutro y la zona interna, pH ácido. Así, los nanomateriales funcionalizados con estas puertas moleculares de pH hacen posible ajustar la entrega de los fármacos específicamente hacia esas áreas. La mayoría liberan su contenido en pH ácido, pero también existen ejemplos de liberación en pH básico.<sup>97</sup>

Este tipo de puerta molecular sensible al pH es la más común. Su composición es muy diversa e incluye: poliaminas, complejos metálicos, macrociclos como curcubiturilos (CB) y ciclodextrinas (CD), ácidos nucleicos, péptidos, membranas lipídicas y polímeros como quitosano y PEI.<sup>94</sup> Los mecanismos de liberación se resumen básicamente en 2 tipos: (i) cambios en las interacciones de atracción o repulsión entre los componentes de la puerta molecular y (ii) ruptura de enlaces hidrolizables por pH que unen las puertas moleculares a MSNs, como iminas, hidrazonas, acetales, amidas y ésteres.

Un ejemplo de puerta molecular sensible a pH es el desarrollado por Deng y sus colaboradores.<sup>98</sup> Consistía en MSNs huecas para la entrega del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) en células cancerosas. Para la síntesis de la puerta molecular funcionalizaron MSNs con 3-(glicidloxiopropil)trimetoxisilano (GTPMS) para unir quitosano por una reacción de entrecruzamiento. Adicionalmente, conjugaron el anticuerpo  $\alpha$ 2428 para direccionar a los nanodispositivos hacia cáncer de mama HER-2 positivo. *In vitro*, observaron que los nanodispositivos liberaban una proteína modelo al medio a pH ácido (4), mientras que, a pH neutro (7.4) la liberación era despreciable. Los buenos resultados fueron trasladados a células de cáncer de mama MCF-7 e *in vivo* a un modelo murino de xenoinjerto, demostrando que la liberación específica de TNF- $\alpha$  en el TME suprimía el crecimiento de las células malignas.

En el **capítulo IV** se describe en profundidad un nanomaterial que contiene una **puerta molecular accionada por cambios en el pH**.

### I.3.5.3 Puertas moleculares sensibles a enzimas

En los nanomateriales sensibles a actividad enzimática, las enzimas pueden desempeñar 2 funciones: (i) descomponer los elementos de la puerta molecular o (ii) constituir la propia puerta molecular y que los productos derivados de su actividad catalítica desencadenen su apertura. El primer mecanismo de acción es el más empleado en las aplicaciones biomédicas debido a que ciertas patologías se caracterizan por la sobreexpresión de enzimas. Por ejemplo, las metaloproteasas son biomarcadores de cáncer y la  $\beta$ -galactosidasa de senescencia. Esta estrategia también es interesante para la administración oral de fármacos y para terapias antimicrobianas, pues tanto el sistema digestivo como los microorganismos secretan al medio altas concentraciones de enzimas. Las hidrolasas, las lipasas, las nucleasas, las fosfatasas, las glucosidasas y las oxidorreductasas son las enzimas más usadas para la hidrólisis de puertas moleculares. Cada familia y subtipo reconoce y cataliza secuencias moleculares determinadas. Por consiguiente, los nanomateriales funcionalizados con puertas moleculares sensibles a enzimas son altamente específicos, pues sólo liberan su carga como consecuencia de su actividad.<sup>94</sup>

Un ejemplo fue descrito por Yang y sus colaboradores, quienes diseñaron un nanodispositivo que aprovechaba la sobreexpresión intracelular de hialuronidasas en cáncer para entregar específicamente Doxo.<sup>99</sup> Para formar la puerta molecular co-funcionalizaron MSNs con grupos amino y sulfhidrilo a los que unieron un derivado de ácido hialurónico (HA-His-SS-Py) sensible a la actividad enzimática de las hialuronidasas y a GSH. La puerta molecular evitaba la fuga de la droga en ausencia de las enzimas y facilitaba la liberación de ésta cuando las hialuronidasas estaban presentes en el medio. El hallazgo más relevante fue que los nanodispositivos indujeron citotoxicidad en un modelo de adenocarcinoma de mama resistente a quimioterapia (MCF-7/ADR) tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que, la administración de Doxo libre no generó efectos comparables.

En el **capítulo V** se describe en profundidad un nanomaterial que contiene una **puerta molecular accionada enzimáticamente**.

### I.3.5.4 Puertas moleculares sensibles a moléculas y biomoléculas

El funcionamiento de estos sistemas de bloqueo radica en cambios de conformación o desplazamiento tras la interacción con ciertas moléculas o biomoléculas. Las biomoléculas más empleadas como estímulo son los oligonucleótidos. Las puertas moleculares sensibles a ellos están compuestas por sus cadenas complementarias, de modo que al hibridar se desencadena su desplazamiento del nanomaterial y la consecuente liberación de la carga.<sup>94</sup>

Zhang y su equipo desarrollaron un nanosistema compuesto por puntos cuánticos rodeados de sílice para la entrega de Doxo en presencia de microARN-21, el cual está sobreexpresado en cáncer.<sup>100</sup> Para formar la puerta molecular funcionalizaron las nanopartículas con (3-aminopropil)triétoxosilano (APTES) para aportar grupos amino a la superficie. Posteriormente, unieron una cadena corta de ácido desoxirribonucleico (ADN) de

anclaje modificada con grupos ácidos mediante química EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto/N-hidroxisuccinimida). Por último, bloquearon los poros con un anti-microARN-21 acoplado con el aptámero AS1411 en el extremo 3'. Los dispositivos mostraron liberación de Doxo y toxicidad en células cancerosas HeLa pero no en fibroblastos NIH 3T3, confirmando la especificidad de este tipo de puerta molecular. Además, este mecanismo es muy aplicado en el desarrollo de sensores para la detección de microorganismos como *Mycoplasma fermentans*<sup>101</sup> y *Candida albicans*.<sup>102</sup>

#### I.3.5.5 Puertas moleculares sensibles a temperatura

Los cambios de temperatura pueden actuar como estímulos endógenos y exógenos. En el primer caso, dan lugar a la entrega de los fármacos al alcanzar temperaturas fisiológicas o patológicas (incremento de hasta 5 °C). Sin embargo, la aplicación más atractiva de las variaciones de temperatura es como estímulo exógeno, ya que hacen posible combinar liberación de fármacos con PTT. Para ello, los nanomateriales cuentan con nanopartículas metálicas capaces de transformar radiación electromagnética en calor. Además, están funcionalizados con polímeros termosensibles que cambian de estado conformacional en respuesta a las variaciones de temperatura. En respuesta a la aplicación de luz o campos magnéticos alternos (AMF), la temperatura de estos nanomateriales aumenta y la puerta molecular colapsa provocando el desbloqueo de los mesoporos. La liberación del contenido se suma al efecto citotóxico derivado del incremento excesivo de temperatura generando un efecto terapéutico sinérgico.<sup>94</sup>

Un ejemplo consiste en nanopartículas de sílice que contienen un núcleo de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y están recubiertas por poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM).<sup>103</sup> La puerta molecular se unió mediante polimerización por radicales de transferencia atómica (ATRP), para lo cual la superficie de las nanopartículas fue funcionalizada con APTES y bromuro de bromoisobutirilo (BIBB) previamente. Estos nanodispositivos prevenían la fuga de la carga a temperaturas no fisiológicas (25 °C) y provocaban una liberación abrupta de ésta a partir de 37 °C. Fueron aplicadas con éxito para la entrega de lisozima en *Bacillus cereus*, un patógeno causante de graves intoxicaciones alimentarias.

#### I.3.5.6 Puertas moleculares sensibles a luz

Las puertas moleculares activadas por luz contienen moléculas orgánicas fotosensibles que operan de 3 formas: (i) mediante foto-isomerizaciones *cis-trans*, (ii) mediante foto-rupturas y (iii) mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los 2 primeros mecanismos las especies fotosensibles constituyen la puerta molecular, de modo que su cambio conformacional o ruptura, respectivamente, desencadena la apertura de los mesoporos. En el tercer mecanismo, fotosensibilizadores generan radicales libres que inducen la ruptura de otros grupos sensibles incluidos en la puerta molecular. Son los sistemas accionados por luz más comunes en aplicaciones biomédicas, ya que pueden producir un efecto terapéutico sinérgico entre la citotoxicidad de las ROS y la liberación adicional de fármacos. Cabe destacar que la mayoría de los nanosistemas funcionalizados con estas puertas moleculares están diseñados para responder a luz infrarroja cercana (NIR) al ser más penetrante en los tejidos que la luz del espectro visible y ultravioleta.<sup>94</sup>

En este sentido Chen y su equipo describieron un nanosistema multifuncional que combinaba liberación de la droga sorafenib y un plásmido con el gen supresor de tumores p53, PDT e imagen fotoacústica.<sup>104</sup> Estaba basado en MSNs huecas que incluían nanopartículas de oro en su cavidad interna. Su puerta molecular estaba compuesta por un complejo supramolecular formado por la interacción entre adamantano y CD modificada con unidades de poli(glicidilmetacrilato). Demostraron que el nanodispositivo era capaz de inducir la liberación de sus cargas en respuesta a la luz NIR *in vitro*, debido a que el adamantano sufría un cambio conformacional que provocaba la separación de la CD y, por tanto, el desbloqueo de los poros. Los ensayos *in vivo* en un modelo murino de xenoinjerto con células Hep-G2 probaron que la administración de terapias génica, química y fototérmica a través de un mismo nanodispositivo daba lugar a la erradicación tumoral.

### I.3.5.7 Puertas moleculares sensibles a campos magnéticos

Al contrario que la luz, los AMF son estímulos físicos con una alta penetración en tejidos. Además, aceptan variaciones de frecuencia, potencia y ciclos de aplicación. Su principal ventaja es la posibilidad de guiar a las nanopartículas hasta las zonas diana y de recuperarlas una vez han realizado su función. Los nanomateriales sensibles a AMF suelen estar compuestos por nanopartículas magnéticas funcionalizadas con polímeros termosensibles que responden al incremento de temperatura inducido por los AMF.<sup>94</sup>

Un ejemplo, descrito por Kim y sus colaboradores, consistía en nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro (SPION) cubiertas por una capa de sílice.<sup>105</sup> Para la síntesis de la puerta molecular funcionalizaron la superficie con grupos poli(vinilpirrolidona) (PVP) para el anclaje de hidroxipropilcelulosa mediante interacciones de enlace de hidrógeno. Demostraron que la aplicación de AMF provocaba el colapso de la hidroxipropilcelulosa (41 °C) induciendo la liberación controlada y cíclica de gemcitabina *in vitro*. Adicionalmente, evaluaron el comportamiento del nanodispositivo en células pancreáticas cancerosas PANC-1 e *in vivo* en un modelo murino de xenoinjerto, obteniendo que tras la aplicación de AMF desencadenaba eficazmente la apoptosis de las células malignas.

### I.3.5.8 Puertas moleculares sensibles a ultrasonidos

Como estímulo, los US cuentan con las mismas características que los AMF,<sup>94</sup> pero se ha reportado que provocan genotoxicidad incluso a bajas dosis. En el nanosistema desarrollado por Lv y su equipo, la puerta molecular estaba conformada por microburbujas lipídicas compuestas por una mezcla de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y 1,2-bis(difenilfosfino)etano (DPPE). La superficie del nanodispositivo también estaba funcionalizada con APTES para la unión ácido fólico (FA), un ligando de direccionamiento hacia células cancerosas que sobreexpresan el receptor de folato. Tras la aplicación de US, las microburbujas se hidrolizaban liberando al medio tansinona IIA, un factor inductor de apoptosis. Además, los nanodispositivos fueron capaces de suprimir el crecimiento tumoral en un modelo murino de xenoinjerto con células de hepatocarcinoma H22.<sup>106</sup>

## I.4 BARRERAS BIOLÓGICAS: PRINCIPAL OBSTÁCULO PARA LOS NANOSISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Como se ha expuesto, los nanosistemas para la liberación de fármacos y, concretamente, las MSNs funcionalizadas con puertas moleculares presentan importantes ventajas que se resumen en: alta capacidad de carga, protección frente a la degradación de las cargas, biocompatibilidad, direccionamiento hacia zonas enfermas y entrega contrada de los fármacos tras el reconocimiento de estímulos específicos. Pero, pese a todas ellas, estos nanosistemas se enfrentan a un gran reto para lograr una implementación óptima en aplicaciones biomédicas: la **superación de las barreras biológicas**.<sup>17,107,108</sup>

Las BB son un conjunto de mecanismos fisiológicos de protección que restringen el paso de sustancias entre compartimentos biológicos para defender a los seres vivos frente a xenógenos y patógenos, y para mantener la homeostasis (**Figura I.10**).<sup>109</sup>

En los seres humanos, las BB que resguardan el interior del organismo del exterior son la piel y las barreras alveolocapilar y gastrointestinal. Sin embargo, la más restrictiva es la barrera hematoencefálica, que limita el transporte de moléculas entre el sistema circulatorio y el sistema nervioso central. Estas BB se caracterizan por tener un importante componente celular. En la piel, la epidermis está compuesta por un epitelio estratificado que cuenta con uniones oclusivas, uniones adherentes y desmosomas entre las caras apical y basolateral de los queratinocitos. Las uniones oclusivas son las más fuertes y están formadas por la conexión hermética de claudinas, ocludinas y proteínas JAM («*Junctional Adhesion Molecules*») con los filamentos de actina del citoesqueleto celular.<sup>110</sup> Estos tipos de interacciones intercelulares también están presentes entre los neumocitos de la barrera alveolo-capilar de los pulmones,<sup>111</sup> entre los enterocitos de la barrera gastrointestinal<sup>112</sup> y entre las células endoteliales de los capilares cerebrales.<sup>113</sup> El sistema digestivo posee una barrera extracelular complementaria compuesta principalmente por glicoproteínas, la mucosa.<sup>112</sup> La barrera hematoencefálica posee dos obstáculos adicionales: un periendothelio formado por pericitos y astrocitos; y un fuerte vínculo físico entre la ECM y el citoesqueleto celular, establecido a través de la expresión de integrinas y distroglicanos que interaccionan con laminina, colágeno tipo IV y el resto de componentes de la ECM.<sup>114</sup>

Otras BB con un fuerte **componente extracelular** son las **matrices que rodean a las biopelículas («*biofilms*») y tumores (ECM)**. Ambas comparten características bioquímicas y mecánicas que las hacen destacar por su impenetrabilidad. A continuación, se detallan las más relevantes.

### I.4.1 Matriz extracelular de biopelículas

Las biopelículas o «*biofilms*» son conglomerados de microorganismos inmersos en una compleja ECM. Su ECM está compuesta por diversas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas por los patógenos, que suponen entre un 50 % y un 90 % de la biomasa total de la biopelícula. Las EPS incluyen polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, lípidos, lipoproteínas, ADN y ARN. La ECM también cuenta con sustancias adquiridas del entorno circundante o del hospedador, con minerales biogénicos y con apéndices asociados a las células,

como flagelos, pili y cuerpos de inclusión. Éstos, junto a proteínas transmembrana, posibilitan el establecimiento de uniones intercelulares. La ECM es dinámica, estando en constante remodelación según la disponibilidad de nutrientes o sustratos y, además, varía entre especies de microorganismos y dependiendo del microambiente de los hospedadores.<sup>115</sup>

La ECM proporciona mecanismos de adhesión-cohesión, andamiaje y estabilidad mecánica y hace posible la emergencia de conductas colectivas. Gracias a ella, las biopelículas se adhieren en forma de colonias a superficies abióticas, como lentillas, implantes ortopédicos, catéteres y otras tecnologías médicas implantables; y a superficies bióticas, como los pulmones, la vagina o la boca, causando graves infecciones. Además, la ECM proporciona mecanismos de defensa que protegen a los microorganismos de la administración exógena de sustancias antimicrobianas y del ataque del sistema inmunitario (SI) del hospedador, favoreciendo a su virulencia.<sup>116</sup>

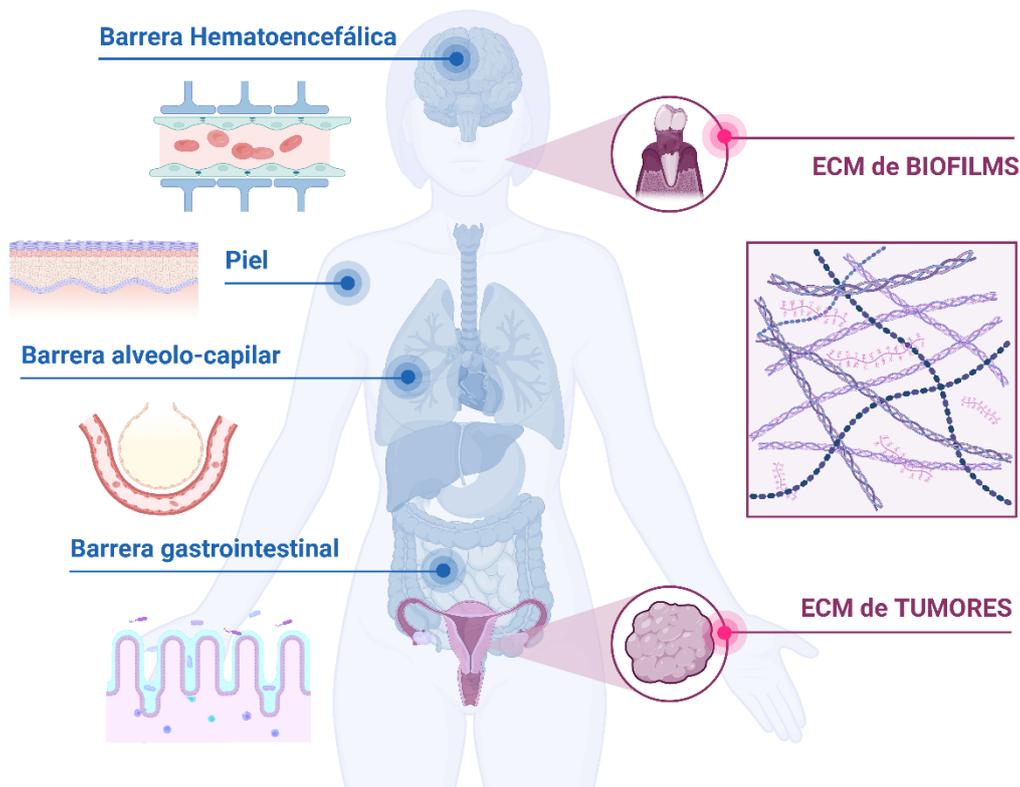
En conclusión, la ECM de las biopelículas contribuye al desarrollo de enfermedades infecciosas crónicas muy difíciles de abordar con las terapias y nanodispositivos tradicionales.

#### **I.4.2 Matriz extracelular de tumores**

En tumores sólidos y otras patologías como la fibrosis, las células enfermas inducen la remodelación de la ECM en la que están inmensas. La ECM sufre un crecimiento anormal y una reparación ineficiente volviéndose densa y rígida. En su composición existe el mismo tipo de biomoléculas que en la de los «*biofilms*», pero, en ella destacan las proteínas estructurales fibrilares, como el colágeno, y otros proteoglicanos y glicoproteínas, como las integrinas.<sup>117</sup> No obstante, su metabolismo y conformación es aberrante. Por ejemplo, la producción y deposición de colágeno tipo I está incrementada y su organización estructural está alterada. Las fibras pueden adoptar formas curvas y entrecruzarse mediante enlaces covalentes intra- e intermoleculares entre los residuos de lisina e hidroxilisina de sus dominios telopéptido, incrementando la tensión de la ECM.<sup>118,119</sup> Igual que en las biopelículas, la ECM de los tumores es dinámica. Ésta experimenta cambios en su composición y estructura en función del tipo de tumor, de su localización y de su grado de progresión.

El TME se caracteriza por presentar una angiogénesis exacerbada, que da lugar a vasos sanguíneos deficientes sin uniones intercelulares en su endotelio y sin pericitos recubriéndolos, así como por presentar un drenaje linfático ineficiente. Si bien estos procesos dan lugar al efecto EPR, también favorecen la extravasación de un exceso de plasma y líquido al estroma, lo que provoca un aumento de presión de fluido intersticial (IFP) y de viscosidad. Aunque los mecanismos no están totalmente dilucidados, se ha observado que la elevada rigidez, tensión, IFP y viscosidad de la ECM favorece el crecimiento, la supervivencia y la migración celular. Además, dota de integridad estructural al tumor, restringiendo la difusión de moléculas hasta sus zonas más internas.<sup>120</sup>

En conclusión, la ECM disfuncional de los tumores contribuye a la incurabilidad y relapsos del cáncer, dificultando su abordaje con los fármacos y nanodispositivos convencionales.



**Figura I.10. Barreras biológicas que obstaculizan la llegada de los agentes terapéuticos a sus áreas diana.**

Como consecuencia de la baja permeabilidad de las BB, el acceso de los agentes terapéuticos a las áreas diana se ve limitado. Esto hace que las células situadas en localizaciones más profundas reciban bajas concentraciones o no reciban los tratamientos. Por ende, su eficacia se ve disminuida, haciendo necesario incrementar las dosis requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado. Esto lleva a una exposición sistémica a los fármacos que produce efectos indeseados en tejidos sanos. Si bien su encapsulación en nanosistemas mejora estos problemas, sigue siendo insuficiente para rebasar las BB. De hecho, según algunos estudios recientes de metaanálisis, menos de un 1 % de la dosis de nanopartículas administrada alcanza las regiones objetivo.<sup>121,122</sup> Otros análisis elevan la cifra hasta un 15 %.<sup>123</sup>

Por tanto, es imperioso diseñar nanosistemas más sofisticados capaces de atravesar las BB para solventar el reto de entregar eficazmente agentes terapéuticos en las zonas enfermas de interés y no en el entorno circundante. En este contexto, en los últimos años ha emergido el desarrollo de **sistemas dotados de movimiento activo, nano- y micromotores**, como posible solución.

## **I.5 NANO- Y MICROMOTORES: UN AVANCE FRENTE A LOS SISTEMAS PASIVOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

En la naturaleza existen motores moleculares que se mantienen fuera del equilibrio termodinámico transformando la energía del entorno o almacenada, generalmente trifosfato de adenosina (ATP), en potencia motriz rotatoria o lineal. Mediante ella son capaces de propulsarse de forma autónoma, desempeñando importantes tareas en los sistemas biológicos.<sup>124</sup> Por ejemplo, la kinesina y la dineína están involucradas en el transporte de

sustancias a través de los microtúbulos del citoesqueleto celular y en el movimiento de los flagelos de bacterias y espermatozoides (**Figura I.11a**).

Actualmente, se están realizando enormes esfuerzos para diseñar nano- y microsistemas sintéticos activos, análogos a los motores moleculares, para su aplicación en múltiples funciones biomédicas y medioambientales en la nano- y microescala (**Figura I.11b**). Aunque la mayoría de la investigación se ha enfocado al diseño, fabricación y evaluación de los mecanismos de propulsión de motores micrométricos,<sup>125</sup> es de especial relevancia el desarrollo de **motores nanométricos**. Por su reducido tamaño, del orden de magnitud de los motores moleculares, están indicados para el transporte molecular en sistemas nanoconfinados.<sup>126</sup> Además, por la suma de sus reducidas dimensiones y su autopropulsión, son una herramienta con un gran potencial para **penetrar en las BB y en las membranas celulares, favoreciendo la entrega de fármacos en sus localizaciones diana**.<sup>127,128</sup>

Por sus dimensiones, el movimiento de los nano- y micromotores ocurre en un régimen donde 2 conceptos físicos determinan su comportamiento: el número de Reynolds (Re) y el movimiento Browniano. El Re es una cantidad adimensional referida a la relación entre las fuerzas de inercia y las fuerzas viscosas (**Ecuación I.1**). En la escala macroscópica (alto Re) las fuerzas de inercia dominan sobre las viscosas, pero a escala nano- y microscópica (bajo Re) la viscosidad es un factor dominante y la inercia no es suficiente para sostener el movimiento.<sup>129</sup>

$$Re = \frac{\rho v L}{\eta} = \frac{\text{Fuerzas de inercia}}{\text{Fuerzas viscosas}}$$

**Ecuación I.1 Número de Reynolds.** Donde Re es el número de Reynolds,  $\rho$  es la densidad del fluido,  $v$  es la velocidad de los nano- y micromotores,  $L$  es la longitud de las partículas y  $\eta$  es la viscosidad del fluido.

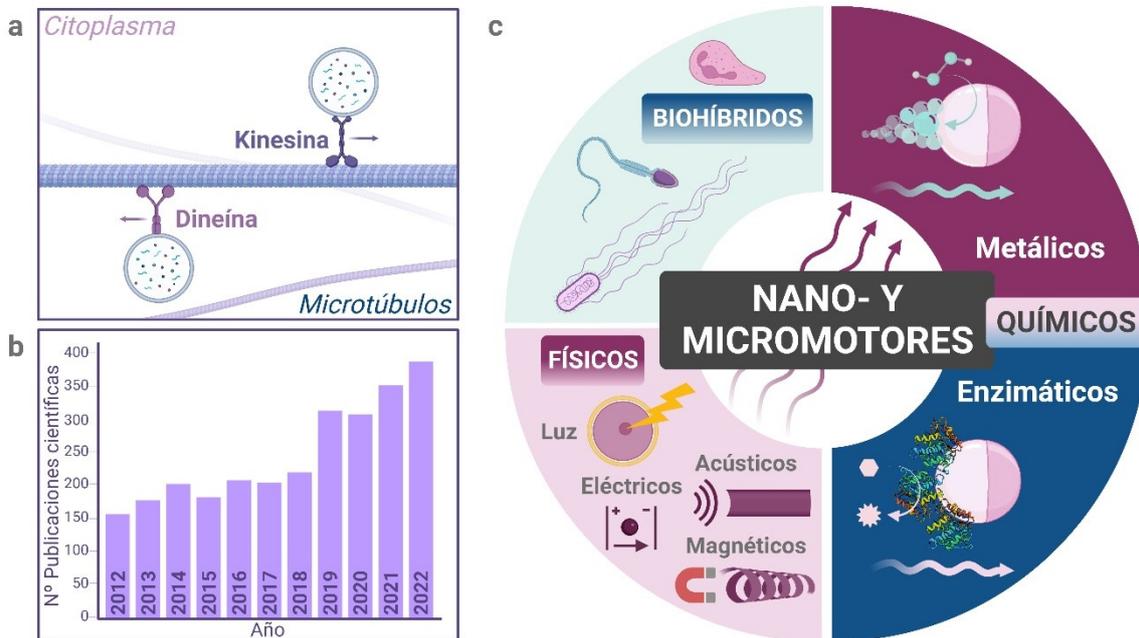
El movimiento Browniano, también denominado ruido o fluctuación térmica, se refiere al movimiento aleatorio de las partículas en disolución debido a las colisiones térmicas con las moléculas del disolvente (**Ecuación I.2**).<sup>130</sup>

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

**Ecuación I.2. Ecuación Stokes-Einstein: difusión de los nano- y micromotores.** Donde  $D$  es el coeficiente de difusión,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $r$  es el radio de las partículas.

Por tanto, para contrarrestar la resistencia de los fluidos ( $F_{\text{drag}}$ ) y superar el movimiento Browniano intrínseco de las partículas, es necesaria una fuerza motriz potente y constante que dé lugar a la autopropulsión continua de los nano- y micromotores.<sup>131</sup> Para conseguirla se aplican varias estrategias: acoplamiento a células móviles, motores biohíbridos;<sup>132</sup> y conversión de energía en trabajo mecánico. Para ello, pueden utilizar energía proveniente de estímulos físicos, como luz, campos magnéticos, US y campos eléctricos;<sup>133,134</sup> o de la **transformación de sustancias químicas del microambiente mediante reacciones catalíticas, mediadas por metales o enzimas** (**Figura I.11c**).<sup>135,136</sup> Además, están emergiendo nuevos sistemas híbridos accionados por varios mecanismos motores simultáneamente.<sup>137</sup> Mejorar la eficacia del proceso de conversión de energía favorece la autopropulsión de los nano- y microrobots, incrementando

su rendimiento funcional como consecuencia. Por tanto, comprender y refinar sus mecanismos de acción en distintos fluidos biológicos es de vital importancia para lograr su aplicación exitosa en el campo biomédico.



**Figura 1.11. Nano- y micromotores.** **a** Inspiración en los motores moleculares naturales. **b** Número de publicaciones científicas en los últimos 10 años. Fuente: «Web of Science». **c** Tipos según su mecanismo de propulsión.

### 1.5.1 Motores propulsados por métodos físicos

Los motores accionados por métodos físicos consiguen su autopropulsión por la transformación de energía aportada por estímulos externos. Por tanto, no necesitan adición y/o descomposición de combustible y permiten el control espaciotemporal de su comportamiento de forma remota y modulable.<sup>134</sup> Seguidamente, se describen los rasgos más relevantes de cada tipo de estímulo físico y algunos ejemplos de motores propulsados por ellos aplicados en la liberación de fármacos.

#### 1.5.1.1 Motores propulsados por luz

El empleo de la luz como fuente de energía para propulsar nano- y micropartículas está ampliamente extendido debido a que es renovable, versátil, no invasiva y se puede variar de forma precisa su intensidad, frecuencia, polarización y dirección de propagación. Por todo ello, el movimiento de motores accionados por luz es fácilmente controlable. En la base de su desarrollo está la incorporación de moléculas fotosensibles en su estructura, las cuales pueden actuar de 3 modos: (i) transformando la luz absorbida en calor, propulsión fototérmica o termoforesis; (ii) sufriendo isomerizaciones, propulsión fotocromática por deformación; o (iii) catalizando reacciones fotoquímicas, propulsión fotocatalítica. En todos los casos la luz induce la generación un gradiente asimétrico inestable de energía alrededor de las partículas, que éstas tiendan a estabilizar para mantener el estado estacionario. En último término, esa fuerza provoca su autopropulsión. En los motores termoforéticos el gradiente se establece por

diferencias de temperatura (efecto Soret), en los fotocromicos por cambios de tensión en la interfaz partícula-disolvente y en los motores fotocatalíticos por la acumulación de los productos de reacción alrededor de las partículas.<sup>138</sup>

Estos motores presentan multitud de formas: hélices, cables, tubos, cintas, cohetes, etcétera. Sin embargo, la geometría más empleada es la de esferas tipo Janus, las cuales presentan dos caras asimétricas, diferenciadas en composición y funcionalidad.<sup>139</sup> En cuanto al tipo de luz empleada, hay ejemplos de motores propulsados con luz visible, especialmente luz azul<sup>140</sup> y con luz de longitud de onda múltiple,<sup>141</sup> pero destacan la luz ultravioleta (UV)<sup>142</sup> y la luz NIR.<sup>143</sup> Para aplicaciones biomédicas, la luz NIR es la más adecuada, ya que es poco absorbida y alcanza un alto nivel de penetración en los tejidos.

Un ejemplo de nanomotor propulsado por termoforesis inducida por luz NIR para la entrega transdérmica de antifúngicos fue desarrollado por Ji y su equipo (**Figura I.12a**).<sup>144</sup> Como se ha hecho mención anteriormente, la piel es una BB impenetrable que impide el acceso de las nanopartículas pasivas al interior del organismo. Para superarla, los autores diseñaron un nanomotor Janus formado por nanopartículas de platino, sobre las que polimerizaron asimétricamente poli(divinilbenceno) (PDVB). El platino actuaba como agente fototérmico, mientras que el PDVB actuaba como aislante para establecer el gradiente de temperatura y como transportador del fármaco nitrato de miconazol (MN). Demostraron el comportamiento termoforético del nanomotor y que éste dependía de la intensidad del láser aplicado. Además, probaron que el nanomotor liberaba el antifúngico reduciendo la viabilidad del hongo *Cándida albicans* en estado planctónico y formando biopelículas *in vitro*. Estos resultados fueron trasladados *in vivo* en un modelo murino de infección por *C. albicans*, confirmado sus habilidades antimicrobianas y revelando la enorme capacidad que poseen los nanomotores para lograr la penetración transdérmica. Un hecho que abre camino a la explotación de las nanopartículas activas para la entrega de agentes terapéuticos a través de las diferentes BB.

Pese a sus virtudes, los motores accionados por luz presentan limitaciones para ser destinados a usos biomédicos. En primer lugar, resalta que la mayoría de los estudios han sido realizados en disolventes ideales. Por lo que, en esos casos, se desconoce cómo afectan fluidos biológicos a los mecanismos de propulsión. Además, controlar el movimiento cuando están alejados de la fuente de energía supone un reto, así como determinar su direccionalidad. En este sentido se han descrito algunos motores capaces de experimentar fototaxis positiva y negativa.<sup>145</sup> Sin embargo, el mayor obstáculo, es el difícil acceso de la luz a localizaciones diana profundas. Esto hace que se empleen longitudes de onda más penetrantes que presentan problemas de biocompatibilidad, ya que la luz UV es mutagénica y la luz NIR puede producir daños en los tejidos sanos adyacentes por el incremento de temperatura que genera. Por último, es remarcable que la aplicación de luz puede provocar efectos térmicos indeseados en los motores.

### I.5.1.2 Motores propulsados por campos magnéticos

La aplicación de campos magnéticos para controlar el movimiento de motores es muy atractiva por su alta penetración en órganos, por su nula toxicidad a bajas intensidades, por la independencia de láseres de elevada intensidad y, sobre todo, por la capacidad de dirigir

especialmente las trayectorias de los motores. Para lograr su propulsión, las partículas incorporan materiales ferro-, ferri-, para- y superparamagnéticos, como hierro, óxidos de hierro o níquel en su composición.<sup>146-148</sup> Exhiben movimientos de traslación, giro y voltereta, que se basan en su interacción con 2 tipos de campos magnéticos: (i) rotativo, en el que el vector gira a una frecuencia fija, generando un par magnético de torsión que impulsa a las partículas; y (ii) oscilatorio, en el que se combinan un vector estático y un vector rotativo, de modo que los motores se desplazan hacia delante y hacia atrás en función de la dirección del campo magnético.<sup>138</sup>

Zhou y su equipo llevaron a cabo un prototipo de micromotor multipropulsado química y magnéticamente para la liberación de drogas anticancerígenas en el estómago (**Figura I.12b**).<sup>146</sup> Como se ha explicado previamente, el sistema gastrointestinal es una importante BB que limita la acción de las partículas pasivas. Para superar su mucosa, los autores diseñaron un microtubo con forma de cohete que portaba Doxo adsorbida en su superficie. En su síntesis formaron un núcleo de zinc y una capa intermedia de hierro, que fue recubierta por ácido poliaspártico (PASP). Demostraron que el microcohete era capaz de navegar en fluidos gástricos simulados y de liberar los fármacos por la presencia de ácido. Además, en respuesta a la aplicación de campos magnéticos, su trayectoria podía ser modificada a voluntad exhibiendo círculos, líneas y espirales, en un modelo *in vitro* de moco estomacal. Finalmente, los resultados se trasladaron *in vivo* en un modelo murino por administración oral, demostrando la potencialidad de este tipo de motores para alcanzar las localizaciones de interés biomédico y favorecer la liberación de agentes terapéuticos.

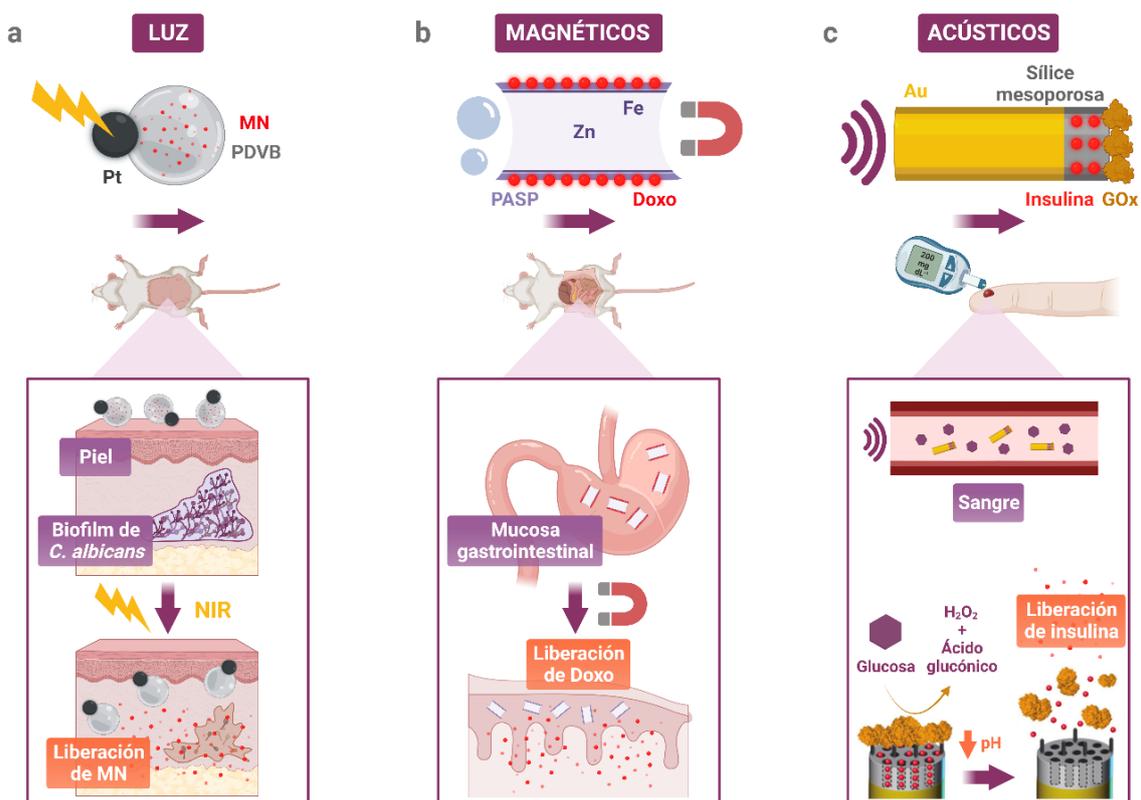
Las desventajas de este tipo de propulsión están relacionadas con la dificultad para implementar la aplicación de campos magnéticos en la práctica médica cotidiana, ya que requiere de costosos y complejos equipos y manipulación cualificada. Además, diseñar motores con una arquitectura óptima para responder a los campos magnéticos de forma adecuada es complejo.

### I.5.1.3 Motores propulsados por ultrasonidos

El uso de la fuerza de radiación acústica para inducir la propulsión de partículas radica en su rápida velocidad de propagación, su profunda penetración en tejidos y su simplicidad comparada con otros estímulos físicos. El movimiento de este tipo de motores se basa en su interacción con las ondas ultrasónicas por absorción sin contacto, dispersión y reflexión. El mecanismo más común es la propulsión ultrasónica por ondas estacionarias (i), en la cual se produce un gradiente asimétrico de presión que empuja al motor.<sup>138</sup> Generalmente, la arquitectura de estos dispositivos es tubular y con extremos dispares. De forma que en los extremos cóncavos concentran la energía aplicada y en los extremos convexos la disipan, llevando a la generación del gradiente de presión sonora. Además, mediante cambios en la frecuencia, dirección y ciclos de activación-desactivación de las ondas ultrasónicas se puede controlar el movimiento de los motores de forma precisa.<sup>149</sup> Otro mecanismo es la propulsión acústica por vaporización de gotas (ii), en la que la evaporación del disolvente aumenta la entalpía promoviendo el desplazamiento de las partículas.<sup>138</sup>

Díez y sus colaboradores diseñaron un nanomotor propulsado acústicamente para la detección de glucosa y la entrega controlada de insulina en diabetes (**Figura I.12c**).<sup>150</sup> Estaba compuesto por un nanocable de oro acoplado a un segmento mesoporoso de sílice. El nanocable comprendía la unidad motora y la parte mesoporosa actuaba como unidad de transporte y detección. Para ello, encapsulaba insulina en sus poros y estaba funcionalizada con una puerta molecular sensible a pH ácido y  $H_2O_2$ , compuesta por la enzima glucosa oxidasa (GOx) unida a ácidos fenilborónicos. El nanomotor era capaz de detectar y catalizar la glucosa presente en la sangre de pacientes diabéticos, induciendo la apertura de la nanoválvula supramolecular y la liberación del agente terapéutico de forma específica. Proceso que se veía acelerado por la aplicación de US, lo cual se atribuyó a la agitación de las nanoválvulas y a la mezcla de fluidos derivadas del movimiento del nanomotor.

Estos nano- y micromotores son interesantes para navegar en fluidos biológicos porque no dependen de especies iónicas ni se ven afectados por la viscosidad del medio. Como inconveniente, destaca que los US pueden inducir daños al ser absorbidos por los materiales biológicos, produciendo cavitación acústica y efectos indeseados en los gases corporales, lo que restringe su uso en aplicaciones biomédicas reales.



**Figura I.12. Motores físicos.** **a** Nanomotor propulsado por luz para la liberación de fármacos en infecciones fúngicas dérmicas. *Adaptada de ACS Nano 2021, 15, 14218-14228.* **b** Micromotor guiado por campos magnéticos para la liberación de fármacos en la capa mucosa gastrointestinal. *Adaptada de ACS Nano 2019, 13, 1324-1332.* **c** Nanomotor propulsados por US para la liberación de insulina en diabetes. *Adaptada de Nanoscale, 2017, 9, 14307-14311.*

#### I.5.1.4 Motores propulsados por campos eléctricos

La aplicación de campos eléctricos como estímulo externo para inducir el movimiento de micromotores no está muy extendida. Los ejemplos que se encuentran en la bibliografía consisten en motores compuestos por materiales conductores, que transforman energía eléctrica en movimiento. Los mecanismos se resumen en 2 tipos: (i) electroforesis de carga inducida (ICEP), en el que la aplicación de un potencial eléctrico causa un flujo electrosmótico en el disolvente que induce el movimiento de las partículas hacia los microelectrodos; y (ii) propulsión electrodinámica, en el que las partículas actúan como diodos creando corrientes electrosmóticas locales por las que se desplazan.<sup>138</sup> En el área de los nanomotores para la liberación de fármacos, esta fuerza motriz no es la más adecuada por 2 motivos: porque al poseer un reducido diámetro, los nanorobots requerirían campos eléctricos de muy alto voltaje para lograr su movimiento; y porque los ambientes biológicos son ricos en electrolitos, lo que interferiría con el mecanismo de propulsión de las partículas.

#### I.5.2 Motores biohíbridos

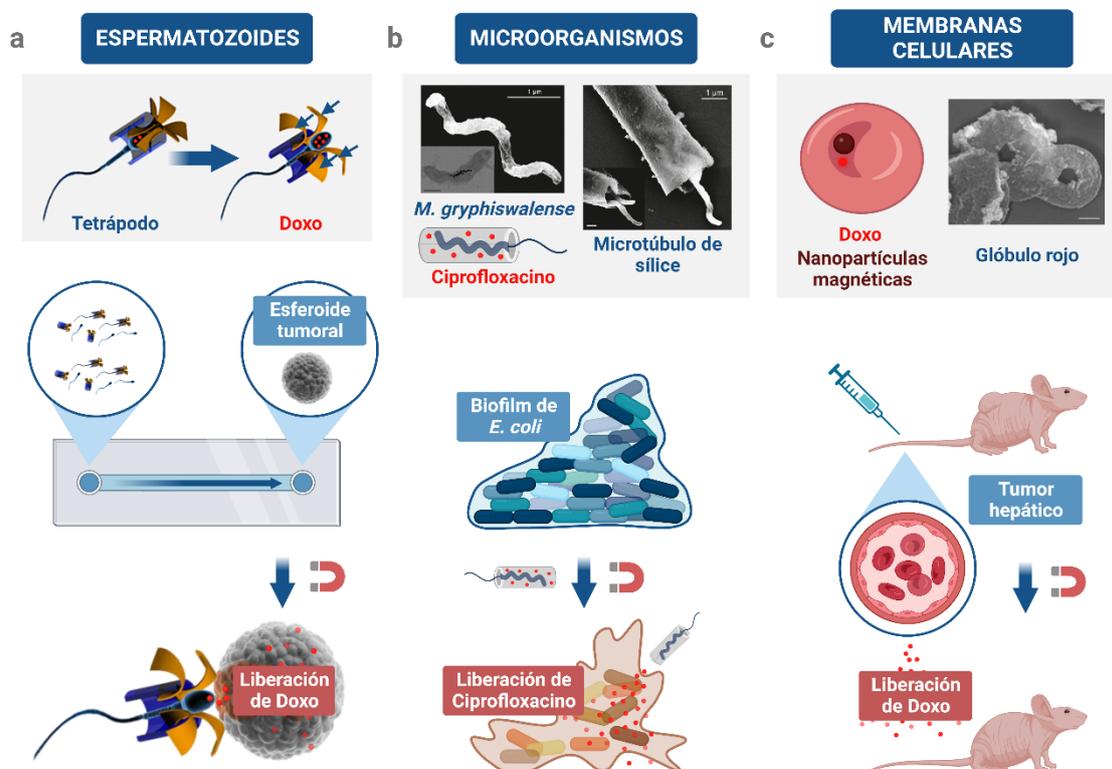
Los motores biohíbridos aprovechan las propiedades motiles intrínsecas de ciertas células y organismos para lograr su autopropulsión y, en ocasiones, las combinan con métodos físicos, como ultrasonidos y campos magnéticos, para intensificarla y/o direccionarla.<sup>132</sup> Se han descrito nano- y microdispositivos sintéticos con morfología, tubular, helicoidal y esférica, entre otras; acoplados a espermatozoides, bacterias, algas, neutrófilos y células musculares contráctiles para desempeñar distintas tareas.<sup>151-155</sup>

Un ejemplo que emplea un biomicromotor para la entrega de fármacos en cáncer fue desarrollado por Xu y sus colaboradores (**Figura I.13a**).<sup>156</sup> Consistía en una estructura tubular magnética con 4 brazos (tetrápodo) unida a un espermatozoide. El tetrápodo proporcionaba guía magnética hacia las células diana. Una vez alcanzadas, el contacto del tetrápodo con la membrana celular provocaba un cambio en su estructura que abría una vía para la separación de los espermatozoides, los cuales eran capaces de penetrar en las células. Los autores demostraron que micromotores híbridos ideados fueron capaces de navegar grandes distancias en condiciones fisiológicas y de entregar Doxo en esferoides tumorales HeLa, provocando la muerte celular. En conclusión, los espermatozoides son una de las células móviles más interesantes para el desarrollo de motores híbridos porque proporcionan: quimio-, termo- y reotaxis a través de su flagelo, alto almacenamiento de sustancias hidrofílicas a través de interacciones con el ADN en su núcleo cristalino, liberación controlada de éstas a través de su fusión con la membrana de las células somáticas y baja inmunogenicidad y biocompatibilidad, ya que, al contrario que los microorganismos, no expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) ni proliferan.

Otro ejemplo fue descrito por Stanton y su equipo, quienes acoplaron microtubos de sílice a la bacteria magnetostática no patogénica *Magnetospirillum gryphiswalense* para la entrega de antibióticos en «*biofilms*» de *Escherichia coli* (**Figura I.13b**).<sup>157</sup> Los microorganismos con propiedades magnetostáticas son capaces de experimentar magnetotaxis, alineándose con el campo magnético terrestre, para seguir gradientes de oxígeno en sus nichos ecológicos. Lo logran gracias a la posesión de magnetosomas, unos orgánulos que contienen cristales de

magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). En este caso, *M. gryphiswalense* además de poseer partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , también contiene flagelos bipolares giratorios. Por ello, los autores lo seleccionaron para dotar de propulsión y direccionamiento magnético a microtubos de sílice, elegidos por su alta capacidad de carga. Éstos fueron previamente funcionalizados con APTES para aportar cargas positivas y establecer interacciones electrostáticas con los microorganismos en su interior. Los micromotores híbridos diseñados fueron capaces de propulsarse a través de la ECM de las biopelículas de *E. coli* y de liberar ciprofloxacino en respuesta al pH ácido de su interior, causando la muerte de las bacterias.

De igual manera, algunos motores emplean componentes provenientes de plantas o membranas biológicas de glóbulos rojos<sup>158</sup> y plaquetas<sup>159</sup> en su síntesis. Esta estrategia destaca por la capacidad de camuflaje, ya que, al recubrirse por componentes endógenos, los motores pueden navegar por la sangre pasando desapercibidos al SI del paciente. Wu y sus colaboradores elaboraron un micromotor biomimético teragnóstico capaz de liberar fármacos y actuar como agente de diagnóstico por imagen en cáncer (**Figura I.13c**).<sup>160</sup> Para su síntesis partieron de micropartículas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con forma discoidal bicóncava, que fueron recubiertas por polímeros de poliaminas, por la proteína zein y por membranas de eritrocitos. Adicionalmente, encapsularon en su pared nanopartículas de óxido de hierro y Doxo. Los dispositivos exhibían movimiento en sangre diluida tras la aplicación de un campo magnético rotativo uniforme. Por añadidura, los micromotores eran capaces de liberar la droga contenida induciendo la muerte de células cancerosas hepáticas Hep-G2 en cultivo y en un modelo *in vivo* de xenoinjerto y de proporcionar MRI.



**Figura I.13. Motores biohíbridos.** **a** Micromotor acoplado a espermatozoides para la liberación de fármacos en cáncer. *Adaptada de ACS Nano 2018, 12, 327-337.* **b** Micromotor acoplado a bacterias para la liberación de fármacos en «biofilms». *Adaptada de ACS Nano 2017, 11, 9968-9978.* **c** Micromotor

acoplado a glóbulos rojos para la liberación de fármacos en cáncer. *Adaptada de ACS Appl. Mater. Interfaces 2022, 14, 3825–3837.*

En vista de los resultados obtenidos, los motores que emplean células como fuerza motriz se ensalzan como una prometedora alternativa para la entrega de fármacos en enfermedades ginecológicas e infecciosas, entre otras. Gracias a las propiedades aportadas por las células, los dispositivos detectan y siguen gradientes, no necesitan combustible ni fuerzas físicas dañinas, permiten el control de su movimiento y son altamente biocompatibles. Sin embargo, no se han realizado estudios en modelos avanzados ni se ha logrado la traslación de esta estrategia a escala nanométrica de forma exitosa. Además, en el caso de los microorganismos es esencial poder controlar su ciclo de vida vez han cumplido las tareas requeridas.

Además de proporcionar elementos sintéticos, la naturaleza ha inspirado el diseño de dispositivos que imitan morfologías aerodinámicas que se encuentran en ella. Hay motores que copian estructuras celulares, como flagelos; células, como espermatozoides; plantas, como árboles, cocos y nueces; animales, como peces, medusas, renacuajos y gusanos anélidos; y otros objetos como cartuchos, husos, globos, cañones, paracaídas, muñecos de nieve y pinceles. Asimismo, también ha inspirado el diseño de otros nano- y micromotores que imitan la comunicación química y el comportamiento cooperativo entre individuos. Algunos ejemplos son dispositivos cuyo funcionamiento se inspira en el movimiento antigravitatorio del zooplancton, en la estigmergia de las hormigas de fuego y en las dinámicas depredador-presa.<sup>161</sup>

### I.5.3 Motores propulsados por reacciones químicas

Los motores propulsados por reacciones químicas logran un movimiento estable y constante por la transformación de sustancias químicas en fuerza cinética. Al contrario que los motores físicos, no demandan el uso de complejos equipos para inducir o controlar su movimiento. No obstante, requieren la adición externa o la presencia endógena de un combustible y la incorporación de elementos con capacidad catalítica en su estructura. Los **agentes catalíticos** han de situarse de **forma asimétrica** para evitar fuerzas netas nulas e inducir **la generación de un gradiente de productos de reacción**. En último término, la acumulación de sustancias en un lado de las partículas provoca su propulsión autónoma.<sup>135</sup> Los mecanismos por lo que ocurre son: (i) tensión interfacial, (ii) electroforesis, (iii) propulsión por burbujas y (iv) difusioforesis (**Figura I.14a**). Debido a que presentan alta selectividad para sus sustratos químicos y movimiento autónomo, los nano- y micromotores catalíticos se han aplicado ampliamente para la administración y el transporte dirigido de moléculas de interés.<sup>162</sup>

En la **Tabla I.4** se resumen las virtudes e inconvenientes de cada modo de propulsión: física, biohíbrida y química.

**Tabla I.4. Comparación de las distintas modalidades de propulsión de los nano- y micromotores: ventajas, desventajas e incompatibilidades.** *Adaptada de Adv. Matter. 2023, 2205746.*

TIPO DE PROPULSIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	INCOMPATIBILIDADES
<b>LUZ</b>	Profundidad de penetración moderada, no invasiva, efectos fototérmicos y guía	Profundidad de penetración limitada y requerimiento de equipos sofisticados	Localizaciones más profundas que la capacidad de penetración de luz NIR y UV
<b>MAGNÉTICA</b>	Profundidad de penetración elevada, no invasiva, imagen magnética y guía	Requerimiento de equipos sofisticados	Pacientes con implantes metálicos (dependiendo de la intensidad del campo)
<b>ACÚSTICA</b>	Profundidad de penetración considerable, no invasivo	Requerimiento de equipos sofisticados y guía limitada	Las ondas estacionarias acústicas no pueden utilizarse
<b>BIOHÍBRIDA</b>	Diseños sofisticados y autopropulsados ya presentes en la naturaleza	Posible respuesta inmunitaria y alto nivel de complejidad	Bacterias o xenobiohíbridos en la sangre
<b>QUÍMICA</b>	Capacidad de propulsión intrínseca y no requerimiento de equipos externos	Requiere una fuente de combustible y los subproductos de reacción pueden ser potencialmente tóxicos	Necesidad de estudiar sus habilidades en sangre y espacios intersticiales

### I.5.3.1 Mecanismos de propulsión de los motores catalíticos

#### - *Tensión interfacial*

En la propulsión por tensión interfacial o efecto Marangoni, las reacciones químicas mediadas por los catalizadores provocan una diferencia de tensión superficial que da lugar a un desbalance de fuerzas que empuja a los dispositivos (**Ecuación I.3**).<sup>163</sup>

$$v = \frac{SR^2\gamma}{\eta DL} \propto k\gamma$$

**Ecuación I.3. Movimiento por tensión interfacial.** Donde  $v$  es la velocidad de los nano- y micromotores,  $S$  es la tasa de evolución de los productos,  $R$  es el radio de los nano- y micromotores,  $\gamma$  es la tensión superficial de la solución,  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $L$  es la longitud de las partículas y  $k$  es la constante de equilibrio de la reacción.

#### - *Electroforesis*

La propulsión por electroforesis está basada en la generación y consumo asimétrico de productos iónicos alrededor de los motores. Se divide en 2 categorías: auto-electroforesis y di-electroforesis. En la auto-electroforesis, la catálisis de los sustratos da lugar a un campo eléctrico autogenerado por la distribución desigual de productos, que impulsa a las partículas (**Ecuación I.4**). En cambio, en la di-electroforesis, los dispositivos están formados por 2 catalizadores diferentes que actúan como una celda electroquímica autónoma. Generan un flujo neto

continuo de electrones y protones del ánodo al cátodo que dirige a los motores en sentido opuesto.<sup>164</sup>

$$v = \frac{\zeta \epsilon E}{\eta}$$

**Ecuación I.4. Movimiento por auto-electroforesis.** Donde  $v$  es la velocidad de los nano- y micromotores,  $\zeta$  es el potencial zeta de las partículas,  $\epsilon$  la permitividad,  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $E$  es el campo eléctrico autoproducido.

#### - *Propulsión por burbujas*

La propulsión por burbujas se basa en que la transformación catalítica de los combustibles genera una acumulación de gas en la superficie de las partículas. Cuando se supera el límite de solubilidad del gas en la solución, se produce su nucleación en forma de burbujas. Éstas se desprenden al medio induciendo una fuerza de retroceso que propulsa a los motores en dirección inversa al catalizador por transferencia de momento (mV). Para la formación de microburbujas se requiere un área catalítica elevada. Además, el radio, la frecuencia de separación y las colisiones entre microburbujas influyen directamente en el movimiento de las partículas. Sin embargo, éste es independiente del contenido iónico del medio, lo que supone una ventaja para la aplicación de estos motores en fluidos biológicos como el suero o la sangre.<sup>165,166</sup>

#### - *Difusioforesis*

En la propulsión por difusioforesis, la transformación catalítica de los combustibles induce la acumulación de productos de reacción a lo largo de la superficie de las partículas. Cuando su concentración alcanza un cierto nivel crítico, comienzan a difundir hacia el medio formando un gradiente, lo que genera una fuerza que impulsa a los nano- y micromotores en dirección opuesta al catalizador de forma continua. La difusioforesis puede ser electrolítica, si se producen iones que se mantienen en equilibrio en la solución, o no-electrolítica, si se generan productos con carga neutra.<sup>167,168</sup>

Dado que sólo las partículas asimétricas pueden desencadenar estos mecanismos de propulsión, el diseño de nano- y micromotores químicos se ha centrado en 2 aspectos para romper la simetría: la forma y la composición. En cuanto a su arquitectura, principalmente se han desarrollado motores con forma cónica;<sup>169</sup> fibrilar, como microtubos,<sup>170</sup> microcohetes<sup>171</sup> y nanovarillas;<sup>172</sup> cóncava, como estomatocitos,<sup>173</sup> esférica con caras diferenciadas, tipo Janus,<sup>174</sup> etcétera (**Figura I.14b**). En cuanto a su composición, en general los motores se dividen en metálicos y enzimáticos. A continuación, se resumen las características más relevantes de cada tipo de motor químico y sus ventajas e inconvenientes en función de los combustibles empleados.

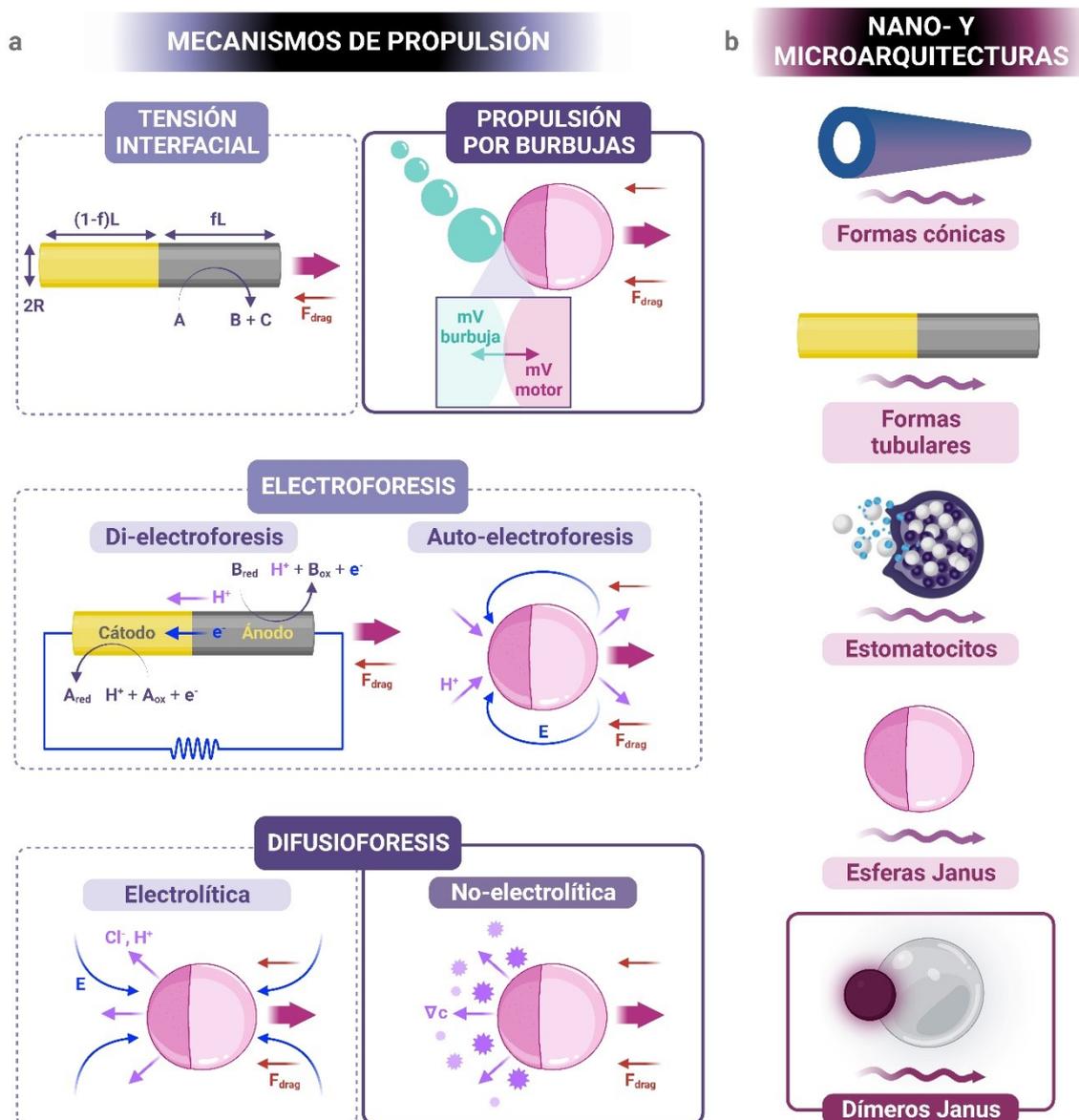


Figura I.14. Nano- y micromotores catalíticos. **a** Mecanismos de propulsión. **b** Morfologías más comunes.

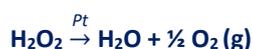
### I.5.3.2 Motores metálicos

Los **nano- y micromotores metálicos** están compuestos por elementos con actividad catalítica intrínseca como platino,<sup>175</sup> oro,<sup>176</sup> manganeso,<sup>177</sup> zinc<sup>178</sup> y magnesio.<sup>179</sup> Para su fabricación se siguen aproximaciones «*top-down*» y «*bottom-up*» con diferente potencialidad para ser escaladas industrialmente. La técnica sintética más común es la deposición física de vapor (por haz de electrones, «*e-beam*» y por pulverización catódica, «*sputtering*»).<sup>180</sup> No obstante, en los últimos años el método de síntesis por emulsión de Pickering se ha convertido en una de las estrategias más prominentes para la síntesis de esferas diméricas Janus.<sup>181</sup> En lo relativo a su propulsión, estos motores siguen mecanismos de efecto Marangoni, electroforesis y propulsión por burbujas. El más estudiado y del que existen más ejemplos es la **propulsión por burbujas**, ya que genera una potente fuerza motriz que impulsa a los nano- y micromotores

metálicos a altas velocidades. Como sustrato para la formación de burbujas, generalmente emplean  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}^+$ .

#### - $\text{H}_2\text{O}_2$ como combustible

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el combustible más usado para propulsar químicamente nano y micropartículas. De hecho, el primer nanomotor descrito en 2004 por Paxton, que consistía en una nanovarilla bimetalica de oro y platino, ya lo empleaba.<sup>163</sup> Desde entonces, se han refinado los diseños, las técnicas de síntesis y las aplicaciones de este tipo de motores, encontrándose numerosos ejemplos en la bibliografía. La mayoría están compuestos por **platino**, un metal con una gran **habilidad para descomponer catalíticamente  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$**  (Reacción I.1, Tabla I.5). La fuerza de retroceso que induce el desprendimiento de  $\text{O}_2$  (g) impulsa a estos motores siguiendo generalmente el **mecanismo de propulsión por burbujas**.



#### Reacción I.1. Reducción catalítica de $\text{H}_2\text{O}_2$ : mecanismo de propulsión de los nano- y micromotores compuestos por Pt.

En la mayoría de los casos, estos motores requieren altas concentraciones de combustible para desempeñar sus funciones, no siendo adecuados para su uso real en aplicaciones biomédicas. Esto se debe a que la adición externa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulta tóxica a nivel biológico al inducir estrés oxidativo y desnaturalización proteica. Además, los niveles fisiológicos son mucho más bajos que los demandados por estas partículas. No obstante, existen excepciones en ciertas áreas patológicas, como el TME o las zonas inflamadas, en las que los niveles de ROS y, concretamente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ven incrementados de forma local ( $\sim 100 \mu\text{M}$ ).<sup>182</sup> Por tanto, el desarrollo de partículas propulsadas por los niveles endógenos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de especial relevancia, así como su implementación en ámbitos en los que la adición exógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no resulte dañina como, por ejemplo, el ecosistema en el que viven ciertos microorganismos patógenos. Siendo en consecuencia muy interesantes para su aplicación en la desinfección de superficies e implantes médicos.

Tabla I.5. Lista de nanomotores compuestos por Pt que emplean  $\text{H}_2\text{O}_2$  como combustible.

DESCRIPCIÓN	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (% m/m)	NANOARQUITECTURA Y COMPOSICIÓN	APLICACIÓN	REFERENCIA
	15	Dímero Janus (Pt-SiO <sub>2</sub> )	-	183
	10	Esférica (Pt-poliéstereno, PS)	Detección del virus del Zika	184
	10	Forma de matraz (Pt-polímeros)	-	185,186
	5	Esfera Janus (Pt-SiO <sub>2</sub> con núcleo de Au)	Detección de pepsinógeno	187
	5	Esfera Janus (Pt-SiO <sub>2</sub> )	Liberación de heparina <i>in vitro</i>	188

	3	Esfera Janus (Pt-PS-SiO <sub>2</sub> )	-	189
	3	Dímero Janus (C-SiO <sub>2</sub> -Pt)	-	190
	1.5	Esfera Janus (Pt-SiO <sub>2</sub> )	Liberación de una carga modelo <i>in vitro</i>	191
	0.3	Estomatocito (Pt-polímero)	-	192
	0.2	Esfera Janus (Pt-Cr-SiO <sub>2</sub> )	Liberación de Doxo <i>in vitro</i>	193

En los **capítulos III y IV** se describe en profundidad un **nanomotor metálico** basado en **Pt** propulsado por la reducción catalítica de bajas concentraciones de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**.

#### - *H<sup>+</sup> como combustible*

En el contexto de la búsqueda de combustibles más aptos para las aplicaciones biomédicas, ha surgido el uso de burbujas de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como fuerza motriz. Los motores que las emplean están compuestos por materiales biocompatibles como zinc,<sup>194</sup> magnesio<sup>195</sup> y calcio,<sup>196</sup> los cuales se descomponen al entrar en contacto con los protones de disoluciones ácidas, propulsando a los dispositivos (**Reacciones I.2-4**).



#### **Reacciones I.2-4. Mecanismos de propulsión de los motores accionados por ácido.**

Un ejemplo fue desarrollado por de Ávila y su equipo, quiénes idearon un micromotor propulsado por H<sub>2</sub> para el tratamiento de infecciones gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (**Figura I.15a**).<sup>195</sup> Consistía en una micropartícula de magnesio recubierta de forma asimétrica con PLGA y quitosano, dejando un hueco para el acceso del combustible hasta el núcleo. El PLGA ofrecía capacidad de encapsulación del antibiótico claritromicina (CLR), el quitosano aportaba cargas positivas para su adhesión a la pared estomacal y el magnesio dotaba al micromotor de movimiento en respuesta al pH ácido de los jugos gástricos. Los dispositivos exhibieron autopropulsión derivada de la generación de microburbujas en fluido gástrico simulado, fueron capaces de neutralizar el pH estomacal, liberaron concentraciones clínicamente relevantes de CLR y lograron reducir la viabilidad de *H. pylori* en condiciones que simulaban el ambiente gastrointestinal. Además, los resultados fueron trasladados con éxito *in vivo* en un modelo murino de infección por el mismo microorganismo, sin causar toxicidad indeseada en las células estomacales. En conclusión, los autores demostraron las atractivas capacidades de los motores accionados por fluidos corporales para el tratamiento de diversas enfermedades.

En general, estos motores están destinados a actuar en ciertos microambientes muy concretos caracterizados por presentar pH ácido, como el sistema gastrointestinal o el TME. Para

superar esta limitación, se está estudiando el empleo de agua como combustible, por su ubicuidad y abundancia en los seres vivos, pero todavía se encuentra en estado incipiente (**Reacción I.5**).<sup>197</sup> Adicionalmente, el exceso de burbujas de H<sub>2</sub> puede ser perjudicial para el organismo al causar trombos gaseosos.



#### Reacción I.5. Mecanismo de propulsión de los motores accionados por agua.

##### I.5.3.3 Motores enzimáticos

Los **nano- y micromotores enzimáticos** desarrollados hasta la fecha están compuestos por proteínas con actividad catalítica acopladas a distintos tipos de partículas, generalmente inorgánicas,<sup>198</sup> aunque también hay ejemplos de poliméricas,<sup>199</sup> lipídicas<sup>200</sup> y MOFs.<sup>201</sup> Siguen mecanismos de propulsión por burbujas, auto-electroforesis y difusioforesis. Además, algunos autores han discutido si los cambios conformacionales cíclicos,<sup>202</sup> las interacciones entre las subunidades<sup>203</sup> o las condiciones exotérmicas de la catálisis enzimática pueden desempeñar un papel en el movimiento, por termoforesis al generar calor<sup>204</sup> o por efecto quimio-acústico al generar una onda de presión asimétrica.<sup>205</sup> La naturaleza química de los sustratos y productos, así como de las enzimas involucradas influye en el comportamiento motil de las partículas.

Ante la gran variedad de enzimas disponibles, su especificidad y su eficacia biocatalítica en condiciones fisiológicas, estos motores cuentan con la ventaja de poder adaptarse para entregar fármacos en multitud de ambientes biológicos. Existen ejemplos que incorporan: lipasa, que degrada triglicéridos;<sup>206</sup> desoxirribonucleasa (DNAsa), que degrada ADN;<sup>207</sup> ribonucleasa (RNAsa), que degrada ARN;<sup>208</sup> y ATPasa, que descompone ATP en adenosín difosfato (ADP).<sup>209</sup> Asimismo, otros motores emplean enzimas presentes en los microambientes terapéuticos para autopropulsarse, como la óxido nítrico sintasa (iNOS),<sup>210</sup> que transforma L-arginina en microburbujas de óxido nítrico (NO); o la cistationina β-sintasa (CBS),<sup>211</sup> que transforma L-cisteína en H<sub>2</sub>S en estado gaseoso (**Reacciones I.6-11**).



#### Reacciones I.6-11. Mecanismos de propulsión de motores accionados por reacciones enzimáticas.

Sin embargo, las enzimas motoras más comunes son la GOx,<sup>212</sup> la catalasa<sup>213</sup> y la ureasa,<sup>214</sup> las cuales emplean como combustible glucosa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y urea, respectivamente. Además, algunos motores se propulsan por múltiples reacciones enzimáticas en cascada, iniciadas por la acción de la GOx.

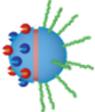
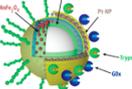
### - Glucosa como combustible

Para aplicaciones *in vivo*, los nano- y microsistemas activos accionados químicamente demandan la selección de combustibles inocuos y disponibles en el organismo. Entre ellos, destaca la **glucosa**, ya que, al ser la principal fuente energética de la mayoría de los organismos, es ubicua y presenta niveles elevados en sangre (~4-6 mM) y otros tejidos.<sup>215</sup> Los motores que la emplean como combustible están funcionalizados con **GOx**, una enzima muy activa que **cataliza la descomposición de glucosa en ácido glucónico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reacción I.12, Tabla I.6)**. La acumulación de los productos de reacción o la sucesiva catálisis del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> autogenerado induce su movimiento por los mecanismos de **difusioforesis** o **propulsión por burbujas**, respectivamente.<sup>216</sup>



#### Reacción I.12. Descomposición enzimática de glucosa: mecanismo de propulsión de los nano- y micromotores compuestos por GOx.

Tabla I.6. Lista de nanomotores compuestos por GOx que emplean glucosa como combustible.

DESCRIPCIÓN	NANOARQUITECTURA Y COMPOSICIÓN	APLICACIÓN	REFERENCIA
	Nanovarilla (Pt-polipirrol-GOx)	-	217
	Esfera Janus hueca (SiO <sub>2</sub> -GOx)	-	218
	Esfera Janus (SiO <sub>2</sub> -PDA-GOx-catalasa)	-	219
	Estomatocito (Polímero-GOx-catalasa)	-	220
	Esfera Janus (Polímero-GOx-Pt-tripsina)	-	221
	Esfera Janus (Au-PNIPAM-GOx)	-	222
	Forma de matraz (C-GOx-catalasa)	-	223
	Esfera Janus (SiO <sub>2</sub> -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GOx)	Detección de glucosa en células	224
	Esférica (Polipirrol-GOx-catalasa)	Degradación de clorofenol en agua	225
	Esférica (Nanoclústeres de Au-GOx-catalasa)	Reducción de la metástasis tumoral	226
	Janus dendrítica (Au-SiO <sub>2</sub> -GOx)	Penetración en biofilms	212



Janus  
(Au-SiO<sub>2</sub>-GOx-catalasa)

Liberación de una carga  
modelo

227

En el **capítulo V** se describe en profundidad un **nanomotor híbrido metálico-enzimático** basado en **GOx** y Pt propulsado por la transformación de **glucosa** en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### - *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como combustible*

El robusto y ampliamente explorado sistema catalítico Pt/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha inspirado el desarrollo de nano- y microrobots accionados por la descomposición enzimática de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Destacan los sistemas que incorporan catalasa, una enzima con una alta eficacia catalítica que reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> (**Reacción I.13**).<sup>228</sup> Aunque esta aproximación avanza en biocompatibilidad al eliminar el componente metálico, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerida sigue suponiendo un cuello de botella para conseguir su traslación clínica.



#### **Reacción I.13. Mecanismo de propulsión de los motores accionados por catalasa.**

En el grupo donde se ha llevado a cabo la presente tesis doctoral, previamente se desarrolló un nanomotor propulsado por la transformación enzimática de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la liberación intracelular de fármacos en células cancerosas (**Figura I.15b**).<sup>229</sup> Consistía en una nanopartícula Janus sintetizada por emulsión de Pickering. Por un lado, una de las caras era una MSN que actuaba como nanocontenedor para Doxo, siendo capaz de controlar su liberación mediante su funcionalización con una puerta molecular sensible a estímulos redox, formada por PEG modificado con enlaces disulfuro. Por otro lado, la cara opuesta era una nanopartícula de oro, que servía como soporte para el anclaje de la enzima catalasa de forma asimétrica. Los autores demostraron el movimiento autónomo de los nanodispositivos y la liberación controlada y mejorada de Doxo en presencia de GSH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. En cultivo de células cancerosas HeLa, la internalización de las nanopartículas y la entrega de la droga también se veía incrementada tras la adición del combustible. Estos resultados revelan que la combinación de MSNs con elementos que las dotan de propulsión supone un progreso en el campo de los nanomotores con habilidades multifuncionales al exhibir: movimiento activo y entrega de fármacos ante el reconocimiento de estímulos específicos.

#### - *Urea como combustible*

La urea es un metabolito omnipresente en los organismos, ya que se produce por la degradación de proteínas. Su concentración es especialmente elevada en la vejiga (~ 300 mM),<sup>230</sup> donde se almacena para su eliminación por la orina. Por tanto, su empleo como combustible es de especial interés para aplicaciones dirigidas a patologías del sistema urinario. Los nano- y microdispositivos activos que la usan están funcionalizados con ureasa, una enzima que descompone urea en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> acuosos (**Reacción I.14**).<sup>231</sup>

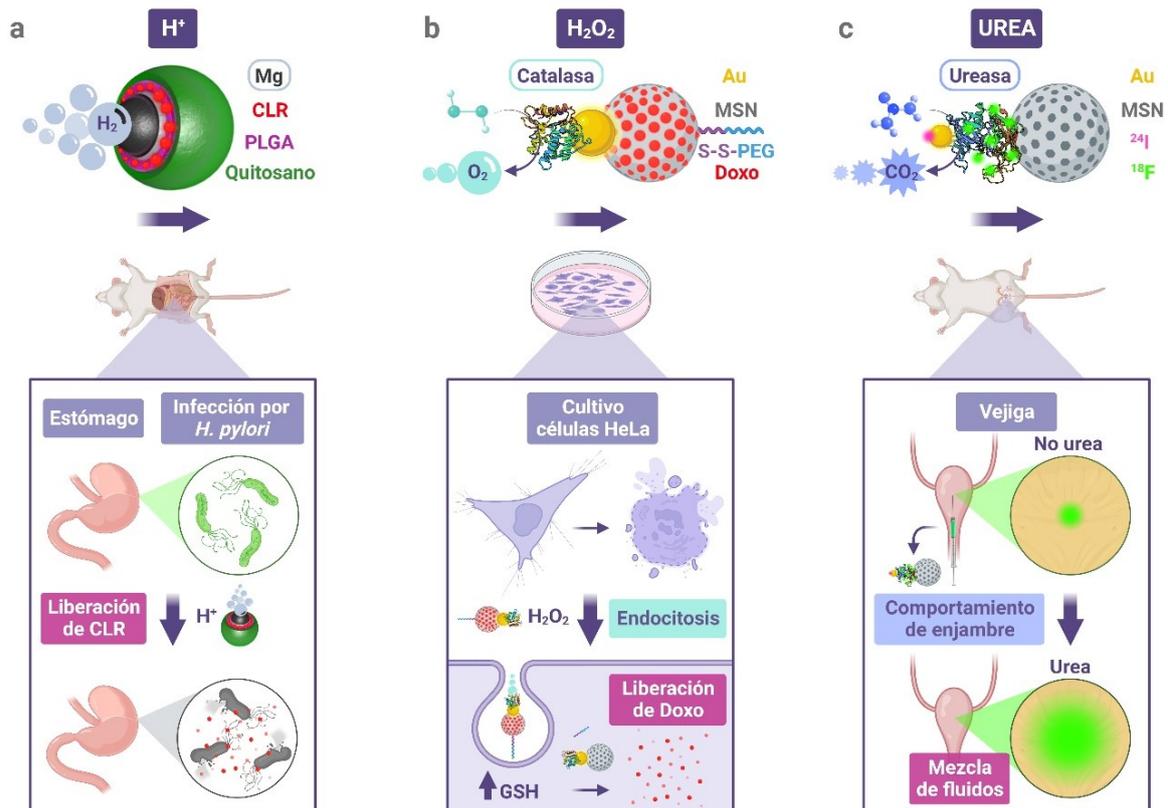


#### **Reacción I.14. Mecanismo de propulsión de los motores accionados por ureasa.**

El equipo liderado por S. Sánchez ha centrado gran parte de su investigación en el desarrollo de prototipos motores accionados por urea para su aplicación en el tratamiento del cáncer de vejiga<sup>232</sup> o de las infecciones urinarias causadas por *E. coli*.<sup>233</sup> Entre sus trabajos destaca el estudio del comportamiento colectivo emergente de los nanomotores para amplificar la respuesta a las nanomedicinas *in vivo*. Para ello, idearon un nanomotor basado en MSNs y ureasa (**Figura I.15c**).<sup>234</sup> En su síntesis funcionalizaron la superficie de las MSNs con APTES y la activaron con glutaraldehído (GA) para anclar covalentemente ureasa y un PEG heterobifuncional (NH<sub>2</sub>-PEG-SH) mediante enlace amida. Sucesivamente, unieron nanopartículas de oro a los grupos tioles y las modificaron con <sup>124</sup>I. Además, anclaron <sup>18</sup>F a los grupos amino libres de la ureasa. Ambos radioisótopos permitieron la visualización por tomografía por emisión de positrones (PET) de las trayectorias de los nanomotores en tiempo real tras su administración por instilación intravesical en vejigas murinas. El análisis PET mostró que los nanomotores navegaban de forma coordinada por toda la cavidad induciendo la formación de vórtices y frentes inestables. Estos resultados prueban que el movimiento de los nanomotores sigue un comportamiento de enjambre que induce la mezcla de los fluidos biológicos en los que están inmersos, lo cual es beneficioso para favorecer los procesos de liberación de fármacos.

Aunque el empleo de enzimas como estrategia motriz sobresale por su biocompatibilidad, por la biodisponibilidad de sus combustibles y por sus condiciones de reacción suaves, presenta algunas limitaciones para su implementación en aplicaciones biomédicas prácticas.

En primer lugar, destaca que los estudios con este tipo de nano- y microrobots son preliminares y todavía no se ha llegado a comprender totalmente los fundamentos de sus mecanismos de propulsión. Además, generalmente, sus velocidades son menores que las presentadas por motores metálicos y, para lograr un movimiento sostenido, es imprescindible que un determinado número de moléculas catalizadoras estén unidas a las partículas y que su actividad sea constante.<sup>235</sup> Sin embargo, en condiciones fisiológicas, muchos factores ambientales pueden afectar su actividad enzimática e incluso inactivarla por la acción de proteasas extracelulares. Asimismo, el reconocimiento de enzimas intracelulares en otras localizaciones puede inducir el desencadenamiento de respuesta inmunitaria contra ellas. Por último, como en la mayoría de los motores, dirigir su direccionalidad hacia las dianas de interés es complicado. Si bien algunos autores han descrito diversos mecanismos de guía por quimiotaxis,<sup>236</sup> el control preciso de sus trayectorias sigue siendo un reto.



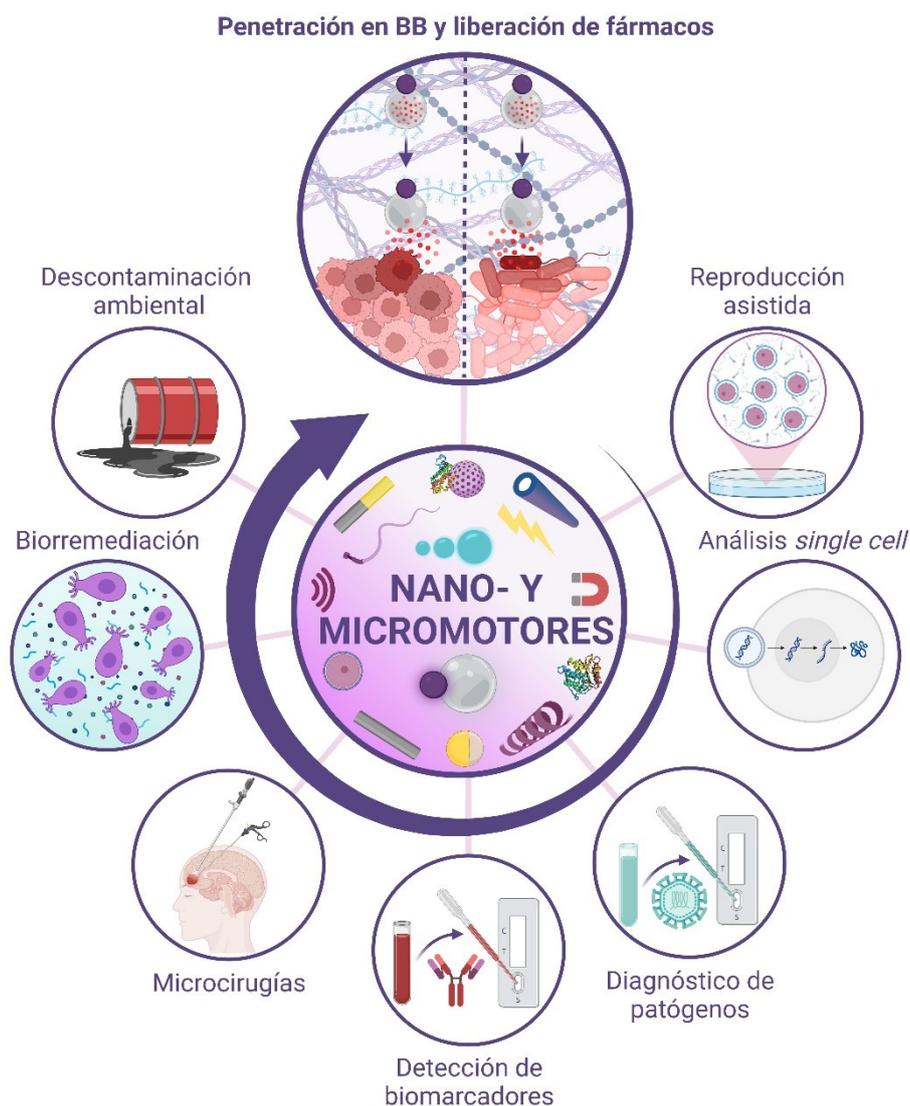
**Figura I.15. Ejemplos de motores catalíticos.** **a** Micromotor propulsado por  $H^+$  para la entrega de fármacos en infecciones gastrointestinales. *Adaptada de Nat. Commun.* 2017, 8, 272. **b** Nanomotor propulsado por la catálisis enzimática de  $H_2O_2$  para la entrega de fármacos en cáncer. *Adaptada de Chem. Commun.* 2019, 55, 13164. **c** Comportamiento de enjambre *in vivo* de nanomotores enzimáticos accionados por urea. *Adaptada de Sci. Robot.* 2021, 6, eabd2823.

#### I.5.4 Otras aplicaciones de los nano- y micromotores

Además del uso de los nano- y micromotores para el transporte de agentes terapéuticos, éstos se aplican en otros campos por las interesantes habilidades derivadas de su autopropulsión (**Figura I.16**). Una de ellas es la captura, transporte y manipulación de células. Se han descrito microrobots biohíbridos capaces de unir, desplazar y liberar espermatozoides con baja movilidad, favoreciendo la fertilización de los ovocitos;<sup>237</sup> microhélices magnéticas para la transferencia de cigotos hasta las trompas de Falopio;<sup>238</sup> micromotores magnéticos capaces de adsorber y manipular células cancerosas;<sup>239</sup> nanovarillas propulsadas por US y guiadas por campos magnéticos para la captura selectiva de bacterias como *E. coli* y *S. aureus*;<sup>240</sup> y biomicromotores propulsados por luz para la captura de levaduras.<sup>241</sup> Otra cualidad de las nano- y micromáquinas activas es la detección y el traslado de biomoléculas y moléculas inorgánicas. En este sentido, se han desarrollado motores capaces de aislar selectivamente ADN,<sup>242</sup> proteínas,<sup>243</sup> endotoxinas bacterianas<sup>244</sup> y ARN de virus como el Zika<sup>184</sup> y el SARS-CoV-2<sup>245</sup> en medios complejos. Del mismo modo, se han diseñado diversos tipos de motores para la eliminación de explosivos,<sup>246</sup> compuestos organofosforados,<sup>247</sup> microplásticos<sup>248</sup> y metales pesados como el mercurio<sup>249</sup> y el plomo;<sup>250</sup> así como biomicromotores asociados a rotíferos marinos para la degradación de contaminantes acuáticos.<sup>251</sup> Por último, también se ha aprovechado la fuerza de propulsión de los dispositivos para la disolución de trombos en el

tratamiento del ictus isquémico<sup>252</sup> y la aterosclerosis,<sup>210</sup> y para la perforación de tejidos en cirugías mínimamente invasivas.<sup>253,254</sup>

En conjunto, estos prototipos abren camino a la posible aplicación futura de las nano- y micropartículas activas como herramientas avanzadas en técnicas de reproducción asistida, análisis y manipulación «*single-cell*», diagnóstico de patógenos, detección de biomarcadores, microcirugías y sistemas de biorremediación y descontaminación ambiental. No obstante, entre todas ellas, sobresale el uso de los nanomotores para resolver la mayor limitación de los nanosistemas pasivos de liberación de fármacos: la **penetración a través de BB para mejorar la entrega de fármacos en áreas de difícil acceso.**



**Figura I.16. Aplicaciones de los nano- y micromotores.**

**CAPÍTULO II:**  
**OBJETIVOS**



En base a los actuales avances y retos en el área de los nanomateriales para la liberación de fármacos en aplicaciones biomédicas, esta tesis doctoral pretende contribuir a la resolución de uno de los principales obstáculos a los que se enfrentan: la **superación de BB para alcanzar áreas patológicas de difícil acceso**. En particular, el objetivo general es el diseño, síntesis, caracterización y evaluación en entornos relevantes de **nanomotores Janus multifuncionales** basados en la conjunción anisotrópica de nanopartículas de platino y nanopartículas mesoporosas de sílice (Janus Pt-MSN) capaces de exhibir:

- Movimiento autónomo.
- Transporte y entrega controlada de moléculas bioactivas en respuesta a estímulos determinados.

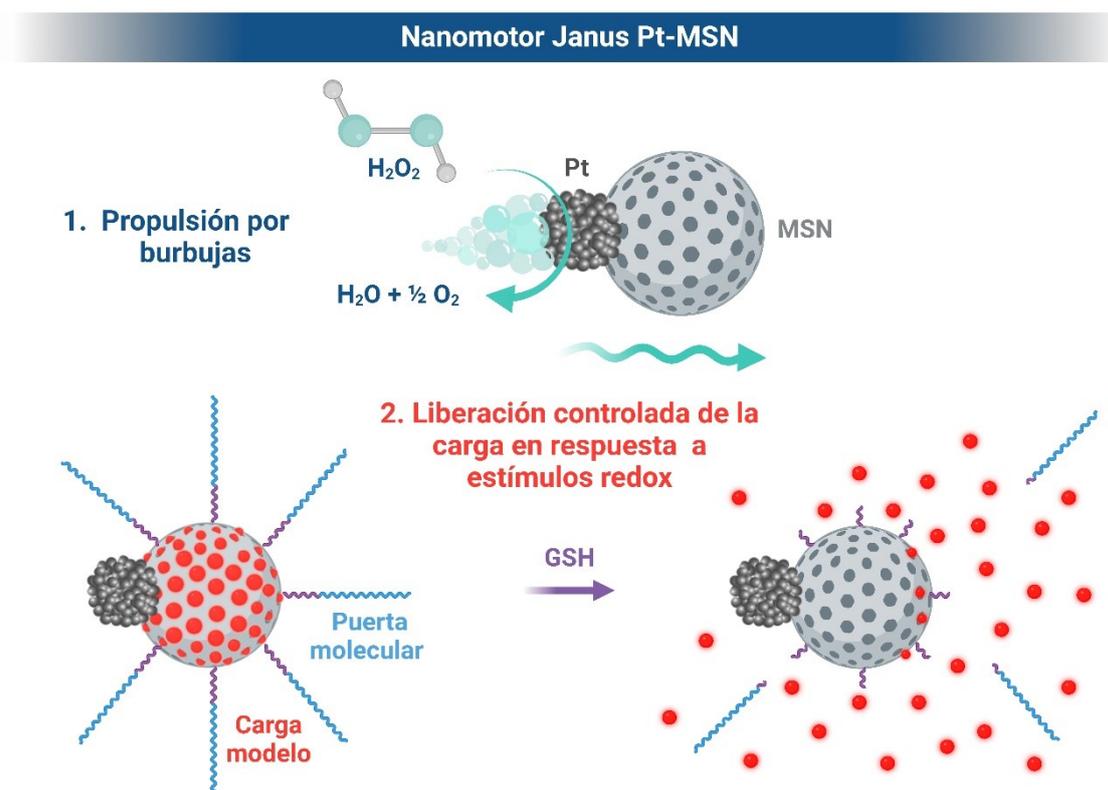
Esta estrategia podría servir como punto de partida para el desarrollo de nuevas terapias avanzadas que mejorarían la eficacia y seguridad de los tratamientos al dirigirlos de forma veloz y específica hacia las zonas enfermas, disminuyendo así los efectos indeseados en tejidos sanos.

Los objetivos concretos que se abordan en esta tesis doctoral son:

1. El diseño, síntesis y caracterización de nanomotores Janus Pt-MSN **propulsados por la descomposición catalítica de  $H_2O_2$  en  $O_2$  (g)**. Además, se explorará la funcionalización de los nanomotores con puertas moleculares sensibles a cambios en el potencial redox.
2. El desarrollo y validación de nanomotores Janus Pt-MSN propulsados por  $H_2O_2$  y funcionalizados con puertas moleculares sensibles a pH ácido, para su **aplicación en la disrupción de la ECM de biopelículas bacterianas y la entrega controlada de agentes antimicrobianos**.
3. El desarrollo y validación de nanomotores Janus Pt-MSN **propulsados por glucosa** y funcionalizados con puertas moleculares sensibles a actividad enzimática, para su **aplicación en la entrega controlada de fármacos anticancerígenos a través de la ECM de tumores sólidos**.

**CAPÍTULO III:**  
**DISEÑO, SÍNTESIS Y**  
**CARACTERIZACIÓN DE**  
**NANOMOTORES**  
**JANUS PT-MSN**

### III.1 RESUMEN GRÁFICO



### III.2 RESUMEN

Uno de los principales objetivos de la nanotecnología es el desarrollo de nanomateriales para la entrega de fármacos en aplicaciones biomédicas. En este sentido, en los últimos años ha surgido el uso de nanodispositivos sintéticos inspirados en los motores moleculares presentes en la naturaleza, *i.e.*, nanomotores. Su autopropulsión les confiere interesantes ventajas frente a los nanosistemas pasivos. Sin embargo, su implementación en entornos reales todavía se enfrenta a importantes retos. Para abordarlos, presentamos el diseño de un nanomotor multifuncional basado en nanopartículas Janus con dos caras diferenciadas de Pt y MSNs. Por un lado, las nanopartículas de Pt constituyen el elemento propulsor al catalizar la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en burbujas de  $\text{O}_2$ . Por otro lado, las MSNs actúan como nanocontenedor para el transporte de moléculas de interés. Además, la posibilidad de funcionalizar su superficie externa con puertas moleculares, dota al nanomotor de capacidad para entregar su carga de forma controlada y localizada únicamente tras el reconocimiento de una señal específica. La caracterización estructural y funcional del nanomotor confirma el éxito en su síntesis, así como la adquisición de las habilidades deseadas: movimiento inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y liberación controlada de una molécula modelo en respuesta a un estímulo redox. En conclusión, nuestros resultados revelan la elevada potencialidad del nanomotor desarrollado para mejorar la entrega de agentes terapéuticos a través de BB como la ECM de biopelículas y tumores sólidos.



### III.3 INTRODUCCIÓN

Por su capacidad de autopropulsión y dimensiones nanométricas, los nanomotores sintéticos han emergido en las últimas décadas como innovadoras plataformas con la habilidad de recorrer el cuerpo humano, atravesando las BB y llevando a cabo tareas de diagnóstico y terapia de forma más eficaz que los micromotores y los nanosistemas pasivos. Esto se debe a que los motores con dimensiones micrométricas encuentran dificultades para acceder al interior de las células,<sup>255</sup> limitando su aplicabilidad en objetivos extracelulares y las nanopartículas pasivas no cuentan con las potenciales ventajas proporcionadas por el movimiento activo: penetración favorecida en tejidos<sup>256</sup> y células,<sup>257</sup> y transporte y entrega de las cargas terapéuticas de forma más rápida.<sup>258</sup> Por tanto, es de enorme importancia estudiar, comprender y caracterizar adecuadamente el movimiento de las nanopartículas activas, así como desarrollar nuevos diseños y técnicas sintéticas que hagan posible su mejora.

#### III.3.1 Nanomotores catalíticos: importancia de romper la simetría

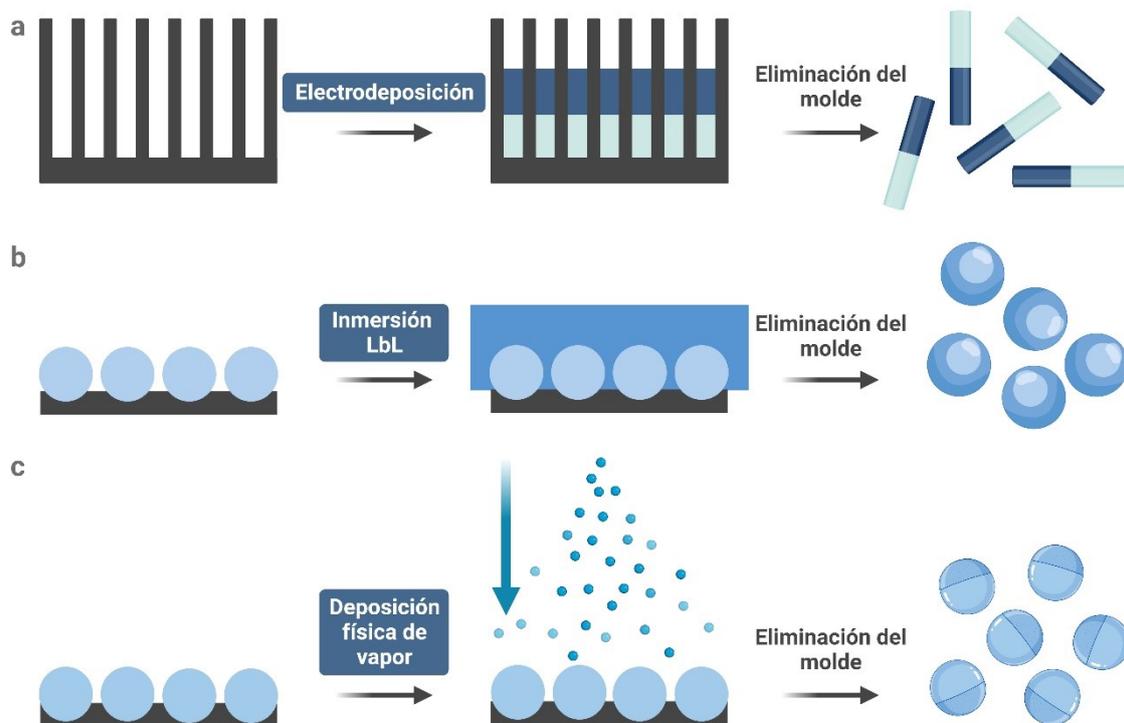
Como se ha explicado previamente, la **asimetría** espacial es un factor clave para lograr el movimiento de los nanomotores propulsados por reacciones químicas. A continuación, se definen las técnicas sintéticas más empleadas para romper la simetría estructural en motores metálicos, haciendo hincapié en método de **emulsión de Pickering**, que hace posible la obtención de **nanopartículas Janus diméricas** y **anisotrópicas**.

##### III.3.1.1 Técnicas de síntesis

Las técnicas más empleadas para la síntesis de nano- y micromotores son las asistidas por moldes o «*template-assisted*» ya que son simples, escalables, económicas y versátiles en términos de tamaño y naturaleza química de los motores. Consisten en la deposición secuencial de materiales siguiendo un orden dirigido por un molde que finalmente se elimina.<sup>259</sup> El molde puede ser interno, si la deposición tiene lugar alrededor de él<sup>169</sup> o externo, si implica el uso de una plantilla porosa en la que los poros actúan como reactores independientes. Ejemplos que emplean moldes externos son la electrodeposición,<sup>260</sup> la deposición «*layer by layer*» (LbL)<sup>261,262</sup> y la deposición física de vapor («*e-beam*» y «*sputtering*»),<sup>180,263</sup> **Figura III.1**. En la electrodeposición se adhieren metales secuencialmente sobre una plantilla de alúmina porosa. Es muy usado para la fabricación de nanovarillas multimetálicas. El resto de las técnicas se emplean principalmente para la síntesis de esferas Janus, ya que se basan en la disposición de nanopartículas esféricas sobre una superficie, de modo que un hemisferio queda bloqueado y el otro queda disponible para su modificación. En la LbL ésta se realiza mediante el ensamblaje electrostático de polielectrolitos de carga opuesta sobre las nanopartículas o mediante la inmersión de éstas en un sustrato. En la deposición «*e-beam*» se recubre a las nanopartículas con una fina película de vapor proveniente del calentamiento de un material en condiciones de vacío y en el «*sputtering*» éstas se recubren mediante pulverización catódica. Alternativamente, este tipo de partículas también puede sintetizarse por nucleación anisotrópica, ajustando los parámetros de las tradicionales reacciones de nucleación isotrópica homogénea.<sup>264</sup>

Otros métodos sintéticos son el «*rolled up*»<sup>147,265</sup> y el «*coaxial spinning*»,<sup>266</sup> los cuales se emplean para la fabricación de motores tubulares huecos. Además, se está evaluando la

aplicación de la impresión 3D al permitir realizar complejos diseños personalizados e imprimirlos en pocos segundos. Aunque por su resolución todavía no se ha podido implementar, su uso para la síntesis de micromotores<sup>267-269</sup> y recientes estudios en la nanoescala revelan su gran potencialidad.<sup>270,271</sup>



**Figura III.1. Técnicas de síntesis de nanomotores metálicos que emplean un molde externo. a** Electrodeposición. **b** LbL. **c** Deposición física de vapor («*e-beam*» y «*sputtering*»).

La deposición «*e-beam*» y el «*sputtering*» son los métodos más empleados para la síntesis de nanomotores Janus de Pt. No obstante, presentan 4 importantes inconvenientes: (i) la ratio entre la capa metálica aportada y la capa no modificada, así como su grosor son difíciles de controlar, lo que lleva a irregularidades y variabilidad; (ii) la capa metálica aportada reduce considerablemente la superficie externa del nanomotor, lo que supone un impedimento para anclar sistemas estímulo-respuesta que proporcionan la capacidad de responder al entorno; (iii) la capa metálica aportada es muy fina, por lo que el área catalítica es reducida. Por este motivo, estos motores suelen necesitar altas concentraciones de  $H_2O_2$  para exhibir una autopropulsión considerable, lo que limita su aplicabilidad en entornos biológicos. Por último (iv), cabe destacar que se trata de técnicas con un elevado coste que permiten obtener una cantidad limitada de nanodispositivos.

#### - Emulsión de Pickering

Este fenómeno fue descrito inicialmente por Pickering<sup>272</sup> en 1907 y fue aplicado como técnica para la síntesis de nanopartículas por primera vez por Granick<sup>273</sup> y sus colaboradores en 2006. En los últimos años se ha ensalzado como una alternativa a los métodos de deposición para fabricar nanomotores Janus al contar con características que solucionan sus problemas. Está basada en la formación de una emulsión de gotas de parafina en agua. Las gotas se estabilizan mediante la adsorción de nanopartículas en la interfaz entre las dos fases inmiscibles

impidiendo su fusión. Esas estructuras se denominan coloidosomas. En ellas, una cara de las nanopartículas queda protegida por la cera, mientras que la otra cara queda expuesta hacia la fase acuosa.<sup>274</sup> Este hecho permite lograr dualidad estructural y funcional, al hacer posible la modificación específica de la superficie expuesta con ligandos orgánicos e incluso otras nanopartículas. En particular, en este trabajo se aplica con modificaciones el método descrito por Villalonga y su equipo en 2013, quienes funcionalizaron MSNs con un organosilano tiolado (3-mercaptopropiltrimetoxisilano, MPTMS) para la unión de nanopartículas de oro, formando nanodispositivos Janus Au-MSN.<sup>275</sup>

### III.3.1.2 Nanopartículas Janus

Las nanopartículas Janus deben su nombre del dios romano Jano (del latín *Janus*, «puerta»). Jano es una representación mitológica de todos los comienzos y los finales y, por ende, de las transiciones y los cambios. Su representación pictórica son dos caras de perfil en sentido opuesto: una mira al pasado y la otra mira al futuro. Siguiendo este concepto, en 1989 Casagrande bautizó como Janus a unas partículas esféricas anfipáticas, en las que un hemisferio era hidrofílico y el otro hidrofóbico.<sup>276</sup> Posteriormente, el término fue popularizado por de Gennes en 1991 en su discurso de recepción del premio Nobel.<sup>277</sup> Desde entonces, la acepción Janus se ha extendido mucho más allá de la concepción inicial, considerándose como **nanopartículas Janus** todas aquellas **formadas por al menos 2 superficies con diferentes propiedades físicas y/o químicas** (anisotropía), que frecuentemente son contrarias (**Figura III.2**).<sup>278</sup>



Figura III.2. Inspiración en el dios romano Jano para el diseño de diferentes nanopartículas Janus con 2 caras diferenciadas.

Las ventajas de este tipo de partículas radican en que las propiedades de cada componente inicial coexisten de forma prácticamente inalterada en el dispositivo final, dando lugar a **nuevas funcionalidades sinérgicas mejoradas**. Además, cada una de las partes puede ser funcionalizada independientemente. Esto es de especial interés en el campo de la entrega específica de fármacos mediante la funcionalización con puertas moleculares, dado que hace posible que un único nanomaterial pueda incorporar distintas unidades para realizar **operaciones avanzadas**, e.g. una unidad de control y una unidad efectora capaces de leer la información del ambiente y proceder a la liberación de la carga en función de ella.<sup>279</sup>

### III.3.2 Movimiento en la nanoescala

Por su reducido tamaño, comprendido entre 10 y 500 nm, los nanomotores se enfrentan a normas físicas que determinan y dificultan su comportamiento motriz y requieren de estrategias experimentales para su estudio que difieren de las empleadas para caracterizar el movimiento de los micromotores. A continuación, se resumen los conceptos clave para comprender las fuerzas que propulsan a estos nanosistemas.

#### III.3.2.1 Factores que afectan al movimiento

Las leyes físicas que gobiernan el movimiento en la nanoescala son 2 principalmente: el **bajo número de Reynolds (Re)** y el **movimiento Browniano** (*vide ante*). Estos factores hacen que el desplazamiento en la escala nanométrica difiera significativamente del movimiento en la escala en la que navegan peces, pájaros o humanos y que su estudio experimental suponga un reto.

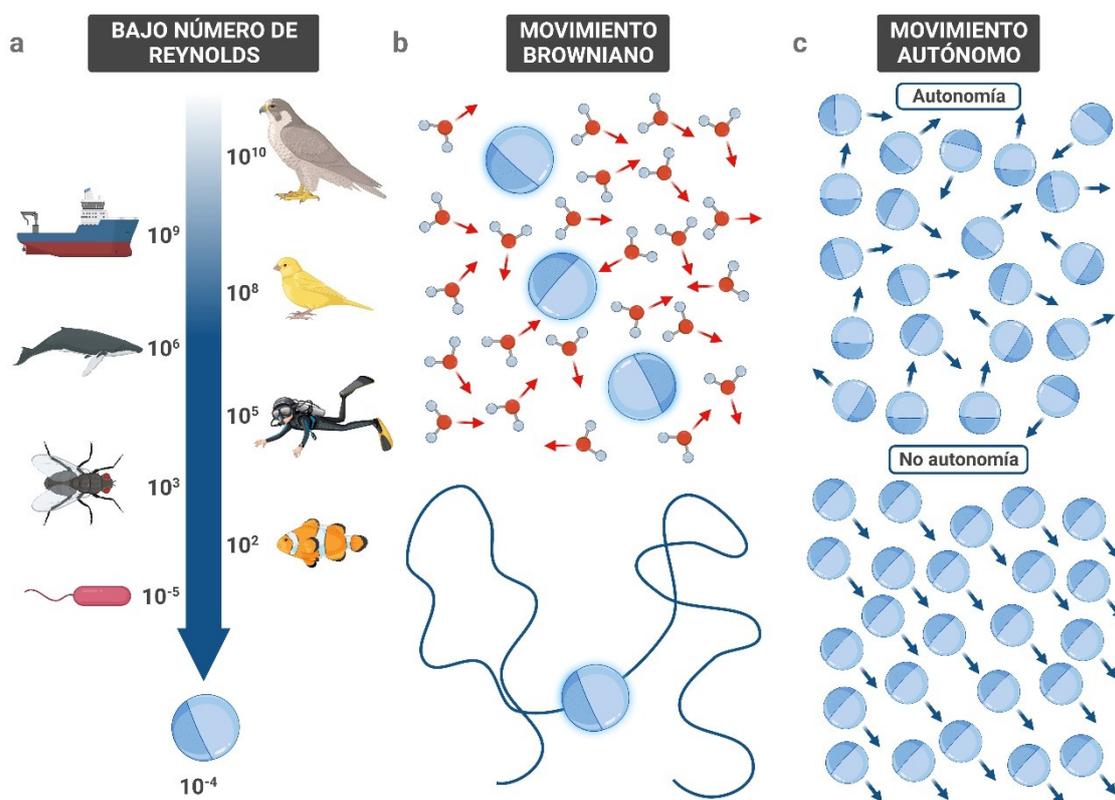
##### - **Bajo número de Reynolds**

Por un lado, por el bajo Re de los nanomotores (**Figura III.3a**), la **viscosidad del medio** juega un papel fundamental. La viscosidad se define como la resistencia de un fluido ante deformaciones producidas por tensiones cortantes. En este contexto, esas tensiones son producidas por el movimiento de las nanopartículas. Cuanto más rápido se mueven, más se deforma el fluido y, como consecuencia, mayor es su resistencia. A bajo Re, la fuerza viscosa trata de detener continuamente el movimiento de las nanopartículas, dejando sin efecto a la fuerza de inercia (**Ecuación I.1**). Un símil que ilustra este concepto es el «*Teorema de la vieira*».<sup>280</sup> Estos moluscos abren y cierran su concha de forma recíproca, pero eso no se traduce en su migración neta debido al bajo Re en el que viven. Solo avanzan un poco al abrirse, pero vuelven al punto de partida al cerrarse. Del mismo modo, cuando la fuerza de propulsión de los nanomotores cesa, éstos detienen su desplazamiento, requiriendo, por tanto, la aplicación de una fuente de propulsión continua. Así, el mecanismo motil de los nanomotores retorna a la concepción aristotélica del movimiento: «*un cuerpo solo puede mantenerse en movimiento si se le aplica una fuerza constante*». Además, la viscosidad también provoca que el movimiento de los nanomotores sea ineficiente energéticamente, pues cuanto mayor es la resistencia del fluido, más se disipa la energía motriz en forma de calor. En conclusión, la **hidrodinámica de bajo Re impide la propulsión recíproca y reduce la eficiencia energética de los nanomotores**.<sup>281,282</sup>

### - *Movimiento Browniano*

Por otro lado, conforme descienden las dimensiones de las partículas, el movimiento Browniano es cada vez más dominante (**Ecuación I.2**). Éste viene dado porque las moléculas del disolvente (generalmente agua) adquieren energía cinética del medioambiente y se mueven aleatoriamente bombardeando a las nanopartículas desde distintas direcciones (**Figura III.3b**). Su efecto radica en que las colisiones continuas hacen que el movimiento tenga lugar en un **régimen turbulento** que dificulta la direccionalidad. En conclusión, el **movimiento Browniano reorienta constantemente a los nanomotores aleatorizando sus trayectorias**.<sup>281,283</sup>

Otro factor que define el movimiento de los nanomotores es la **autonomía** (**Figura III.3c**). Hace referencia a que éstos son capaces de desplazarse de forma independiente unos de otros en direcciones aleatorias. La mayoría de los nanomotores químicos son autónomos. Sin embargo, hay excepciones en el caso de la guía magnética, la quimiotaxis o la deriva por errores en los métodos de observación experimental.<sup>281</sup>



**Figura III.3. Factores que afectan al movimiento de los motores en la nanoescala. a** Bajo Re. **b** Aleatorización Browniana. **c** Autonomía.

#### III.3.2.2 Técnicas para estudiar el movimiento

En la microescala, el movimiento de las partículas se investiga mediante seguimiento por microscopía óptica, posterior reconstrucción de sus trayectorias y cálculo de su velocidad instantánea ( $v$ ), **Ecuación III.1**. Sin embargo, el límite de resolución de esta técnica impide estudiar el movimiento de nanopartículas con un tamaño menor de 300 nm.<sup>284</sup> Para caracterizar el movimiento de los motores en la nanoescala las técnicas más empleadas son la dispersión

dinámica de luz (DLS) y el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Adicionalmente, la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) está indicada para el estudio de nanomotores enzimáticos marcados fluorescentemente<sup>285,286</sup> y la voltamperometría de nanoimpacto para rastrear el comportamiento de los motores metálicos y proteicos<sup>287,288</sup> (**Tabla III.1**).<sup>131</sup>

$$v = \frac{\Delta_l}{\Delta_t}$$

**Ecuación III.1 Velocidad de micromotores.** Donde  $v$  es la velocidad instantánea de las micropartículas,  $\Delta_l$  es el desplazamiento y  $\Delta_t$  es el intervalo de tiempo.

#### - *Dispersión dinámica de luz*

La DLS es una técnica basada en irradiar electromagnéticamente a las partículas y en detectar la luz dispersada por ellas a lo largo del tiempo. Analiza la intensidad de las fluctuaciones de la dispersión de luz calculando la función de correlación de intensidad ( $g_2(t)$ ), cuyo análisis informa acerca del movimiento Browniano de las partículas. Su aplicación mayoritaria es el estudio de la distribución de los diámetros hidrodinámicos de nanopartículas en suspensión coloidal, pero también se ha empleado para estudiar el movimiento de nanomotores metálicos, ya que dispersan la luz en alto grado.<sup>191,289</sup> Además, los datos de tamaño obtenidos por DLS también contribuyen a la caracterización de la motilidad de las partículas, ya que radio y difusión están inversamente relacionados según la ecuación de Stokes-Einstein (**Ecuación I.2**).

#### - *Análisis de seguimiento de nanopartículas*

El NTA es una tecnología acoplada al **equipo NanoSight**. Se basa en el mismo concepto que la DLS, pero cuenta con un microscopio y una cámara digital acoplados (sCMOS). Al irradiar la muestra no solo se recoge la luz dispersada, sino que también se graba un video en el que se capturan las coordenadas  $x$  e  $y$  de cada nanopartícula de forma individual. El software analiza la información obtenida y usa la ecuación de Stokes-Einstein (**Ecuación I.2**) para relacionar la difusión con el tamaño de la nanopartícula. Su principal finalidad es proporcionar información acerca de la dispersión de tamaño y concentración de las nanopartículas en una muestra en solución. Sin embargo, por su superresolución, se emplea en gran medida para **evaluar la difusividad de los nanomotores mediante el cálculo de su desplazamiento cuadrático medio (MSD)**.<sup>180</sup> Esta técnica también puede utilizarse para rastrear nanopartículas fluorescentes registrando la señal de fluorescencia en lugar de la luz dispersada.

En general, para llevar a cabo las medidas experimentales de forma correcta es importante contar con una muestra uniforme a la concentración adecuada y evitar la deriva que se puede inducir por la adición exógena del combustible o por la presencia de burbujas, solutos y/o fugas en el sistema de medida. Para analizar los datos obtenidos sin caer en interpretaciones erróneas, es necesario grabar vídeos lo más largos posibles para poder registrar un número de nanopartículas estadísticamente significativo. Finalmente, es de vital relevancia incluir experimentos control para dilucidar cuál es la causa última de la autopropulsión.<sup>290</sup>

Tabla III.1. Técnicas para estudiar el movimiento de motores catalíticos nanométricos: descripción, adecuación y desventajas. Adaptada de *Nano Today* 2018, 19, 11-15.

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	ADECUACIÓN	DESVENTAJAS
MICROSCOPIA ÓPTICA	Grabación de videos mediante una cámara	Partículas grandes (>300 nm)	Limitación por la resolución de la cámara
FCS	Fluctuaciones en la fluorescencia	Nanopartículas fluorescentes (<300 nm)	Limitación por el volumen confocal y necesidad de fluorescencia
VOLTAMPEROMETRÍA DE NANOIMPACTO	Colisiones con un electrodo	Nanopartículas metálicas y proteínas (<100 nm)	Limitación por tamaño y composición de las partículas
DLS	Fluctuaciones en la luz dispersada	Partículas coloidales dispersas (<10000 nm)	Enmascaramiento de la señal por presencia de agregados
NTA	Fluctuaciones en la luz dispersada	Nanopartículas (<1000 nm)	Limitación por la baja dispersión de luz por partículas muy pequeñas

### III.3.2.3 Parámetros que definen el movimiento

#### - Desplazamiento cuadrático medio

El cálculo del **MSD** es la fórmula más apropiada para cuantificar la movilidad de los nanomotores. Consiste en la medida de la **desviación de la posición de una nanopartícula con respecto a una posición de referencia a lo largo del tiempo**. Representa la media de conjunto del valor cuadrático medio del desplazamiento,  $(\Delta_L)^2$ , en un determinado intervalo de tiempo,  $\Delta t$  (**Ecuación III.2**).<sup>291,292</sup>

$$MSD \equiv \{(x_t - x_0)^2\} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N (x^i(t) - x^i(0))^2$$

**Ecuación III.2. Desplazamiento cuadrático medio.** Donde MSD es el desplazamiento cuadrático medio,  $x^i$  y  $x^t$  son las posiciones vectoriales de las nanopartículas a diferentes tiempos y N es el promedio de nanopartículas.

De la representación del MSD vs  $\Delta t$  crecientes se extraen los parámetros que definen el movimiento de las partículas en los **regímenes balístico y difusivo**. La transición entre ambos regímenes es una característica definitoria de la dinámica de movimiento de las partículas activas y está definida por el tiempo de difusión rotacional ( $\tau_r$ ), **Ecuación III.3**.

$$\tau_r = \frac{8\pi\eta r^3}{kT}$$

**Ecuación III.3. Difusión rotacional.** Donde  $\tau_r$  es el tiempo de difusión rotacional,  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $r$  es el radio de la nanopartícula,  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura.

#### - Régimen direccional: velocidad balística

A escalas temporales menores que  $\tau_r$  ( $\Delta t \ll \tau_r$ ) los nanomotores experimentan un movimiento direccional, también denominado balístico. En ese caso, la relación entre  $(\Delta_L)^2$  y

$(\Delta t)^2$  es proporcional, ajustándose a la parábola dada por la **Ecuación III.4**. De ella se obtiene la velocidad balística de los nanomotores ( $v$ ), parámetro que define este tipo de propulsión.

$$(\Delta_L)^2 = 4D_0\Delta t + v^2\Delta t^2$$

**Ecuación III.4. Velocidad balística de los nanomotores.** Donde  $\Delta_L$  es el desplazamiento,  $D_0$  es el coeficiente de difusión en equilibrio,  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo y  $v$  es la velocidad balística.

- **Régimen difusivo: difusión efectiva**

En cambio, a escalas temporales mayores que  $\tau_r$  ( $\Delta t \gg \tau_r$ ) la dirección del movimiento se aleatoriza y **la propulsión de los nanomotores se manifiesta como un incremento en el coeficiente de difusión (D)**, **Ecuación I.2**. Es decir, en presencia de combustible las nanopartículas difunden más rápido que en su ausencia, lo cual se expresa en un cambio del D. La difusión aumenta desde los valores del estado de equilibrio en ausencia del combustible ( $D_0$ ) hasta valores efectivos mayores generados por la catálisis del combustible ( $D_{eff}$ ). Este fenómeno se conoce como **difusión mejorada** y puede ser caracterizado experimentalmente.<sup>290</sup> En este caso, la relación entre  $(\Delta_L)^2$  e  $\Delta t$  es proporcional y se ajusta linealmente a la recta dada por la **Ecuación III.5**. De su pendiente se obtiene  $D_{eff}$ , parámetro que define este tipo de propulsión.

$$(\Delta_L)^2 = 4D_0\Delta t$$

$$(\Delta_L)^2 = 4D_{eff}\Delta t$$

**Ecuación III.5. Difusión efectiva de los nanomotores.** Donde  $\Delta_L$  es el desplazamiento,  $D_0$  es el coeficiente de difusión en ausencia de combustible,  $D_{eff}$  es el coeficiente de difusión efectivo y  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo.

Por su tamaño, los nanomotores poseen un  $\tau_r$  muy pequeño, por lo que el cambio de régimen balístico a difusivo ocurre en el orden de milisegundos (por ejemplo  $\sim 1$  ms para  $r = 50$  nm y  $\sim 50$  ms para  $r = 200$  nm). Por ello, se ha de tener en cuenta la capacidad para registrar fotogramas por segundo (fps) de la cámara empleada. Lo más común es el uso de cámaras que operan a 30 fps, por lo que el  $\Delta t$  más reducido que pueden registrar es de 0.033 s, perdiendo la información sobre las dinámicas que ocurren en una escala temporal menor. En general, para datos obtenidos con fps menores a 1000 aplicar el régimen balístico es erróneo. Por tanto, **solo se puede estudiar el movimiento de los nanomotores en el régimen difusivo lineal**. Por el contrario, para los micromotores  $\tau_r$  es elevado y solo se puede estudiar su movimiento en el régimen balístico parabólico.<sup>290</sup>

Algunos autores han descrito la obtención de la  $v$  de nanomotores cuyo MSD se ajusta linealmente mediante la aplicación de la **Ecuación III.6**.<sup>289,293</sup> Pero este cálculo solo puede implementarse si el ajuste lineal se aplica solo a las nanopartículas que se desplazan en línea recta a lo largo de sus ejes de propulsión y si se cuenta con una cantidad de datos elevada.

$$D_{eff} = D_0 + \frac{v^2 \tau_r}{4}$$

**Ecuación III.6. Cálculo de la velocidad de los motores a partir del coeficiente de difusión.** Donde  $D_{eff}$  es el coeficiente de difusión efectivo,  $D_0$  es el coeficiente de difusión en equilibrio,  $v$  es la velocidad balística  $\tau_r$  es tiempo de difusión rotacional.

Por último, una forma indirecta de medir la fuerza de propulsión de los nanomotores ( $F_{prop}$ ) es mediante el cálculo de la fuerza de resistencia del fluido en el que están inmersos ( $F_{drag}$ ), ya que a bajo Re  $F_{prop}$  y  $F_{drag}$  son equivalentes (régimen sobreamortiguado), **Ecuación III.7.**<sup>282</sup>

$$F_{drag} = 6\pi r v$$

**Ecuación III.7 Fuerza de propulsión.** Donde  $F_{drag}$  es la fuerza de resistencia del fluido,  $r$  es el radio de la nanopartícula y  $v$  es la velocidad de la nanopartícula.



### III.4 OBJETIVOS

En el contexto expuesto se enmarca el objetivo general del presente capítulo: el desarrollo de un **nanomotor catalítico multifuncional** basado en nanopartículas Janus diméricas con nanoarquitectura de «*muñeco de nieve*». El nanomotor contará con 2 caras opuestas de nanopartículas de platino y nanopartículas mesoporosas de sílice, **Janus Pt-MSN**, y será capaz de combinar en un mismo nanodispositivo **autopropulsión y liberación controlada de su carga**. Su síntesis se va a realizar mediante la conjunción toposelectiva de ambas nanopartículas empleando el método de emulsión de Pickering.

La elección de los componentes y la técnica sintética se debe a la necesidad de obtener nuevos motores nanométricos con: (i) un área catalítica amplia y muy activa, para lograr alta difusividad a baja concentración de combustible; y (ii) una amplia área superficial disponible para ser funcionalizada con ligandos orgánicos y/o puertas moleculares, para lograr la entrega específica de fármacos en localizaciones diana.

Los subobjetivos específicos de este capítulo son:

- La síntesis del nanomotor Janus Pt-MSN (NM) mediante el método de emulsión de Pickering.
- La confirmación de la estructura y composición de NM mediante las técnicas habituales de caracterización de nanomateriales.
- El estudio del comportamiento motor de NM en respuesta a la reducción catalítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en burbujas de  $\text{O}_2$  mediante las técnicas NTA y DLS.
- La exploración de las habilidades de NM para su uso en la liberación específica y localizada de fármacos mediante su cargado con una molécula modelo y su funcionalización con una puerta molecular sensible a estímulos redox, formada por PEG modificado con grupos di-tiol.
- La evaluación de la biocompatibilidad de la plataforma inorgánica NM.

### III.5 MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.5.1 Reactivos

Para la síntesis y caracterización de los nanomateriales desarrollados se utilizaron los siguientes reactivos químicos: bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), tetraetilortosilicato (TEOS), ácido hexacloroplatínico ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ), poli(vinilpirrolidona) (PVP), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), citrato sódico tribásico dihidratado, parafina, 3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS), ácido 3-mercaptopropiónico, hexahidrato de tris(2,2'-bipiridil) diclororutenio (II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ ), disulfuro de 2,2'-dipiridilo, o-(2-mercaptoetil)-o'-metilhexa(etilenglicol) (PEG-SH), ácido 2,2'-azino bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), L-glutiación reducido (GSH) y reactivo de viabilidad celular WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitro-fenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno sulfonato), adquiridos en Sigma Aldrich.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %, v/v) y tampón fosfato salino (PBS), proporcionados por Thermo Fisher. Hidróxido de sodio, etanol, cloroformo, tolueno y acetonitrilo, adquiridos en Scharlab. Medio «Eagle» modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS), Medio «Roswell Park Memorial Institute» (RPMI), aminoácidos no esenciales y tripsina, proporcionados por Gibco-Invitrogen.

#### III.5.2 Síntesis de nanopartículas

##### III.5.2.1 Síntesis de Pt

Para la síntesis de las nanopartículas coloidales de platino (Pt) se siguió el siguiente procedimiento.<sup>294,295</sup> En primer lugar, se disolvieron 164 mg de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  y 20 mg de PVP en 20 mL de agua desionizada (DI). Por otro lado, se preparó una disolución de 350 mg de ácido ascórbico en 10 mL de DI. A continuación, la disolución de ácido ascórbico se añadió sobre la disolución de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ . La temperatura se incrementó hasta 45 °C y la reacción se mantuvo en agitación magnética durante 3 h. El cambio de color, de amarillo pálido a negro, indica la formación de las nanopartículas de Pt (Figura III.4).

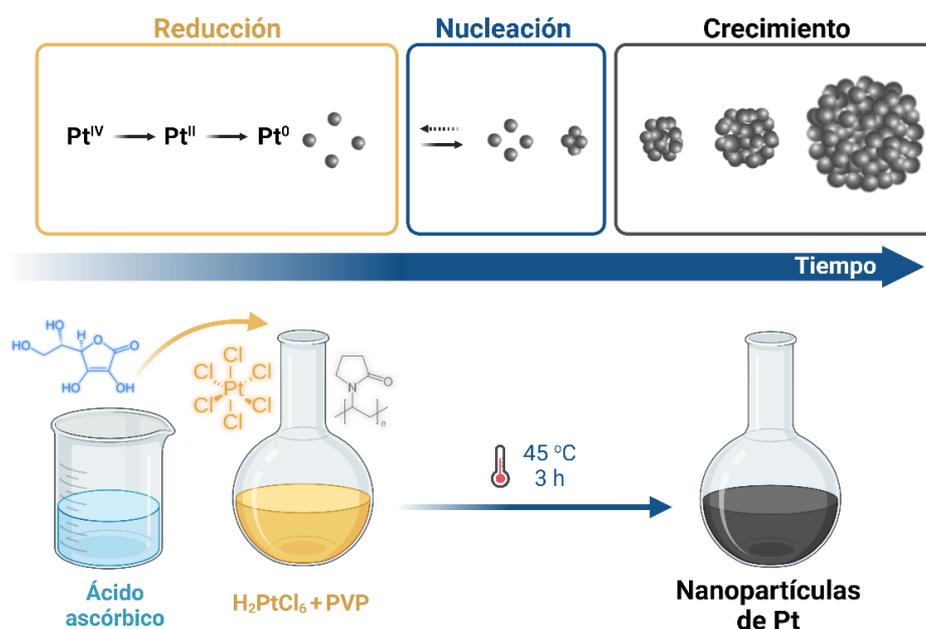


Figura III.4. Proceso de síntesis de nanopartículas de Pt: reducción, nucleación y crecimiento.

### III.5.2.2 Síntesis de MSN

Para la síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice tipo MCM-41 se aplicó el método descrito en la introducción general (**Sección I.3.1**).<sup>70</sup> De forma resumida, se disolvió 1 g de CTAB en 480 mL de DI y la solución se agitó magnéticamente. A continuación, se añadió 3.5 mL de NaOH 2 M para aumentar el pH y se elevó la temperatura de la mezcla hasta los 80 °C. En este punto, se añadió TEOS gota a gota sobre la solución. La mezcla se agitó magnéticamente durante 2 h a 80 °C. En ese tiempo, la disolución incolora y transparente dio lugar a un precipitado de color blanco. El sólido se aisló por centrifugación a 9.500 rpm durante 20 min y se lavó con DI mediante centrifugaciones seriadas hasta que el sobrenadante alcanzó pH neutro. Tras ello, el sólido se secó en una estufa de 70 °C durante una noche, obteniendo el nanomaterial denominado «*as made*». Para obtener el nanomaterial mesoporoso final (**MSN**), el sólido «*as made*» fue calcinado en una mufla (Mufla Furnace) a 550 °C en atmósfera oxidante durante 5 h para eliminar el CTAB y dejar los mesoporos disponibles (**Figura III.5**).

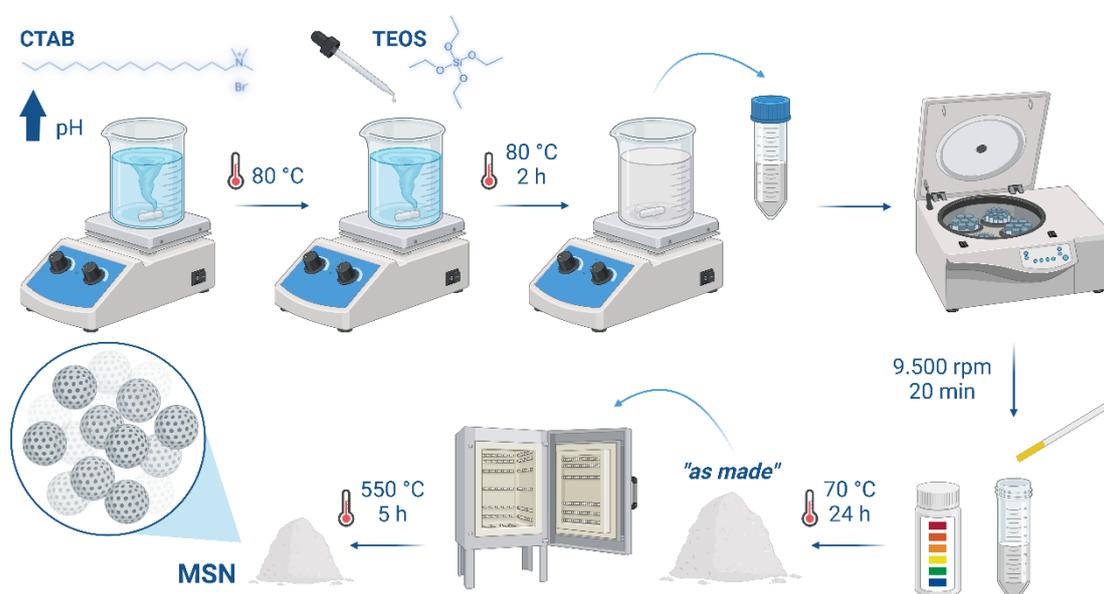


Figura III.5. Ilustración esquemática del proceso de síntesis de MSN.

### III.5.2.3 Síntesis de NM

Para la síntesis de los nanomotores Janus Pt-MSN (**NM**) se siguió con modificaciones el método de emulsión de Pickering desarrollado por Villalonga y su equipo (**Sección III.3.1.1**).<sup>275</sup> En primer lugar, se dispersaron 180 mg de MSNs en 9 mL de una solución acuosa de etanol al 6.7 %. A continuación, se disolvieron 18 mg de CTAB en 1 mL de la disolución EtOH/H<sub>2</sub>O preparada anteriormente. Se añadieron 208 µL de CTAB (concentración final 1 µM) al tubo de reacción y la mezcla se agitó magnéticamente unos minutos. La temperatura se incrementó hasta los 75 °C y se añadió 1 g de parafina. Cuando la parafina se fundió, se procedió a la homogeneización de la mezcla. Para ello, se empleó un Ultra-Turrax T-8 (IKA, Alemania), aumentando la velocidad paulatinamente hasta alcanzar un valor de 25.000 rpm. La agitación se mantuvo durante 10 min. Después, la reacción se agitó magnéticamente a 75 °C durante 1 h para formar la emulsión de Pickering. Pasado ese tiempo, la mezcla se trasvasó a un matraz de

fondo redondo y se enfrió a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 10 mL de metanol y 200  $\mu\text{L}$  de MPTMS, y la reacción se mantuvo en agitación magnética durante 3 h. El sólido resultante, MSNs parcialmente funcionalizadas con MPTMS, se aisló por centrifugación a 9.500 rpm durante 10 min y se lavó con metanol dos veces. Las MSNs mercapto-funcionalizadas se dispersaron en 68 mL de metanol y se unieron a los 30 mL de nanopartículas coloidales de Pt previamente sintetizadas. La reacción se agitó magnéticamente durante una noche a temperatura ambiente. Por último, el sólido resultante de color negro se aisló por filtración empleando una membrana de nailon (poro 0.2  $\mu\text{m}$ ), se lavó con cloroformo mediante centrifugaciones seriadas de 3 min de duración a 13.500 rpm y se secó en una estufa a 70  $^{\circ}\text{C}$  a lo largo de una noche. Con este proceso se obtuvieron los nanomotores NM (**Figura III.6**).



**Figura III.6.** Representación esquemática del procedimiento seguido para la síntesis de NM.

#### III.5.2.4 Síntesis de $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$

Para estudiar la capacidad de los nanomotores sintetizados para transportar fármacos y liberarlos de forma controlada, los poros del soporte inorgánico NM se cargaron con una molécula modelo, el complejo hexahidrato de tris(2,2'-bipiridil) dicloro rutenio (II) (Ru) y a su

superficie externa se ancló una puerta molecular sensible a especies redox, formada por o-(2-mercaptoetil)-o'-metilhexa(etilenglicol) (PEG-SH).

El primer paso fue proteger la cara de Pt de los NM mediante su funcionalización con ácido 3-mercaptopropiónico. Para ello, se mezclaron 50 mg de NM con 70  $\mu$ L de esta molécula utilizando etanol como disolvente. La reacción se mantuvo en agitación magnética durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, el sólido se lavó con etanol mediante centrifugación a 13.500 rpm durante 3 min, tres veces.

#### - *Cargado de NM con Ru ( $NM_{Ru}$ )*

El siguiente paso fue el cargado de los poros de la cara de MSN de los NM con el colorante. Para ello, los NM se suspendieron en una solución concentrada de Ru en ACN (25 mg en 3 mL). La reacción se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido  $NM_{Ru}$  se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min).

#### - *Funcionalización de $NM_{Ru}$ con -S-S-PEG*

El siguiente paso fue la funcionalización mediante «*grafting*» de la cara de MSN de los NM con la puerta molecular. En primer lugar,  $NM_{Ru}$  reaccionó con 93  $\mu$ L de MPTMS durante 5.5 h empleando tolueno como disolvente. En segundo lugar, se añadieron 110 mg de disulfuro de 4,4'-dipiridilo a la mezcla y la reacción se agitó magnéticamente durante 24 h. Pasado ese tiempo, el sólido tiolado se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min) y se volvió a suspender en 3 mL del mismo disolvente. En tercer lugar, se añadieron 50  $\mu$ L de PEG-SH a la mezcla y una punta de espátula de Ru para minimizar la pérdida de la carga. La reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante una noche. El PEG-SH reaccionó con los grupos tioles que funcionalizaban la superficie de las nanopartículas formando enlaces covalentes disulfuro (S-S-PEG) y bloqueando los mesoporos. Finalmente, la suspensión se centrifugó (13.500 rpm, 3 min) y el sólido resultante se lavó con tolueno siguiendo el mismo método hasta que el sobrenadante perdió el color anaranjado característico del Ru. Por último, el material se secó a vacío, obteniéndose el nanomotor final  $NM_{Ru-PEG}$ .

Todas las nanopartículas sintetizadas se molturaron y se almacenaron en desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

### III.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales

Las nanopartículas sintetizadas en la presente tesis doctoral se caracterizaron mediante las técnicas estándar de caracterización de nanomateriales: microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), microscopía electrónica de transmisión de barrido acoplada a espectroscopía electrónica de rayos x (STEM-EDX), espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), difracción de rayos X de polvo (PXRD), adsorción-desorción de  $N_2$ , espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia. La caracterización de los nanomateriales se llevó a cabo en el Instituto Interuniversitario de Investigación de

Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València (UPV).

### III.5.3.1 Microscopía electrónica

Los nanomateriales preparados en este capítulo fueron visualizados mediante 3 técnicas de microscopía electrónica: HR-TEM, FE-SEM y STEM-EDX. Las imágenes de TEM se adquirieron en un microscopio JEOL JEM-1010 operando a 100 kV y las imágenes de FE-SEM en un microscopio ZEISS ULTRA55. Las imágenes de TEM a alta resolución (HR-TEM), los espectros de emisión de rayos X (EDX) y los mapas de elementos se obtuvieron en un microscopio JEOL JEM-2100F 130 operando a 200 kV. Todos los equipos usados pertenecen al Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV. Las muestras se dispersaron en agua a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se depositó una gota de la suspensión sobre una rejilla de cobre recubierta de 300 mallas de carbono y se dejó secar durante una noche.

### III.5.3.2 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

La técnica ICP-MS permite identificar y cuantificar los elementos presentes en un material. Está basada en el acoplamiento de un método de ionización (plasma acoplado inductivamente, ICP) y un método de separación y detección de los iones generados (espectrómetro de masas, MS). Las medidas se realizaron en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València.

### III.5.3.3 Difracción de rayos X de polvo

La difracción de rayos X aporta información sobre la estructura atómica de los materiales cristalinos. Se basa en la relación entre el ángulo formado entre los haces de rayos x incidentes y refractados y los planos ordenados que forman los átomos en el cristal, según la ley de Bragg (**Ecuación III.8**). Así, la posición angular de los máximos de difracción depende del tipo de átomos y de su disposición geométrica, de modo que cada material posee un patrón de difracción determinado que permite su identificación inequívoca. Para realizar las medidas se empleó un difractómetro Bruker axs D8 Advance, utilizando radiación Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ ), intervalos de barrido de  $1.5^\circ < 2\theta < 7^\circ$  y  $35^\circ < 2\theta < 80^\circ$ , pasos de contaje de  $0.04^\circ (2\theta)$  y tiempo de 3 y 1 s paso<sup>-1</sup>, respectivamente. Previamente, las muestras (aproximadamente 200 mg) fueron molturadas y preparadas en forma de pastilla.

$$2d \cdot \text{sen}(\theta) = n \cdot \lambda$$

**Ecuación III.8. Ley de Bragg.** Donde  $d$  es la distancia interplanar,  $\theta$  es el ángulo formado entre los haces incidentes y refractados,  $n$  es un número entero y  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X.

### III.5.3.4 Porosimetría: análisis de isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>

Mediante las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> se obtiene información cuantitativa sobre el tamaño de poro, el volumen de poro y el área superficial de los materiales porosos. Consiste en el cálculo de la cantidad de N<sub>2</sub> que es adsorbido y retenido por el material en función de la presión relativa del gas a temperatura constante (-196 °C). Las medidas se llevaron a cabo en un analizador Micromeritics ASAP2010. Para ello, las muestras

(aproximadamente 30 mg) fueron previamente desgasificadas a 120 °C en condiciones de vacío durante una noche. Las dimensiones de los poros se determinaron aplicando el modelo de Barrett-Joyner-Halenda (BJH)<sup>296</sup> (**Ecuación III.9**) y el área superficial específica se calculó aplicando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET)<sup>297</sup> a los datos del intervalo de bajas presiones (**Ecuaciones III.10 y III.11**).

$$\ln \frac{P}{P_0} = -\frac{2\gamma V_L}{RT} \cdot \frac{1}{r_m}$$

**Ecuación III.9. Modelo BJH: ecuación de Kelvin.** Donde P es la presión parcial del gas adsorbido, P<sub>0</sub> es la tensión de vapor del gas a la temperatura que se realiza la adsorción, γ es la tensión superficial de una interfase esférica, V<sub>L</sub> es el volumen molar del líquido, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura y r<sub>m</sub> es el radio medio de curvatura.

$$\frac{P}{V_{ads} \cdot (P_0 - P)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C - 1}{V_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0}$$

**Ecuación III.10. Modelo BET.** Donde P es la presión parcial del gas adsorbido, P<sub>0</sub> es la tensión de vapor del gas a la temperatura que se realiza la adsorción, V<sub>m</sub> es el volumen de gas adsorbido cuando se ha formado una monocapa, C es la constante dependiente del calor de condensación y adsorción del adsorbato y V<sub>ads</sub> es el volumen de gas adsorbido a presión P.

$$S_g = \frac{V_m \cdot N \cdot A_m}{M_g}$$

**Ecuación III.11. Superficie específica.** Donde S<sub>g</sub> es la superficie específica, N es el número de Avogadro, V<sub>m</sub> es el volumen molar, M<sub>g</sub> es el peso de la muestra de adsorbente empleado y A<sub>m</sub> es la superficie ocupada por la molécula adsorbida, que se puede calcular asimilando el estado adsorbido al estado líquido (para N<sub>2</sub> a -196 °C se admite 0.162 nm<sup>2</sup>).

### III.5.3.5 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

Esta técnica se emplea para identificar los grupos funcionales que están presentes en las moléculas. Se basa en que las frecuencias de las bandas de absorción de la radiación infrarroja (IR) dependen de la excitación de los estados vibracionales de los grupos funcionales, de forma independiente del resto de vibraciones de la molécula en la que están incluidos. Los espectros de FTIR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker TENSOR27, registrando longitudes de onda entre 400 y 4000 cm<sup>-1</sup> (IR medio).

### III.5.3.6 Análisis termogravimétrico

El TGA estudia las variaciones de masa de sólidos en función de los cambios de temperatura. Así, el análisis de los patrones de descomposición térmica permite cuantificar la cantidad de materia orgánica presente en los nanomateriales. Los termogramas se obtuvieron en un equipo TGA/SDTA 851e Mettler Toledo. Las muestras (aproximadamente 4 mg) se sometieron a una etapa de calentamiento (de 25 a 100 °C, velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>), seguida por una isoterma (100 °C durante 30 min), una segunda etapa de calentamiento (de 100 a 1000 °C, velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>) y una última isoterma (1000 °C durante 30 min). Todas las etapas se realizaron en atmósfera oxidante (aire, 80 mL min<sup>-1</sup>).

### III.5.3.7 Dispersión dinámica de luz

La DLS se emplea para estudiar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas. Por un lado, al aplicar radiación electromagnética existe una correlación entre la luz dispersada y el movimiento Browniano, que permite determinar su tamaño (**Ecuación I.2**). Por otro lado, al aplicar una diferencia de potencial eléctrico existe una correlación entre la luz dispersada y la movilidad electroforética, que permite determinar la densidad de su carga superficial. Las medidas de DLS se llevaron a cabo en un instrumento Zeta sizer Nano ZS (Malvern Panalytical) con un láser de 633 nm. Las muestras se dispersaron en agua destilada a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y, posteriormente, se sometieron a ultrasonidos y a un pulso de centrifugación (10.000 rpm) para eliminar la presencia de grandes agregados o sedimentación.

### III.5.3.8 Espectroscopía UV-visible

La espectroscopía UV-vis se emplea para la determinación cualitativa y cuantitativa de las moléculas. Está basada en el registro de las transiciones electrónicas que provoca la absorción de radiación electromagnética generalmente en el intervalo 200-800 nm. Los espectros de absorción UV-vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Lambda 35 UV/vis Perkin Elmer Instrument. Esta técnica se ha aplicado para caracterizar las nanopartículas sintetizadas, estudiar la capacidad de NM para catalizar la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y para los ensayos de viabilidad celular.

### III.5.3.9 Espectroscopía de fluorescencia

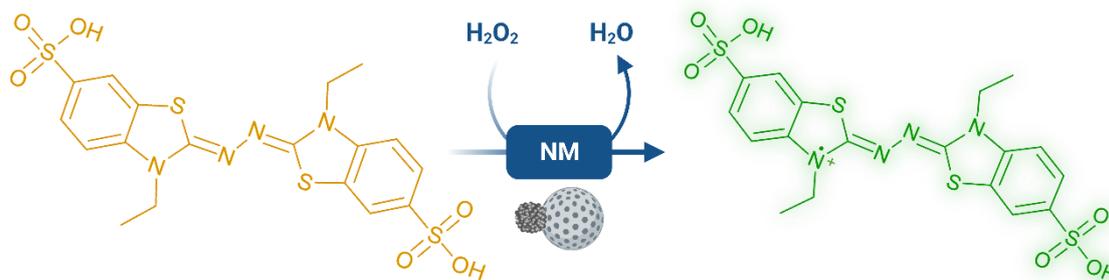
La espectroscopía de fluorescencia registra la emisión de fotones tras la absorción de radiación UV-vis, la cual se produce por las transiciones entre el estado electrónico excitado y el estado fundamental. La intensidad de la fluorescencia emitida depende de la concentración de la molécula en la disolución. Los espectros de emisión de fluorescencia se adquirieron en un espectrofluorímetro JASCO FP-8300 Hitachi High Technologies. Esta técnica se ha aplicado en los ensayos de liberación de la carga de las nanopartículas.

## III.5.4 Caracterización del movimiento de los nanomotores

### III.5.4.1 Ensayo de actividad peroxidasa

Antes de caracterizar el movimiento de los nanomotores, se evaluó su habilidad para descomponer  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante un ensayo que imita la actividad catalítica de la enzima peroxidasa. Está basado en la oxidación del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El resultado es un producto azul verdoso (ABTS\*) que se puede detectar mediante espectrofotometría UV-vis ( $\lambda_{\text{abs}} = 405 \text{ nm}$ ), **Reacción III.1**.

Para llevar a cabo este ensayo se siguió la estrategia de variar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (desde 1 mM a 75 mM) manteniendo constante la de ABTS (9 mM). Las disoluciones se prepararon en PBS 100 mM a pH 5. A continuación, para cada una de las concentraciones estipuladas, se mezclaron 2.9 mL de ABTS, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 50  $\mu\text{L}$  de NM ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en una cubeta a 25 °C y se registró la variación de la absorbancia a 405 nm durante 3 min. La constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) se calcularon a partir de los gráficos de Lineweaver-Burk, según la **Ecuación III.12**.



Reacción III.1. Oxidación de ABTS en presencia de  $H_2O_2$  catalizada por NM.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

**Ecuación III.12. Cinética de Michaelis-Menten.** Donde  $V_0$  es la velocidad de producción del producto,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten,  $V_{max}$  es la velocidad máxima del catalizador y  $S$  es la concentración del sustrato.

#### III.5.4.2 Adquisición de vídeos ópticos y cálculo del desplazamiento cuadrático medio y el coeficiente de difusión

Para evaluar el movimiento de los nanomotores, se analizaron sus trayectorias mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), utilizando un dispositivo Nanosight NS300 (Malvern Panalytical), **Sección III.3.2.2**. Las diferentes nanopartículas (Pt, MSN y NM) se dispersaron en PBS (100 mM, pH 7.5) a una concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Después, se sometieron a ultrasonidos y se introdujeron mediante una jeringa de 1 mL en la cámara del dispositivo Nanosight NS300 (la cual admite un volumen máximo de  $800 \mu\text{L}$ ) a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Previamente, se introdujeron las distintas disoluciones de  $H_2O_2$  (PBS 100 mM, pH 7.5, concentraciones de 0 a 0.2 %, v/v) en la cámara de medida para evitar posibles interferencias por deriva. Una vez se observó que las nanopartículas cesaron el movimiento derivado de su inyección en el dispositivo, comenzó el registro de sus trayectorias. Se grabaron 5 vídeos de 30 s de duración a una velocidad de 30 fps con una cámara sCMOS acoplada a un microscopio óptico de 20 aumentos. Se empleó un código R de desarrollo propio para analizar las coordenadas x-y de las nanopartículas a lo largo del tiempo, aplicando la **Ecuación III.2** para calcular el MSD de cada una de ellas. A continuación, se representó linealmente MSD vs  $\Delta t$  (1 s) para obtener el  $D_0$  y el  $D_{eff}$  de las nanopartículas, mediante la aplicación de la **Ecuación III.5**. Siguiendo el mismo método, se representaron gráficamente sus trayectorias espaciales. Este análisis se aplicó a una población de 50 nanopartículas con un tamaño similar al obtenido por DLS ( $\pm 50 \text{ nm}$ ), para evitar los agregados y los posibles residuos.

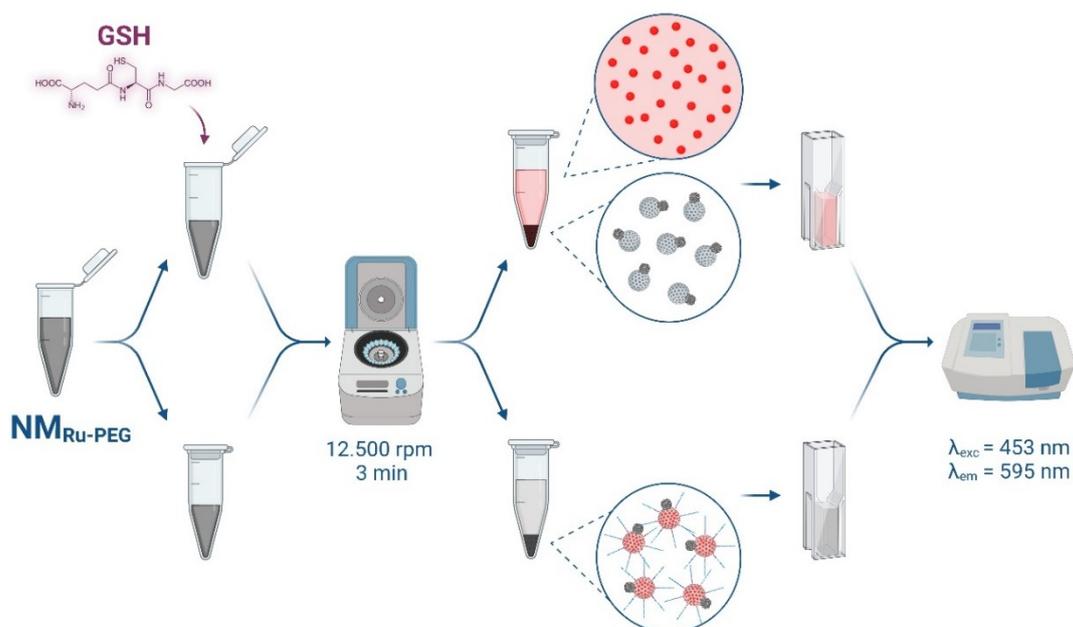
#### III.5.4.3 Estudio de los cambios en el diámetro hidrodinámico por DLS

Como medida indirecta del movimiento de los nanomotores se estudiaron por DLS las variaciones en su diámetro hidrodinámico tras la adición de combustible. Para ello, se prepararon suspensiones de MSN y NM ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en DI), y se sometieron al protocolo indicado para esta técnica. Finalmente, el sobrenadante se trasvasó a la cubeta de medida y se añadió  $H_2O_2$  hasta alcanzar una concentración final de 0.07 % (v/v).

### III.5.5 Ensayos de liberación

Para estudiar la capacidad de los nanomotores para controlar la entrega de su carga en presencia del estímulo GSH se realizaron ensayos de liberación usando los nanodispositivos  $NM_{Ru}$  y  $NM_{Ru-PEG}$ . Para evaluar si la autopropulsión tenía un efecto en la liberación de la carga, los ensayos de liberación se realizaron en condiciones de agitación (no se observa el efecto de la motilidad) y estáticas (se observa el efecto de la motilidad).

En un experimento típico de agitación, se preparó una dispersión de  $NM_{Ru}/NM_{Ru-PEG}$  a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en PBS (100 mM, pH 7.5). El contenido del tubo se separó en dos partes y se añadió PBS hasta alcanzar una concentración de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Las soluciones se colocaron en un agitador (Thermo-shaker HC24N Grant Instruments) durante 30 min a 14.000 rpm y  $37^\circ\text{C}$ . Tras ese período, se añadió el estímulo GSH a uno de los tubos alcanzando una concentración final de 10 mM (en el tubo restante se añadió el mismo volumen de PBS). Ese momento se registró como tiempo de liberación 0. A los tiempos de 2, 5, 10, 15, 20 y 30 min, las dispersiones se centrifugaron (13.500 rpm, 3 min) para aislar las nanopartículas. El Ru liberado (presente en el sobrenadante) se monitorizó mediante espectroscopía de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 453 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$ ) y se devolvió al tubo para continuar el ensayo (**Figura III.7**).



**Figura III.7. Representación esquemática de los ensayos de liberación controlada de  $NM_{Ru-PEG}$ .**

En un experimento típico estático, se prepararon 4 dispersiones de  $NM_{Ru-PEG}$  como se ha explicado previamente ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , PBS 100 mM, pH 7.5), y se mantuvieron sin agitación externa. Cuando las nanopartículas sedimentaron (aproximadamente 30 min), se añadió  $H_2O_2$ , GSH o ambos cuidadosamente a través de la pared del tubo, alcanzando concentraciones finales de 0.1 % y 10 mM, respectivamente. En los tubos control se añadió el mismo volumen de PBS. A los tiempos de 2, 5, 10, 15, 20 y 30 min se tomaron alícuotas de  $200 \mu\text{L}$ , se centrifugaron (13.500 rpm, 3 min) y se midió la fluorescencia del Ru liberado al medio en las condiciones descritas anteriormente.

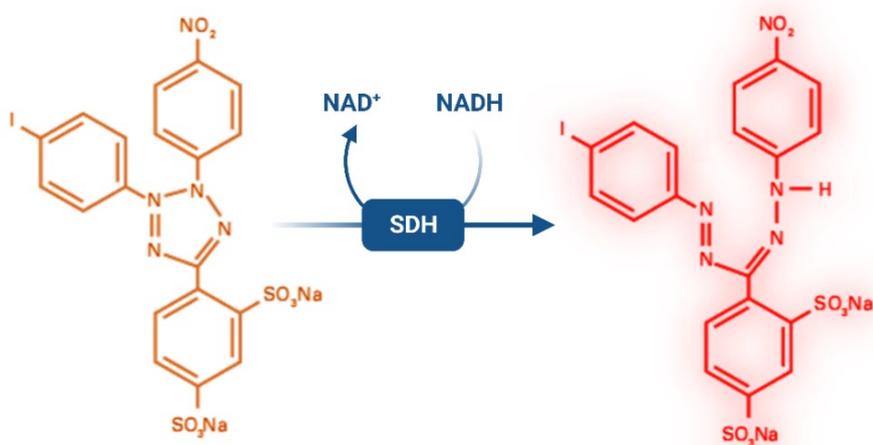
### III.5.6 Ensayos *in vitro*

#### III.5.6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular humana WI-38 de fibroblastos derivados de pulmón se adquirió en la «*American Type Culture Collection*» (ATCC-CCL-75). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de aminoácidos no esenciales, se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> y se pasaron 2 veces por semana. La línea THP-1 se adquirió en la «*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*» (DSMZ). Las células se cultivaron a 37 °C en medio RPMI suplementado con 10 % de FBS y atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> y se pasaron 2 veces cada semana. Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

#### III.5.6.2 Ensayos de viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular, las células WI-38 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 5.500 células pocillo<sup>-1</sup> y se incubaron durante 24 h para adherirse a la placa. Tras ello, se añadieron los tratamientos (NM a concentraciones de 2 a 75 µg mL<sup>-1</sup>) y se incubaron durante 30 min. A continuación, se eliminaron las nanopartículas no internalizadas mediante un lavado con PBS, y las células se incubaron con medio fresco en las condiciones habituales durante 48 h. Pasado ese tiempo, se añadieron 10 µL del reactivo de viabilidad celular WST-1 al medio y se incubó durante 1 h. Finalmente, se midió la absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ nm}$ ) en un lector Perkin Elmer Life Sciences Wallac Victor2™. El principio de esta técnica es la reducción de las sales de tetrazolio (rojo pálido) a formazán (rojo intenso) por parte de enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa, SDH, EC 1.3.99.1) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), **Reacción III.2**. Por tanto, una mayor producción de formazán se correlaciona con un mayor número de células metabólicamente activas. El porcentaje de viabilidad celular se determinó según la **Ecuación III.13**. Los ensayos de viabilidad celular en la línea THP-1 se realizaron por el mismo método. En cambio, las células se sembraron a una densidad de 10.000 células pocillo<sup>-1</sup> y se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (concentraciones de 0 a 0.2 % v/v).



**Reacción III.2. Reducción de la sal de tetrazolio WST-1 a formazán, catalizada por las células metabólicamente activas.**

$$\% \textit{Viabilidad celular} = \frac{A_M}{A_C} \cdot 100$$

**Ecuación III.13. Porcentaje de viabilidad celular.** Donde  $A_M$  es la absorbancia de la muestra tratada y  $A_C$  es la absorbancia del control no tratado ( $\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ nm}$ ).

### III.5.7 Análisis estadístico

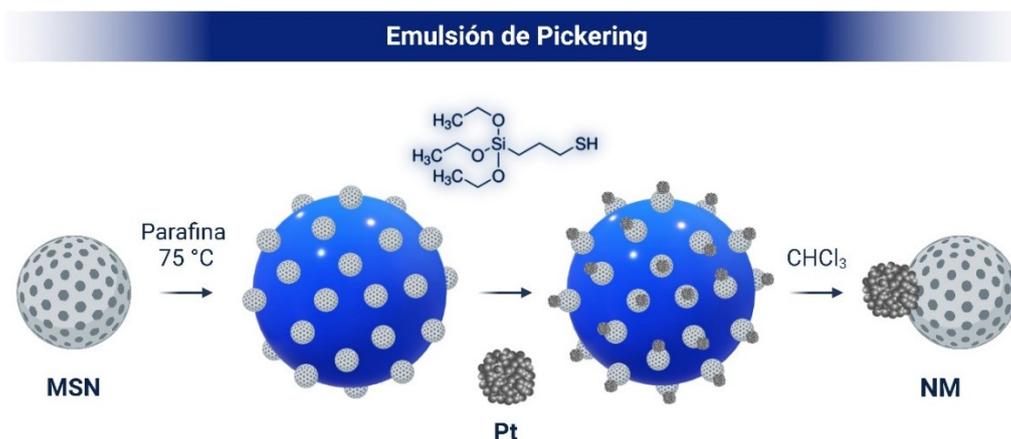
El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism 9.0.2. Se aplicó la prueba ANOVA de una vía, seguido por la prueba post-hoc de Turkey o la comparación múltiple de Dunnett. Los valores  $p$  inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos y se indicaron con asteriscos (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM) o la desviación estándar (SD) de la media de al menos 3 experimentos independientes.

## III.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor

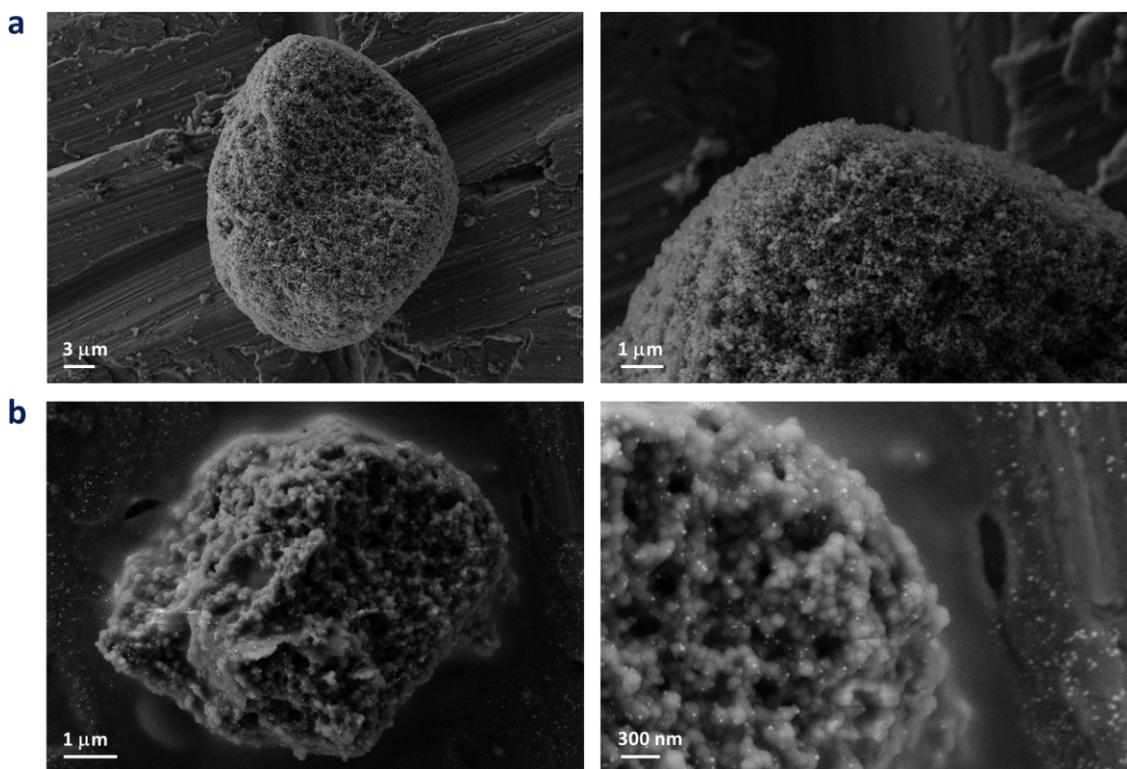
Teniendo en cuenta nuestro propósito, diseñar un nanomaterial con funcionalidades avanzadas: autopropulsión y entrega específica de fármacos, decidimos combinar en un mismo nanodispositivo nanopartículas de Pt y MSNs. Esta elección se debe a las propiedades diferentes y complementarias que presenta cada uno de los componentes por separado. Por un lado, las nanopartículas de Pt catalizan la reducción de ROS. En particular, nos interesa su habilidad para descomponer  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$  (g), actividad análoga a algunas enzimas naturales.<sup>298</sup> Además, seleccionamos nanopartículas de Pt compuestas por multitud de nanodendritas debido a que, por su gran rugosidad, disponen de una superficie catalítica activa muy elevada. Su síntesis se realizó mediante una reducción superficial autocatalítica. En ella, los átomos  $\text{Pt}^0$  formados por la reducción química de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  ( $\text{Pt}^{4+}$ ) con ácido L-ascórbico sirven como sitios catalíticos para la posterior reducción y adición atómica de más Pt en el nanocristal, dando lugar a un crecimiento dendrítico controlado por la adsorción de una monocapa de PVP sobre el metal (**Figura III.4**).<sup>299,300</sup> Por otro lado, las MSNs son uno de los nanovehículos para la entrega de sustancias más interesantes por su alta capacidad de carga, biocompatibilidad y posibilidad de funcionalización con sistemas moleculares de control tipo estímulo-respuesta. Un proceso que da lugar a materiales híbridos orgánicos-inorgánicos «*inteligentes*» capaces de modular la liberación de su carga ante el reconocimiento de determinadas señales, actividad análoga a los sistemas celulares de transporte por membrana.<sup>72</sup> Sin embargo, el empleo de MSNs con puertas moleculares para el desarrollo de nanomotores no ha sido muy extendido, quizá por la dificultad de incluir, además del sistema de puertas, un elemento que genere la fuerza motriz.

Así, la integración de estos 2 elementos (Pt y MSNs) en un único nanosistema tipo Janus Pt-MSN (NM) permite mantener sus características individuales y dar lugar a nuevas propiedades emergentes sinérgicas. En el nanodispositivo anisotrópico, la cara de MSN actúa como nanocontenedor y la cara de nanopartículas de Pt actúa como elemento propulsor, al convertir energía química en energía cinética por la reducción catalítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la posterior nucleación y desprendimiento de burbujas de  $\text{O}_2$ . Además, en este nanomaterial la mayor parte de la cara de MSN queda disponible para la carga de sus mesoporos y la funcionalización de su superficie externa, una ventaja en comparación con los anteriores motores catalíticos de Pt fabricados mediante tecnología de deposición física de vapor («*e-beam*» y «*sputtering*»). Para la síntesis de estas nanopartículas se usó una emulsión de Pickering, es decir, una estrategia de enmascaramiento y manipulación selectiva de interfases (**Figura III.8**).<sup>275</sup> En concreto, se empleó parafina como fase oleosa ya que, en medio acuoso y alta temperatura, se agrupa formando microgotas hidrofóbicas. Sucesivamente, las MSNs se adhieren a su superficie aportándoles estabilidad coloidal e hidrofiliidad superficial. Las estructuras resultantes se denominan coloidosomas. En ellas, una parte las MSNs queda protegida por la parafina, mientras que la parte opuesta queda orientada hacia el medio acuoso. Este hecho es aprovechado para la funcionalización selectiva de la superficie expuesta. En este caso, se modificó con un organosilano (MPTMS) para la posterior quimio-adsorción de las nanopartículas de Pt sobre los grupos tiol libres aportados, dando lugar a NM.

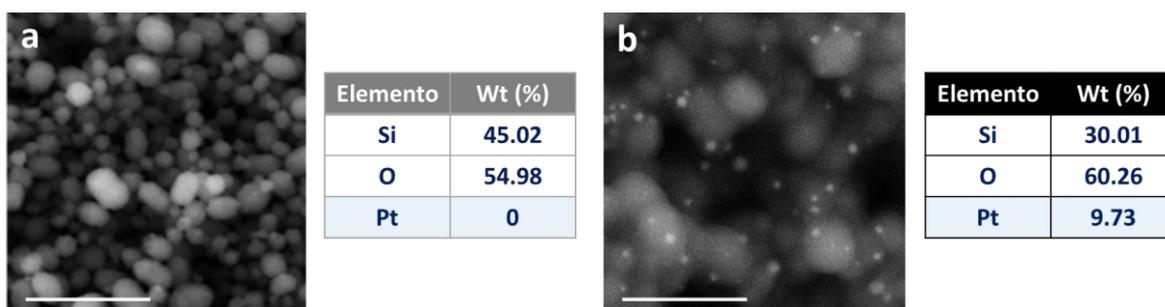


**Figura III.8. Técnica de emulsión de Pickering empleada para la síntesis de NM.**

En la **Figura III.9** se muestran imágenes de FE-SEM del proceso de síntesis de NM siguiendo el método de emulsión de Pickering. En concreto, se observan los coloidosomas (estructuras pseudo-esféricas de tamaño micrométrico) antes (**a**) y después (**b**) de la adsorción de las nanopartículas de Pt a la superficie disponible de las MSNs (previamente funcionalizada con MPTMS). También se realizó un análisis por EDX de los elementos químicos presentes en los coloidosomas (**Figura III.10**). En ambos casos se detectan átomos de O y Si, lo cual coincide con la composición esperada para las MSNs. Sin embargo, sólo en el coloidosoma de la imagen **b** se detectan átomos de Pt. Esto corrobora la correcta unión de las nanopartículas de Pt sobre las MSNs para formar sucesivamente los NMs, tal y como se observa en las imágenes.



**Figura III.9. Coloidosomas. a** Microgotas de parafina líquida estabilizada por la adsorción de MSN. **b** Modificación selectiva de la superficie expuesta de MSN con Pt para formar NM. Imágenes obtenidas por FE-SEM.



**Figura III.10. Elementos químicos presentes en los coloidosomas.** **a** Antes de la adsorción de las nanopartículas de Pt sobre las MSNs (barra de escala = 500 nm). **b** Después de la unión de las nanopartículas de Pt para formar NM (barra de escala = 200 nm). Imágenes obtenidas por FE-SEM y análisis atómico realizado por EDX (expresado en porcentaje en peso, wt %).

Adicionalmente, para explorar las habilidades de NM para transportar y liberar fármacos de manera específica, se optó por encapsular una molécula modelo (Ru) y por recubrir su superficie con una puerta molecular sensible a estímulos redox (-S-S-PEG). Ésta bloquea sus mesoporos impidiendo la pérdida prematura de la molécula encapsulada. Así, NM mantiene su carga retenida hasta el reconocimiento de un agente reductor (GSH). En ese momento, se produce el desplazamiento de la puerta molecular y la sucesiva liberación específica y localizada del compuesto transportado en el interior de sus mesoporos. En la **Figura III.11** se muestra la representación de las etapas de síntesis de  $NM_{Ru-PEG}$ :

- i. En primer lugar, se sintetizó la plataforma inorgánica NM mediante el método de emulsión de Pickering a partir de nanopartículas de Pt y MSNs (**Figuras III.4, III.5 y III.6**).
- ii. La cara de Pt se protegió con ácido 3-mercaptopropiónico para evitar la unión errónea de MPTMS.
- iii. Los mesoporos de la cara de MSN se cargaron con Ru.
- iv. La superficie externa de la cara de MSN se funcionalizó con MPTMS para la sucesiva unión de la puerta molecular.
- v. Se adicionó disulfuro de 4,4'-dipiridilo para preparar los grupos tioles para la posterior reacción de acoplamiento con la puerta molecular.
- vi. Finalmente, se añadió PEG-SH para formar el enlace disulfuro que constituye la puerta molecular sensible a estímulos redox.

Todas las nanopartículas empleadas en este capítulo se ilustran en la **Tabla III.2**.

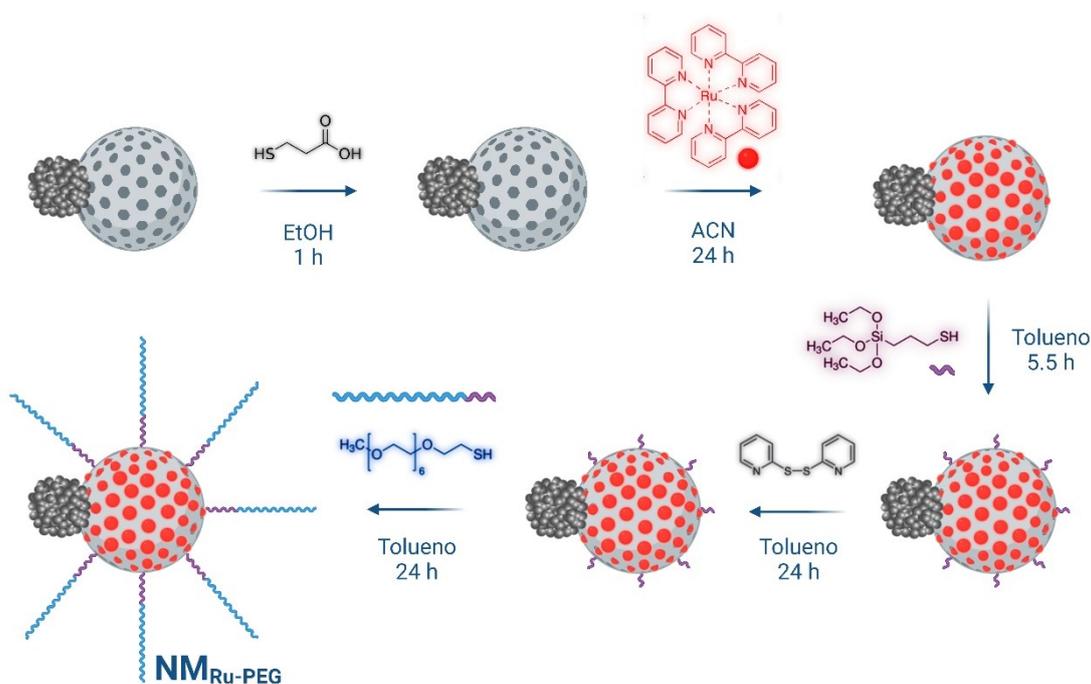


Figura III.11. Esquema del proceso de carga y anclaje de la puerta molecular en  $NM_{Ru-PEG}$ .

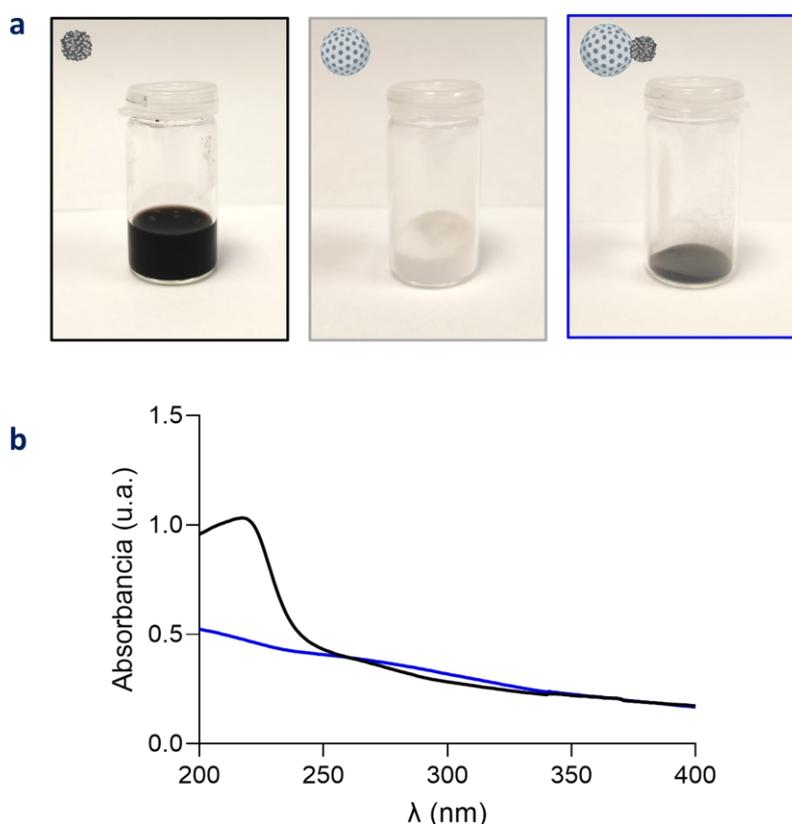
Tabla III.2. Resumen de las nanopartículas empleadas en el capítulo III.

NANOPARTÍCULA	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
	<b>Pt</b>	Nanopartícula coloidal de platino formada por nanodendritas.
	<b>MSN</b>	Nanopartícula mesoporosa de sílice.
	<b>NM</b>	Nanomotor Janus Pt-MSN formado por la conjunción anisotrópica de Pt y MSN. Muestra autopropulsión por la catálisis de $H_2O_2$ .
	<b><math>NM_{Ru}</math></b>	NM cargado con Ru y funcionalizado con MPTMS. Sin -S-S-PEG. Muestra liberación incontrolada de Ru.
	<b><math>NM_{Ru-PEG}</math></b>	<b>Nanomotor final:</b> NM cargado con Ru y funcionalizado con -S-S-PEG. Muestra autopropulsión por la catálisis de $H_2O_2$ y liberación controlada de Ru en presencia de GSH.

### III.6.2 Caracterización estructural del nanomotor

Una vez sintetizadas todas las nanopartículas, se procedió a corroborar su correcta estructura mediante los métodos habituales de caracterización de nanomateriales.

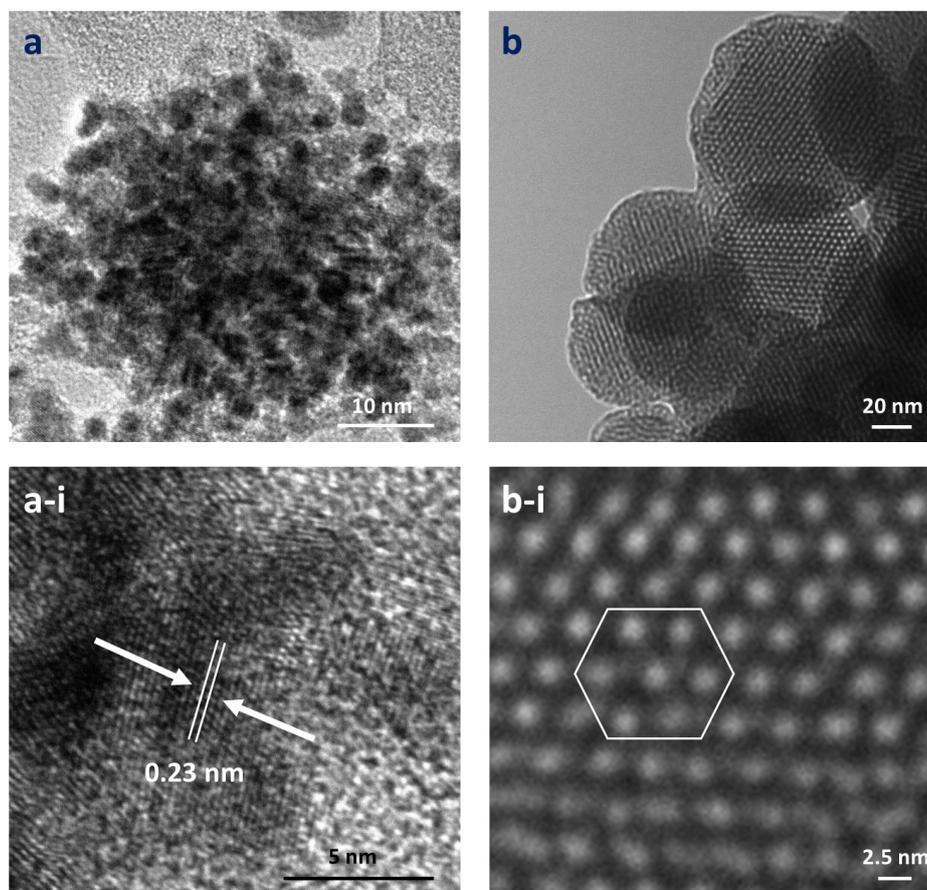
En primer lugar, en las fotografías de la **Figura III.12a** se puede apreciar el aspecto macroscópico de las nanopartículas iniciales y de los nanomotores finales: Pt, suspensión coloidal de color negro; MSN, polvo de color blanco; y NM, polvo de color negro. El proceso de síntesis de NM también se estudió por espectroscopía UV-vis, ya que las partículas metálicas nanométricas experimentan el fenómeno de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR). Como indica la **Figura III.12b**, las nanopartículas de Pt (**curva negra**) poseen una intensa banda de absorción en la zona ultravioleta del espectro electromagnético ( $\lambda_{\text{abs}} = \sim 200 \text{ nm}$ ).<sup>301</sup> Conforme aumenta el tamaño de las nanopartículas y cambia su morfología debido a la unión a MSNs para formar NM (**curva azul**), el índice de refracción local en la superficie del Pt cambia y la posición de la banda se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda mayores. Las MSNs no se analizaron por esta técnica ya que no absorben luz en este rango del espectro electromagnético.



**Figura III.12. a** Imágenes del aspecto macroscópico de las nanopartículas sintetizadas: Pt (negro), MSN (gris) y NM (azul). **b** Espectros de absorción UV-vis de Pt (negro) y NM (azul).

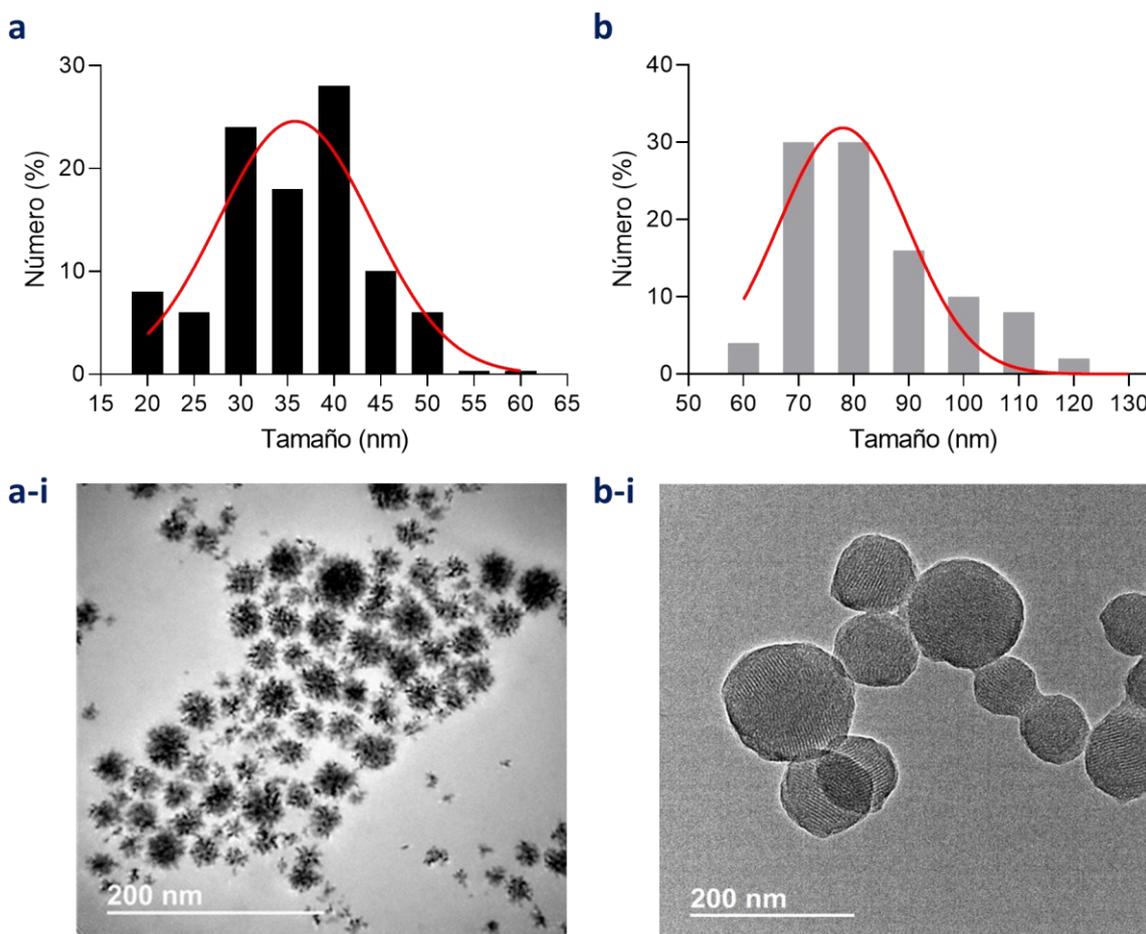
La estructura de las diferentes nanopartículas se evaluó por varias técnicas de microscopía. En la **Figura III.13** se muestran imágenes de HR-TEM de las nanopartículas de partida, Pt (**a**) y MSN (**b**). Como se puede observar, las nanopartículas de Pt presentan forma cuasi-esférica con una superficie rugosa e irregular. Esta morfología se consigue por la superposición y fusión de múltiples nanodendritas de Pt con un tamaño de aproximadamente 2.5 nm. Este análisis también reveló la presencia de caras cristalinas con un espacio interplanar medio de 2.3 Å para el plano (111) de los cristales de Pt con estructura cúbica centrada en caras (**a-i**). En las imágenes de las MSNs se observa su geometría esférica, así como sus canales y

mesoporos cilíndricos ordenados en disposición hexagonal (estructura de «*panal de abejas*»), con un tamaño de alrededor de 2 nm (**b-i**).



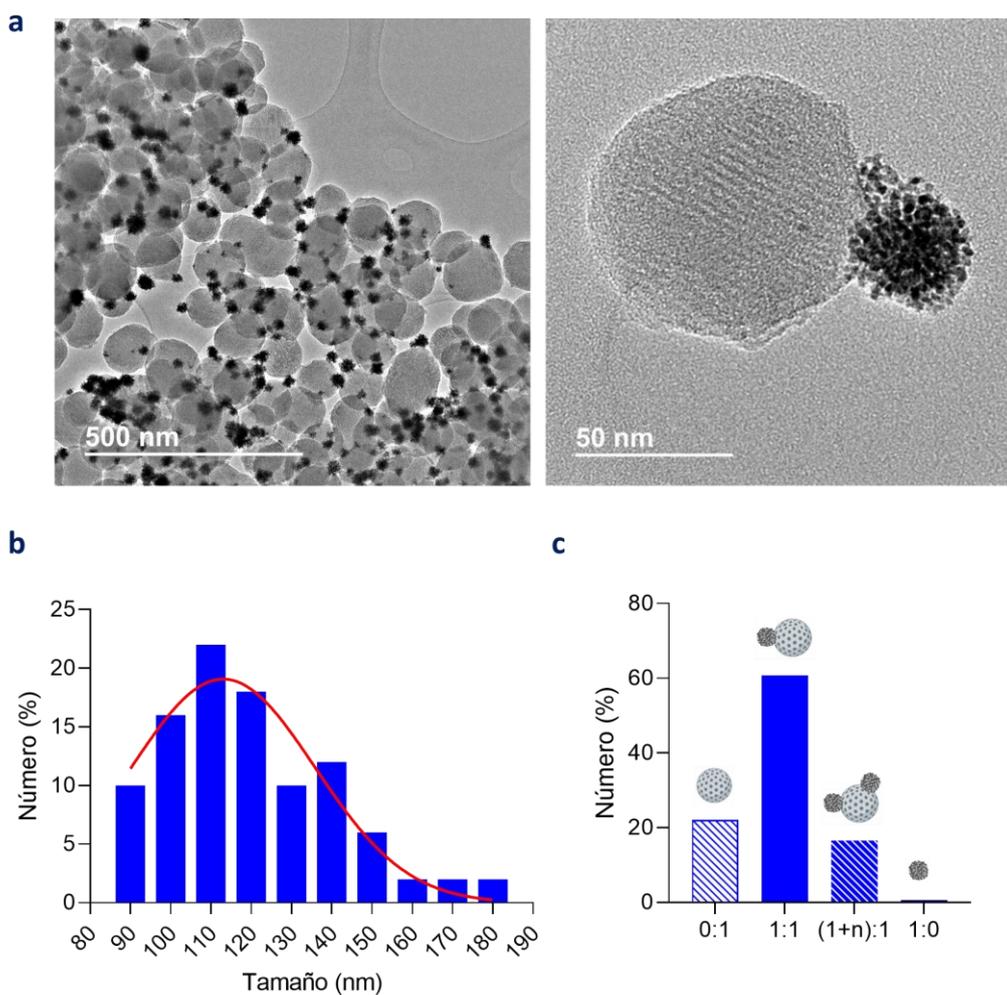
**Figura III.13. Imágenes de HR-TEM de las nanopartículas sintetizadas. a** Nanopartículas de Pt. **a-i** Imagen ampliada que muestra la distancia interplanar para el plano (111). **b** MSNs. **b-i** Imagen ampliada que muestra sus mesoporos cilíndricos en disposición hexagonal.

Para investigar la distribución de tamaño de las nanopartículas de partida (Pt y MSN), se cuantificaron las dimensiones de 50 de ellas (registrando varias imágenes de TEM). Como se indica en la **Figura III.14**, las nanopartículas de Pt presentan un tamaño medio de  $37 \pm 8$  nm (**a**) y las MSNs cuentan con un diámetro medio de  $92 \pm 16$  nm (**b**). En ambos casos, los tamaños siguen una distribución Gaussiana.



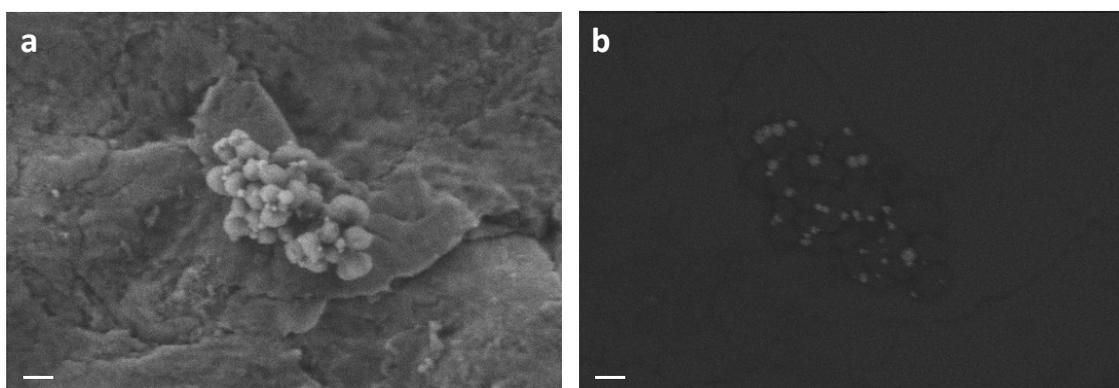
**Figura III.14. Distribución de tamaño de las nanopartículas sintetizadas. a** Nanopartículas de Pt (negro). **a-i** Imagen representativa. **b** MSNs (gris). **b-i** Imagen representativa.  $n = 50$ .

El nanomotor final NM también se sometió a análisis por HR-TEM. Como se aprecia en la **Figura III.15**, los nanodispositivos presentan morfología de «muñeco de nieve» con nanopartículas de Pt unidas a MSNs (**a**). Ambos integrantes de NM mantienen sus características estructurales inalteradas. La cara de Pt cuenta con múltiples nanodendritas agrupadas formando una estructura pseudo-esférica. La cara de MSN cuenta con forma esférica y con la mesoestructura característica de los nanomateriales tipo MCM-41, así como con la mayor parte de su superficie externa disponible. El tamaño medio de los nanodispositivos se cuantificó en  $124 \pm 20$  nm (**b**) (se analizó un total de 50 nanomotores). Además, se determinó la eficiencia de síntesis de NM (**c**) registrando varias imágenes de la muestra obtenida (el total de nanopartículas analizadas fue 160). El resultado revela que la mayoría de nanopartículas, 61 %, se obtiene en la proporción deseada, Pt:MSN (1:1). En cambio, las MSNs sin Pt (0:1) o las MSNs con varias nanopartículas de Pt unidas ((1+n):1) solo representan el 22 % y el 16 % del total, respectivamente. Estos resultados indican que el proceso de síntesis de NM por emulsión de Pickering no afecta a las propiedades de los nanomateriales iniciales y que el rendimiento de la reacción es relativamente elevado, por lo que esta técnica es adecuada para la fabricación de este tipo de nanodispositivos.



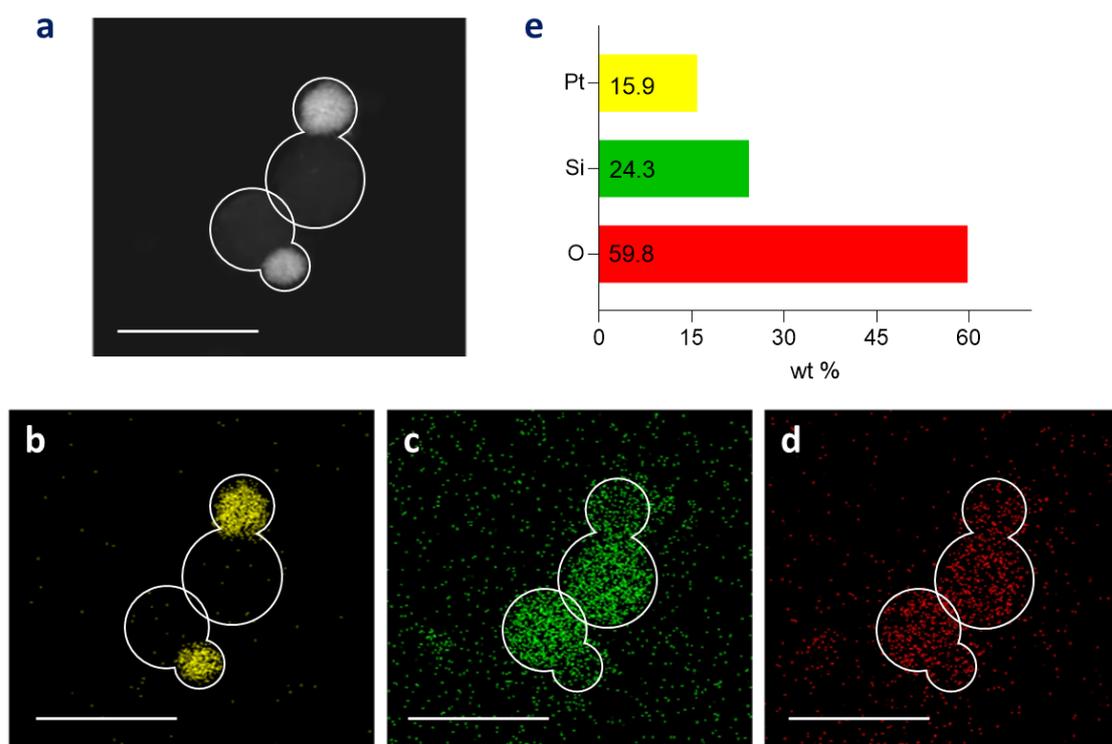
**Figura III.15. Análisis de NM por HR-TEM.** **a** Imágenes representativas. **b** Distribución de tamaño ( $n = 50$ ). **c** Eficacia del proceso de síntesis, cuantificando el número de nanomotores obtenidos con diferente relación Pt:MSN (0:1, 1:1, (1+n):1, y 1:0,  $n = 160$ ).

Adicionalmente, se obtuvieron imágenes de NM por FE-SEM. Así, la **Figura III.16** aporta un punto de vista alternativo de la estructura de los nanomotores. Se puede apreciar la morfología superficial de NM (unión de 2 esferas), así como la de sus componentes, Pt (esfera de menor tamaño) y MSN (esfera de mayor tamaño).



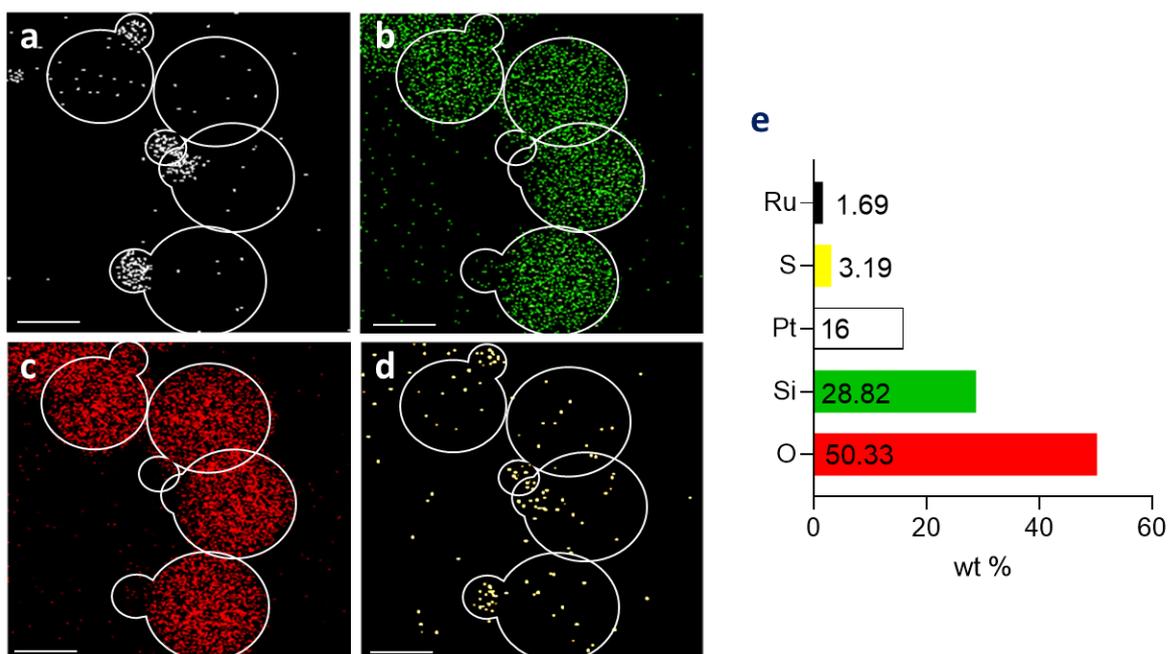
**Figura III.16. Análisis de NM por FE-SEM.** **a** Imagen obtenida mediante la detección de los electrones secundarios (SE2). **b** Imagen obtenida mediante la detección de los electrones retrodispersados (SEB). Barra de escala = 100 nm.

Para completar la caracterización de los nanomotores mediante técnicas de microscopía, se analizó la composición atómica de NM y  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$  por STEM-EDX. En la **Figura III.17** se muestra un mapa de los elementos químicos que conforman NM: Pt (**b**, amarillo), Si (**c**, verde) y O (**d**, rojo). Como se puede observar, su localización concuerda con lo esperado, los átomos de Pt se sitúan predominantemente en una de las caras de NM y los átomos de Si y O se sitúan distribuidos homogéneamente en la cara opuesta. Asimismo, se muestra la cuantificación del porcentaje en peso (wt %) que representa cada uno de los átomos: Pt, 15.9 %; Si, 24.3 %; y O, 59.8 % (**e**). La cantidad de Pt en NM también fue estudiada por ICP-MS. El dato obtenido, 20 wt %, se aproxima al aportado por la técnica EDX. Las pequeñas discrepancias pueden deberse a la diferente sensibilidad de cada una de las técnicas.



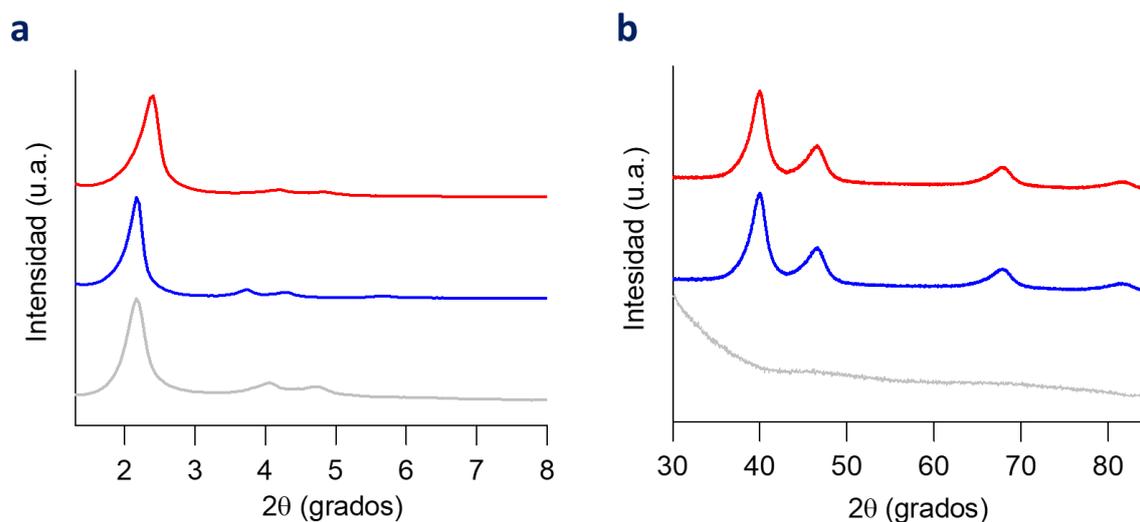
**Figura III.17. Análisis de NM por STEM-EDX. a** Imagen de NM (barra de escala = 250 nm). **b-d** Mapa elemental de los átomos de Pt (**b**, amarillo), Si (**c**, verde) y O (**d**, rojo). **e** Composición en wt %.

En la **Figura III.18** se representa el análisis por STEM-EDX de  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$ . En este caso, además de detectarse los átomos que componen la plataforma NM, Pt (**a**, blanco), Si (**b**, verde) y O (**c**, rojo), también se detectó la presencia de átomos de S en toda la superficie de NM (**d**, amarillo). Éstos se atribuyen a las cadenas disulfuro de la puerta molecular y a la funcionalización de la superficie de la cara de Pt con ácido 3-mercaptopropiónico. También se encontraron átomos de Ru, atribuidos a la molécula modelo cargada en los canales de la cara de MSN. Sin embargo, al estar encapsulado, este átomo no se pudo detectar en el análisis por mapeo, pero sí mediante análisis puntual en la superficie de la MSN. El wt % de S y Ru se cuantificó en un 3.19 % y un 1.69 % del total, respectivamente (**e**).



**Figura III.18. Análisis de  $NM_{Ru-PEG}$  por STEM-EDX. a-d** Distribución atómica de Pt (a, blanco), Si (b, verde), O (c, rojo) y S (d, amarillo). Barra de escala = 50 nm. **e** Composición en wt %.

Otra de las técnicas por la que se analizó la estructura de las nanopartículas fue la PXRD. La **Figura III.19** muestra los difractogramas de MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$  a ángulos bajos ( $1.5^\circ < 2\theta < 7^\circ$ ) (a) y altos ( $35^\circ < 2\theta < 80^\circ$ ) (b). En cuanto a MSN (**curva gris**), podemos observar que presenta los picos de Bragg típicos de los materiales mesoporosos con estructura tipo MCM-41. Entre ellos, destaca por su intensidad un pico principal en torno a  $2.4^\circ$ , indexado como el plano cristalográfico (100) de reflexión de Bragg, que permite confirmar el éxito en la síntesis del nanomaterial. Además, en el difractograma también aparecen picos a  $4.1^\circ$  y  $4.7^\circ$ , correspondientes a los planos (110) y (200). En cuanto a NM (**curva azul**), podemos observar que mantiene el pico de difracción a  $2.4^\circ$  aproximadamente, lo que revela que la red mesoporosa de la MSN no se vio alterada a lo largo del proceso de síntesis del nanomotor. Además, su difractograma a ángulos altos confirma la presencia de Pt al presentar 4 picos de difracción característicos a  $2\theta = 40, 46, 68$  y  $82^\circ$ , indexados como los planos (111), (200), (220) y (311). Por último, el espectro de  $NM_{Ru-PEG}$  (**curva roja**) contiene todos los picos de Bragg mencionados, lo cual revela que el proceso de carga y funcionalización no afecta a la estructura de NM. En conclusión, los datos de PXRD confirman la estructura observada por HR-TEM.

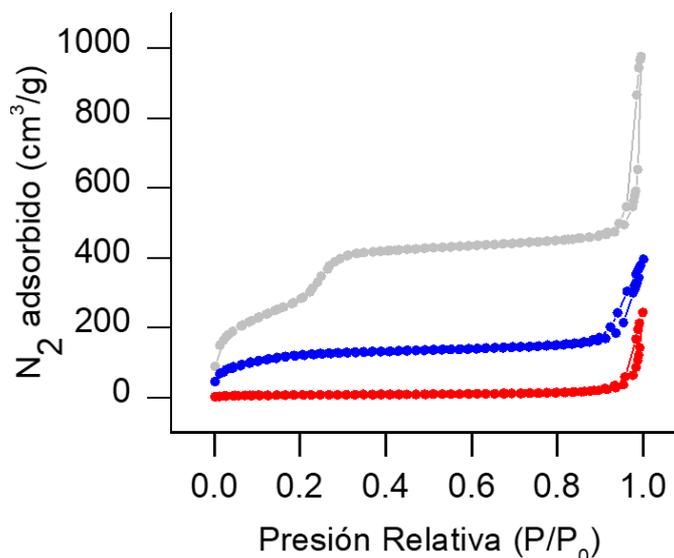


**Figura III.19. Difractogramas de PXRD de MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$ .** **a** Ángulos bajos. **b** Ángulos altos. MSN: gris, NM: azul y  $NM_{Ru-PEG}$ : rojo.

La estructura porosa de las nanopartículas fue estudiada mediante porosimetría. La **Figura III.20** muestra las isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  de MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$ . Al carecer de porosidad, las nanopartículas de Pt no fueron analizadas por esta técnica. MSN (**curva gris**) presenta una isoterma tipo IV con 2 etapas principales de adsorción. El primer paso, que se encuentra a valores de  $P/P_0$  entre 0.2 y 0.4, se debe a la condensación del  $N_2$  por capilaridad en el interior de los mesoporos y revela la presencia de poros vacíos en la MSN. Además, la ausencia de bucle de histéresis en ese intervalo sugiere que son altamente uniformes. El segundo paso, que se encuentra a valores de  $P/P_0$  en torno a 0.9, muestra un típico bucle de histéresis H1 y se atribuye a porosidad textural que se corresponde con el espacio entre nanopartículas. NM (**curva azul**) mantiene ambas etapas de adsorción, aunque la etapa de adsorción a presión intermedia ( $0.2 < P/P_0 < 0.4$ ) es menos pronunciada. Esto indica que NM mantiene la mesoestructura de MSN, pero la adsorción de nitrógeno es menor debido a la presencia de las nanopartículas de Pt no porosas. Por el contrario, la isoterma de  $NM_{Ru-PEG}$  (**curva roja**) carece del proceso agudo de adsorción a presión intermedia ( $0.2 < P/P_0 < 0.4$ ), mostrando una importante reducción en el volumen de gas adsorbido. Este resultado confirma que los procesos de carga de los poros con Ru y recubrimiento superficial con -S-S-PEG han tenido éxito.

Mediante la aplicación de los modelos BJH y BET a las isothermas obtenidas se puede extraer información más detallada sobre las dimensiones de los poros y la superficie específica de los nanodispositivos, respectivamente. Por un lado, el modelo BJH se aplica a la rama de adsorción de la isoterma para  $P/P_0 < 0.4$  y aporta información sobre el diámetro y el volumen de los mesoporos generados por el tensioactivo. En cuanto al diámetro, tanto los poros de MSN como los poros de NM miden aproximadamente 2 nm, lo cual vuelve a demostrar que el proceso de síntesis de NM no perjudica a la mesoestructura de la cara de MSN. En cambio, atendiendo al volumen total de poro, sí se observa una importante reducción desde MSN,  $0.96 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , hasta NM,  $0.38 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . En  $NM_{Ru-PEG}$  ambos parámetros tienen un valor prácticamente de 0. Estos resultados, confirman de nuevo la unión de nanopartículas de Pt sobre las MSNs y la satisfactoria encapsulación de la carga en NM. Por otro lado, los valores BET indican una considerable disminución en el área superficial desde MSN, que presenta un valor de  $1068 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , hasta NM,

que presenta un valor de  $435 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Del mismo modo, en  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$  el valor desciende hasta  $25 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Esta reducción en la superficie específica se debe a la sucesiva fijación de las nanopartículas de Pt, el cargado con Ru y la unión de la puerta molecular, apoyando una vez más el éxito en la síntesis. Todos los datos se resumen en la **Tabla III.3**.

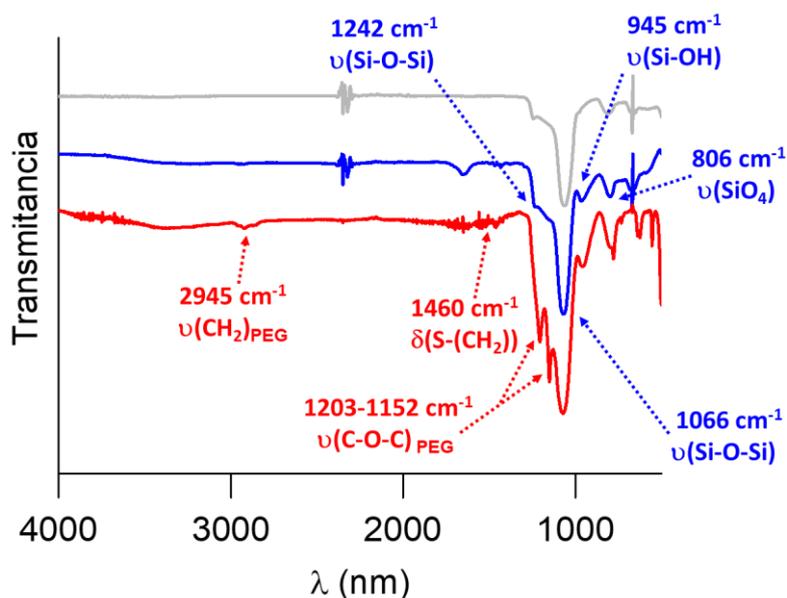


**Figura III.20. Análisis de MSN, NM y  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$  mediante porosimetría.** Isotermas de adsorción-desorción de  $\text{N}_2$ . MSN: gris, NM: azul y  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$ : rojo.

**Tabla III.3. Diámetro de poro, volumen de poro y superficie específica de MSN, NM y  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$ .** Calculados aplicando los modelos BJH y BET a las isotermas de adsorción-desorción de  $\text{N}_2$ .

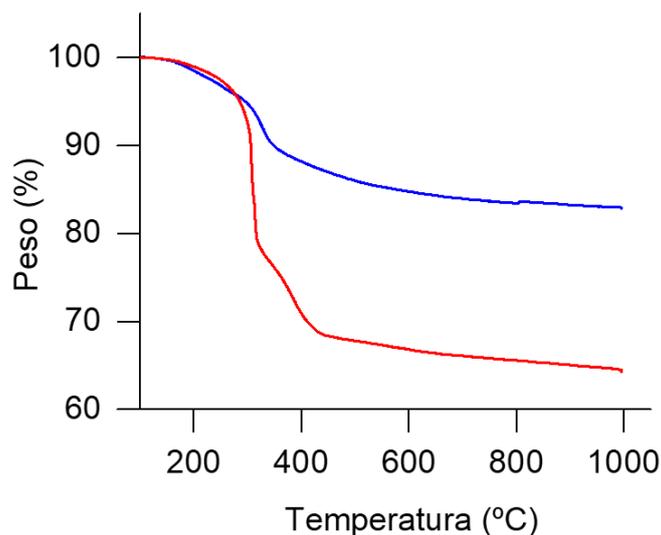
NANOPARTÍCULA	DIÁMETRO PORO (BJH, nm)	VOLUMEN PORO (BJH, $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )	SUPERFICIE ESPECÍFICA ( $S_g$ ) (BET, $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )
MSN	1.96	0.96	1068
NM	1.97	0.38	435
$\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$	-	-	25

La correcta funcionalización de NM con la puerta molecular también se demostró por espectroscopía FTIR. Como se observa en la **Figura III.21**, todas las nanopartículas analizadas (MSN, **curva gris**; NM, **curva azul** y  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$ , **curva roja**) presentan las bandas típicas de los nanomateriales silíceos: una banda a  $806 \text{ cm}^{-1}$ , atribuida a los tetraedros de  $\text{SiO}_4$ ; una banda a  $945 \text{ cm}^{-1}$ , atribuida a los grupos Si-OH; y una banda a  $1066 \text{ cm}^{-1}$  con un hombro a  $1242 \text{ cm}^{-1}$ , atribuida a las vibraciones de los enlaces Si-O-Si. El espectro de  $\text{NM}_{\text{Ru-PEG}}$  también presenta bandas a:  $2945 \text{ cm}^{-1}$ , que se corresponden con los enlaces  $\text{CH}_2$  del PEG que constituye la puerta molecular;  $1460 \text{ cm}^{-1}$ , que se corresponde al estiramiento del enlace S- $\text{CH}_2$  que une el PEG a la superficie de la MSN; y bandas a  $1203\text{-}1152 \text{ cm}^{-1}$ , atribuidas a los enlaces C-O-C del polímero.



**Figura III.21.** Espectros FTIR de MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$ . MSN: gris, NM: azul y  $NM_{Ru-PEG}$ : rojo.

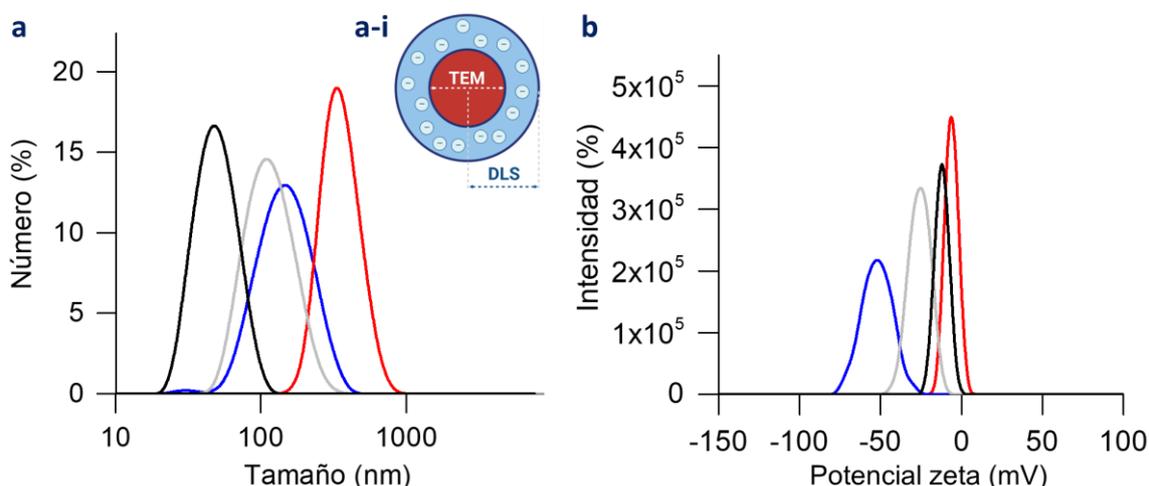
A pesar de que las isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$  y los espectros FTIR aportan información cualitativa sobre la unión de la puerta molecular, no ofrecen datos cuantitativos de la cantidad de materia orgánica presente en  $NM_{Ru-PEG}$ . Para obtenerla, los nanomotores fueron analizados por TGA. La gráfica de la **Figura III.22** evidencia la pérdida de materia orgánica en NM (**curva azul**) y  $NM_{Ru-PEG}$  (**curva roja**). El primer descenso, por encima de 245 °C, se atribuye a la descomposición térmica de -S-S-PEG, mientras que el segundo, a 320 °C aproximadamente, se corresponde con el Ru cargado. El porcentaje de materia orgánica en  $NM_{Ru-PEG}$  se calculó en 142.2  $\mu\text{g}$  por mg de sólido, de los cuales 73.7  $\mu\text{g}$  pertenecen a la puerta molecular.



**Figura III.22.** Análisis por TGA de NM y  $NM_{Ru-PEG}$ . NM: azul y  $NM_{Ru-PEG}$ : rojo.

Por último, el ensamblaje del nanomotor final también se investigó por DLS. Mediante esta técnica pudimos monitorizar los cambios de tamaño y de carga superficial durante el procedimiento sintético. La **Figura III.23a** muestra los diámetros hidrodinámicos de Pt (**curva negra**), MSN (**curva gris**), NM (**curva azul**) y  $NM_{Ru-PEG}$  (**curva roja**). Éstos aumentaron desde

51 nm en Pt y 107 nm en MSN, hasta 145 nm en NM y 335 nm en  $NM_{Ru-PEG}$ . Las discrepancias al alza con las medidas de HR-TEM se deben a que en este caso estamos observando el diámetro hidrodinámico, el cual se define como el diámetro de una partícula esférica hipotética que difunde del mismo modo que la partícula que se está midiendo.<sup>302</sup> Como las medidas se realizan en suspensión, las partículas se recubren de una capa de hidratación formada por moléculas del disolvente (en este caso agua) o iones, incrementando el tamaño aparente (**a-i**). Asimismo, los valores de potencial zeta, representados en la **Figura III.23b** con el mismo código de color, se incrementan desde valores más negativos en NM, -28.5 mV, por la presencia de grupos silanol hasta valores menos negativos en  $NM_{Ru-PEG}$ , -6.3 mV, por el enmascaramiento de los grupos silanol libres con el polímero. Todos los valores medios obtenidos se recogen en la **Tabla III.4**. En conjunto, el aumento secuencial de tamaño y carga superficial demuestra el correcto ensamblaje de Pt y MSN en NM, y la posterior unión de la puerta molecular para dar lugar al nanodispositivo final.



**Figura III.23. Análisis por DLS de Pt, MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$ .** **a** Diámetro hidrodinámico (nm). **a-i** Esquema que ejemplifica las diferencias entre el diámetro hidrodinámico obtenido por DLS y el diámetro medido por TEM. **b** Potencial zeta (mV). Pt: negro, MSN: gris, NM: azul y  $NM_{Ru-PEG}$ : rojo.

**Tabla III.4. Diámetro hidrodinámico y potencial zeta de Pt, MSN, NM y  $NM_{Ru-PEG}$ .**

NANOPARTÍCULA	DIÁMETRO HIDRODINÁMICO (nm)	POTENCIAL ZETA (mV)
Pt	51	- 12.2
MSN	107	- 24.5
NM	145	- 28.5
$NM_{Ru-PEG}$	335	- 6.3

La visión global aportada por las técnicas de caracterización estructural empleadas indica que: (i) las nanopartículas de partida, Pt y MSN, fueron sintetizadas correctamente; (ii) la plataforma inorgánica NM adquirió la nanoarquitectura deseada sin que los elementos que la conforman perdieran sus propiedades individuales; y (iii) los procesos de cargado de los poros y enlace de la puerta molecular a la superficie de NM se llevaron a cabo con éxito sin dañar la estructura del nanomotor.

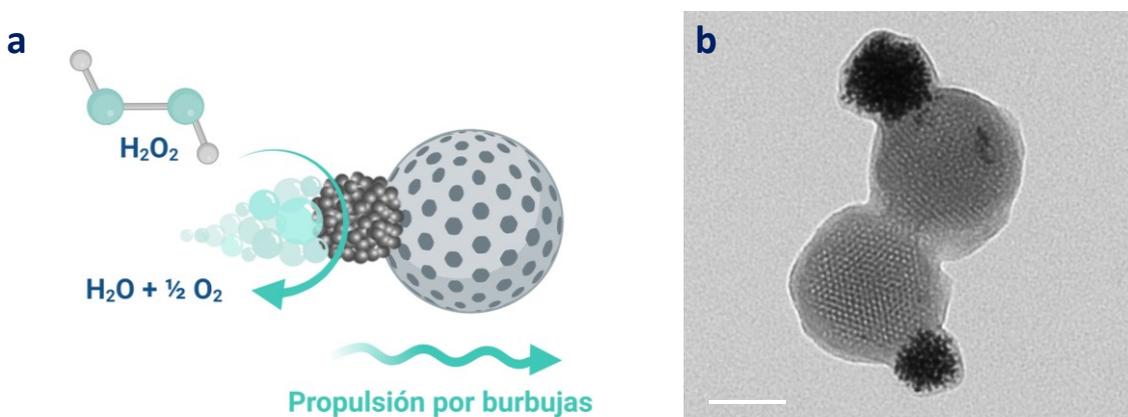
### III.6.3 Caracterización funcional del nanomotor

Una vez demostrada la correcta nanoarquitectura y funcionalización de los nanomotores, se procedió a investigar si eran capaces de exhibir las habilidades deseadas: autopropulsión y liberación controlada de la carga.

#### III.6.3.1 El nanomotor se autopropulsa en respuesta a la catálisis de $\text{H}_2\text{O}_2$

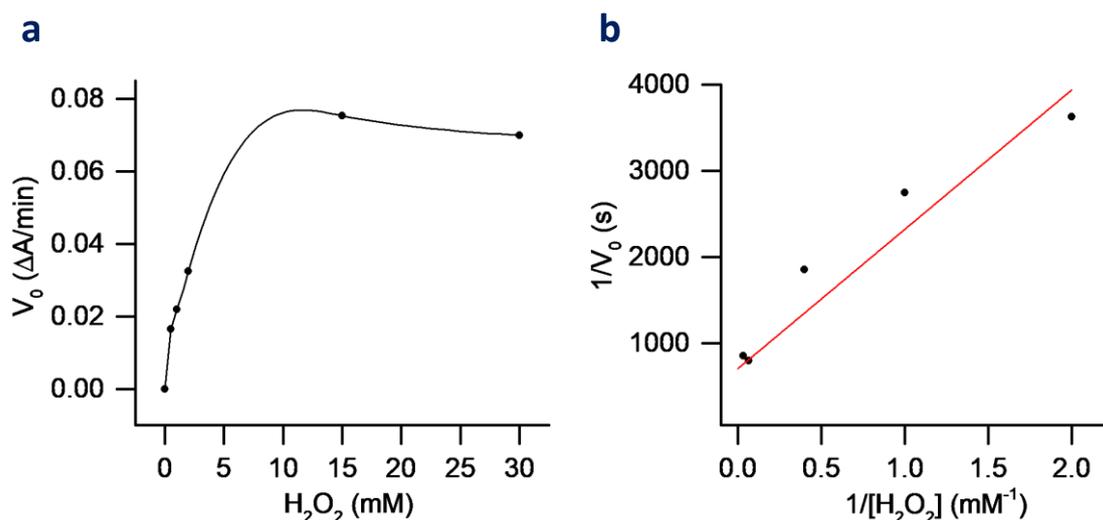
El objetivo principal de esta tesis doctoral es desarrollar nanopartículas con capacidades avanzadas, entre las que destacan la autopropulsión y la liberación controlada de fármacos. Por tanto, demostrar el movimiento de NM es clave. En la **Figura III.24a** se ilustra el mecanismo de propulsión propuesto. La adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  desencadena su descomposición catalítica por la cara de Pt en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  (g). A continuación, se produce la nucleación del gas en forma de burbujas en la superficie del Pt. Cuando éstas se desprenden al medio provocan una fuerza de retroceso que impulsa a NM en dirección inversa al catalizador (cara de Pt, siguiendo la flecha azul), incrementando su difusión en el medio en el que está inmerso.

Para caracterizar este proceso se siguieron varios procedimientos. Las particularidades experimentales se pormenorizan en la **Sección III.5.4**. Para empezar, se procedió a evaluar si el combustible elegido dañaba la estructura de NM. En la **Figura III.24b** se muestra una imagen de TEM de los nanodispositivos en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aparentemente no se aprecian cambios en el tamaño o la morfología de NM tras su exposición a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante un largo periodo de tiempo.



**Figura III.24.** a Mecanismo de propulsión de NM. b Imagen TEM de NM incubado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % (v/v) durante 24 h. Barra de escala = 40 nm.

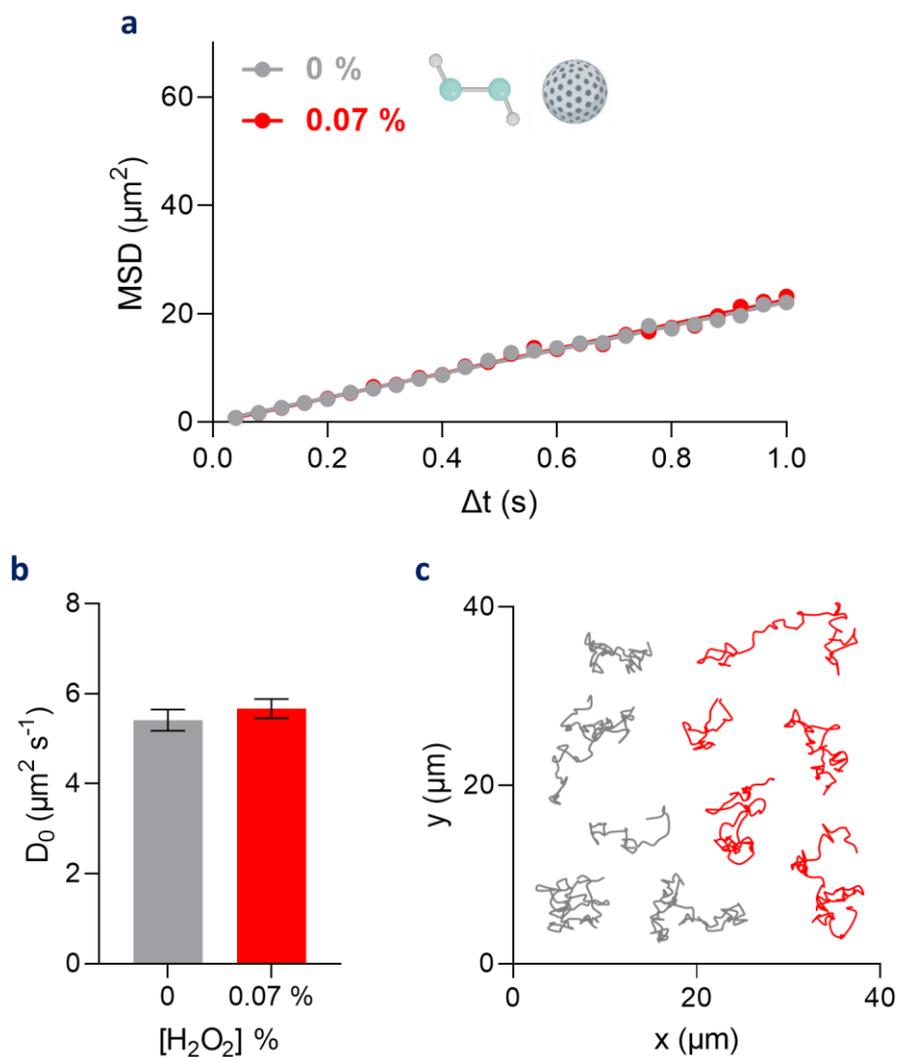
A continuación, se evaluó la actividad catalítica de NM mediante un ensayo de actividad peroxidasa (**Sección III.5.4.1**). Como se puede observar en las gráficas de velocidad de reacción, **Figura III.25a**, pese su composición inorgánica, NM posee actividad peroxidasa intrínseca con una cinética «enzimática» tipo Michaelis-Menten. Además, a partir del gráfico de Lineweaver-Burk para concentraciones variables de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figura III.25b**, **Ecuación III.12**), se estimaron sus parámetros cinéticos. NM presenta una  $V_{\max}$  de  $0.32 \mu\text{M min}^{-1}$  y una  $K_M$  de 2.3 mM, un valor comparable al de la peroxidasa de rábano nativa (4.37 mM).



**Figura III.25. Actividad peroxidasa de NM.** **a** Velocidad de reacción. Efecto de variar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $[\text{ABTS}] = 9 \text{ mM}$ ). **b** Gráfico de Lineweaver-Burk para la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleado para determinar la  $K_M$  y  $V_{\text{max}}$  de NM aplicando la **Ecuación III.12**.

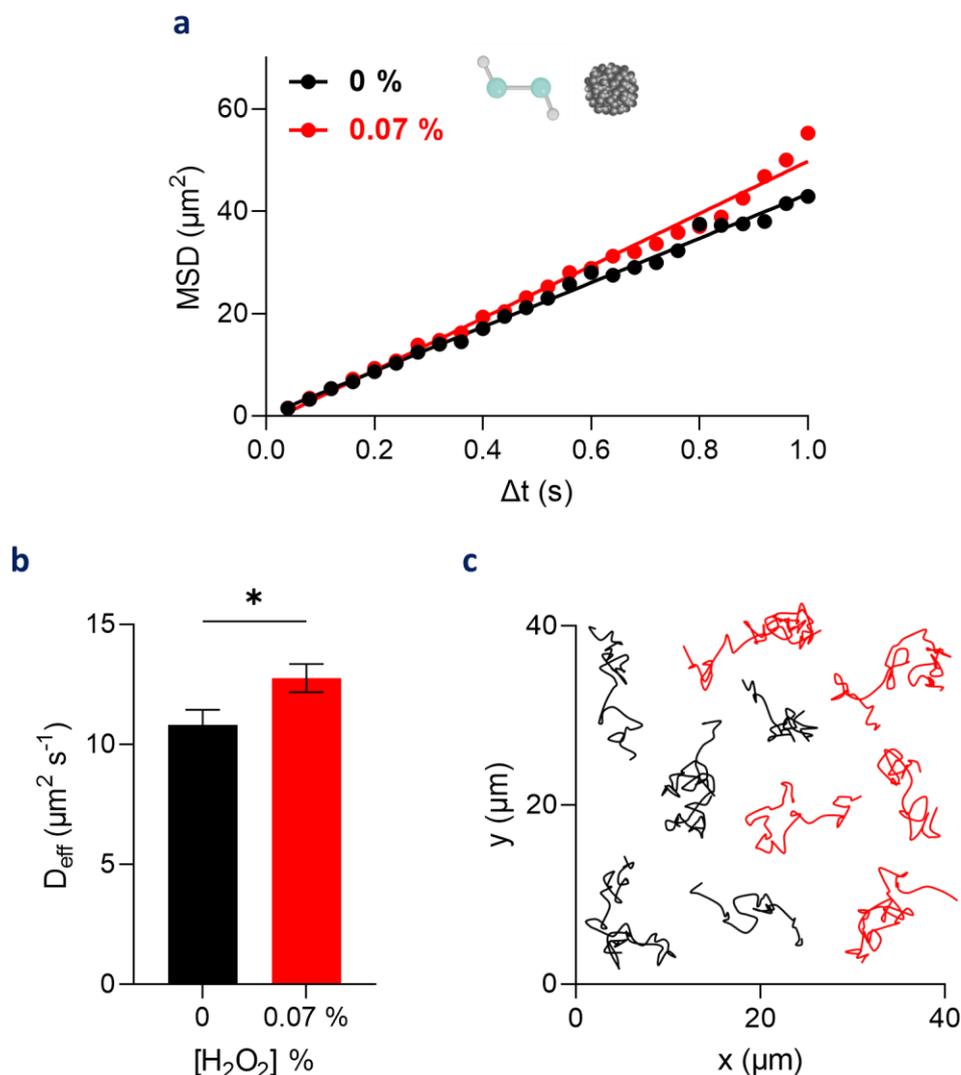
Tras demostrar experimentalmente la habilidad de NM para catalizar la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se pasó a investigar su autopropulsión en respuesta a este fenómeno. Para ello, se emplearon dos técnicas: análisis NTA (**Sección III.5.4.2**) y DLS (**Sección III.5.4.3**). Por un lado, a partir de los datos registrados por el equipo Nanosight NS300, el software NTA analiza la posición espacial de las nanopartículas de forma individual a lo largo del tiempo. Esto permite reconstruir sus trayectorias y extraer los parámetros que definen el movimiento en la nanoescala (MSD y  $D_0$  o  $D_{\text{eff}}$  en el régimen difusivo) mediante la aplicación de las **Ecuaciones III.2** y **III.5**, respectivamente.

En primer lugar, se analizaron las nanopartículas de partida, Pt y MSN. Por su naturaleza esférica e inerte, no se esperaba que las MSNs mostraran autopropulsión, pues, como se ha explicado previamente, la asimetría y la actividad catalítica son clave para que el proceso pueda darse. Los resultados, resumidos en la **Figura III.26**, confirman lo esperado. El  $D_0$  de las nanopartículas, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.07 %, se mantiene en valores cercanos a  $5.5 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ .



**Figura III.26. Análisis de la difusión de MSN por NTA. a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$ , calculado mediante la **Ecuación III.5**. **c** Trayectorias de 5 nanopartículas representativas. [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 0, gris y 0.07 % (v/v), rojo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanopartículas con dimensiones comprendidas entre 50 y 150 nm.

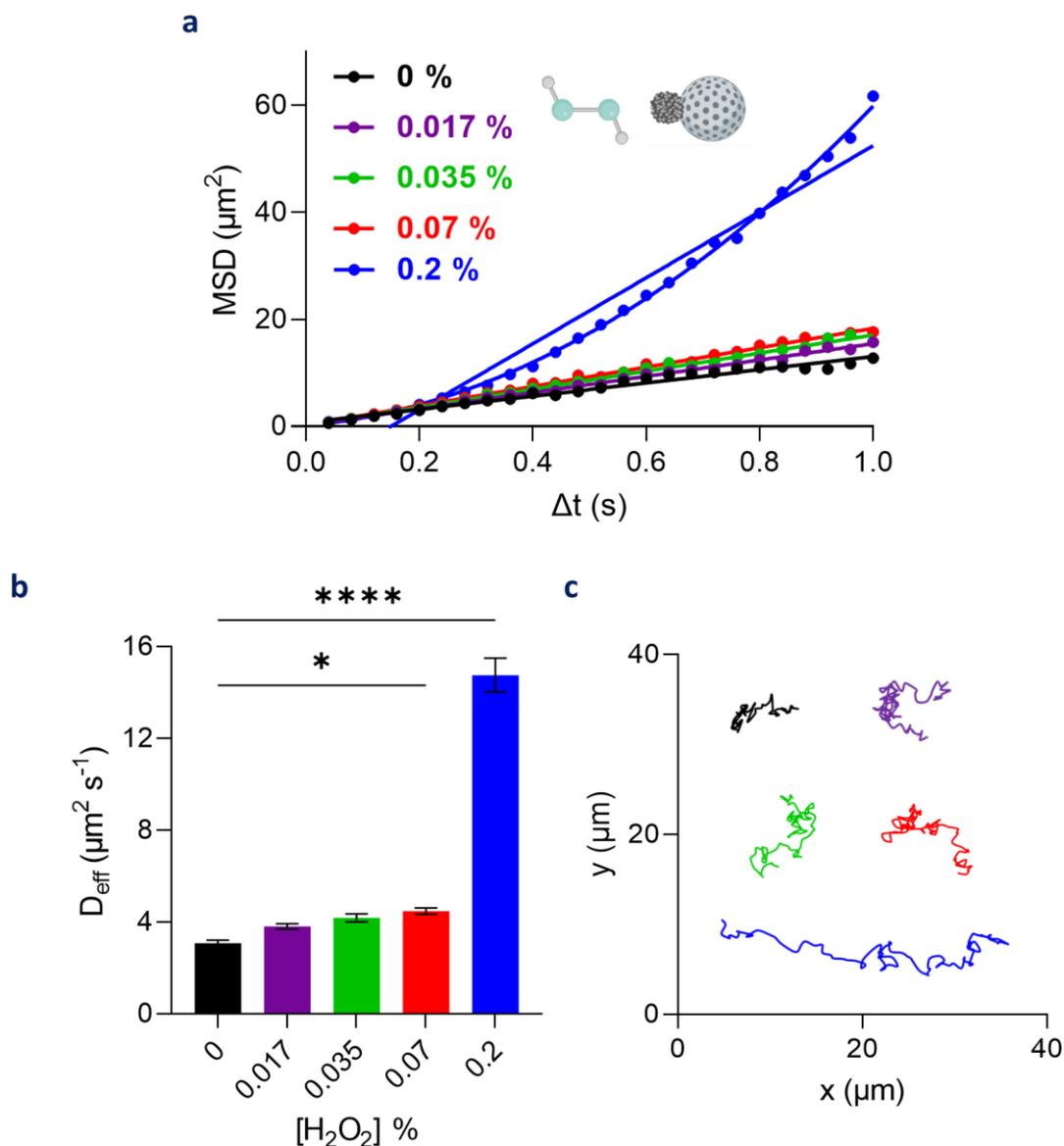
En cambio, el análisis por NTA de las nanopartículas de Pt, que se ilustra en la **Figura III.27**, sí revela un aumento en su difusión tras la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $D_0$  pasa de  $10.8 \pm 0.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  en PBS a  $12.7 \pm 0.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.07 %. Esta difusividad incrementada se correlaciona con su capacidad para descomponer  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El hecho de que, incluso en ausencia de combustible, el  $D_0$  de Pt sea mayor al de MSN se debe a su menor tamaño ya que, como indica la **Ecuación I.2**, el radio y la difusión de las nanopartículas están inversamente relacionados.



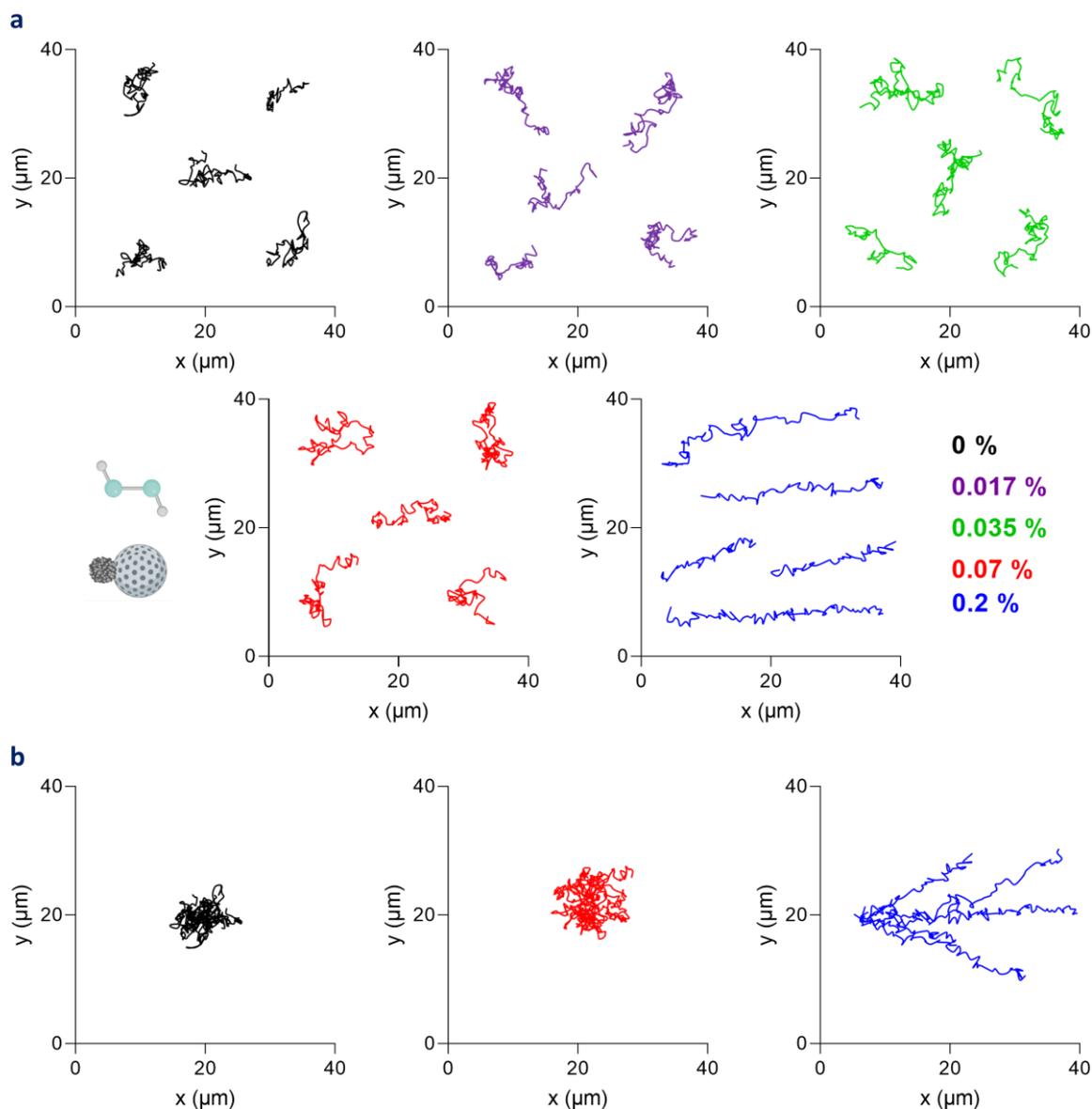
**Figura III.27. Análisis de la difusión de las nanopartículas de Pt por NTA. a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$ , calculados mediante la **Ecuación III.5**. **c** Trayectorias seguidas por 5 nanodispositivos representativos. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0, negro y 0.07 % (v/v), rojo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanopartículas con un tamaño comprendido entre 25 y 75 nm. \*  $p < 0.05$ .

Seguidamente, se analizó la difusión de NM mediante esta técnica. En este caso, los resultados, presentados en la **Figura III.28**, sugieren que el nanomotor desarrollado muestra autopropulsión autónoma en respuesta a la descomposición catalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En las gráficas se puede observar que el MSD (**Ecuación III.2**) mantiene una relación lineal con  $\Delta t$  y que la pendiente de la recta se incrementa conforme aumenta la concentración de combustible adicionada (de 0 a 0.2 %) (**a**). La aplicación de la **Ecuación III.5** a esos datos, permite obtener el  $D_0$  y el  $D_{\text{eff}}$  de los nanomotores (**b**). NM en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra un  $D_0$  de  $3.1 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , el cual es similar al valor teórico ( $3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) predicho por la ecuación de Stokes-Einstein (**Ecuación I.2**) para nanopartículas del mismo tamaño (145 nm). Por el contrario, NM en presencia de bajas cantidades de combustible muestra una difusión mayor. El  $D_{\text{eff}}$  aumenta desde  $3.8 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 0.017 % hasta  $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 0.07 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, cuando la concentración de combustible asciende a 0.2 %, el  $D_{\text{eff}}$  se incrementa hasta  $14.8 \pm 0.8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , un valor muy elevado para este tipo de nanosistemas. En este caso, MSD frente a  $\Delta t$  no se ajusta

linealmente a la perfección, sino que presenta una tendencia parabólica. Este hecho puede deberse a que la generación de una elevada cantidad de burbujas lleva al establecimiento de un flujo que propulsa a las nanopartículas de forma cooperativa en una misma dirección. Este comportamiento de enjambre ya ha sido descrito para otros nanomotores.<sup>234</sup> Las trayectorias seguidas por los NMs activados en comparación los recorridos exhibidos por los NMs sin combustible también apoyan la tendencia difusiva observada (c y Figura III.29). En conjunto, estos datos revelan que NM exhibe un comportamiento difusivo mejorado dependiente de la concentración de combustible.



**Figura III.28. Análisis del movimiento de NM por NTA. a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$ , calculados a partir de la Ecuación III.5. **c** Comparación de las trayectorias a todas las concentraciones de combustible testadas.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0$ , negro; 0.017, morado; 0.035, verde; 0.07, rojo; 0.2 % (v/v), azul. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanomotores con un tamaño comprendido entre 100 y 200 nm. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figura III.29. Trayectorias seguidas por NM.** **a** En presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0, negro; 0.017, morado; 0.035, verde; 0.07, rojo; 0.2 % (v/v), azul. **b** Comparación del alcance de las trayectorias a 0, 0.07 y 0.2 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. n = 5 nanomotores representativos.

A modo de resumen, los valores de difusión obtenidos para todos los nanodispositivos sintetizados en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.07 % (una concentración a la que NM exhibe una autopropulsión significativa) se recogen en la **Tabla III.5**. Como se puede observar, al entrar en contacto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la difusión de las nanopartículas pasivas (MSN) no se incrementa, mientras que la difusión de las nanopartículas activas (Pt y NM) aumenta significativamente (incremento de ~ 2 unidades para Pt y de ~ 1.5 unidades para NM). Estos resultados confirman la necesidad de que las nanopartículas presenten actividad catalítica y nanoarquitectura asimétrica para que la acumulación desigual de los productos de reacción de lugar a su desplazamiento.

Los parámetros que definen el movimiento de NM se resumen en la **Tabla III.6** ( $\tau_r = 2.33$  ms, **Ecuación III.3**).

Tabla III.5. Resumen de los coeficientes de difusión de Pt, MSN y NM en ausencia y presencia de combustible. Calculados a partir del análisis NTA.

NANOPARTÍCULA	$D_0$ EN AUSENCIA DE $H_2O_2$ ( $\mu m^2 s^{-1}$ )	$D_0/D_{eff}$ EN PRESENCIA DE $H_2O_2$ 0.07 % (v/v) ( $\mu m^2 s^{-1}$ )
Pt	$10.8 \pm 0.6$	$12.8 \pm 0.6$
MSN	$5.4 \pm 0.2$	$5.7 \pm 0.2$
NM	$3.1 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.1$

Tabla III.6. Resumen de los parámetros que definen el movimiento de NM. Calculados a partir del análisis NTA.

$[H_2O_2]$ % (v/v)	$D_0$ y $D_{eff}$ ( $\mu m^2 s^{-1}$ )
0	$3.1 \pm 0.1$
0.017	$3.8 \pm 0.1$
0.035	$4.2 \pm 0.2$
0.07	$4.5 \pm 0.1$
0.2	$14.8 \pm 0.8$

Por otro lado, el análisis por DLS apoya los resultados obtenidos mediante NTA al aportar información sobre el diámetro hidrodinámico de los nanodispositivos. Como muestra el diagrama de la **Figura III.30**, se produce una reducción en las dimensiones de NM (**a**, **curva azul**) a consecuencia de la adición de  $H_2O_2$  (0.07 %) al medio (**a**, **curva azul turquesa**). Teniendo en cuenta la relación de Stokes-Einstein (**Ecuación I.2**), esta disminución se correlaciona con un aumento en el  $D$ , confirmando, por tanto, la autopropulsión de los nanomotores en respuesta a la catálisis de  $H_2O_2$ . Por el contrario, el tamaño de MSN permanece prácticamente inalterado (**b**, **gris**).

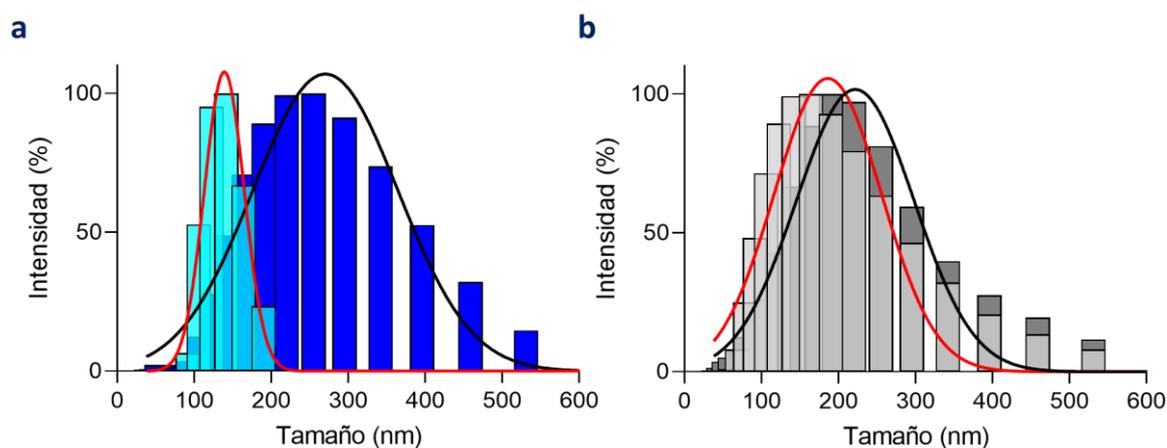
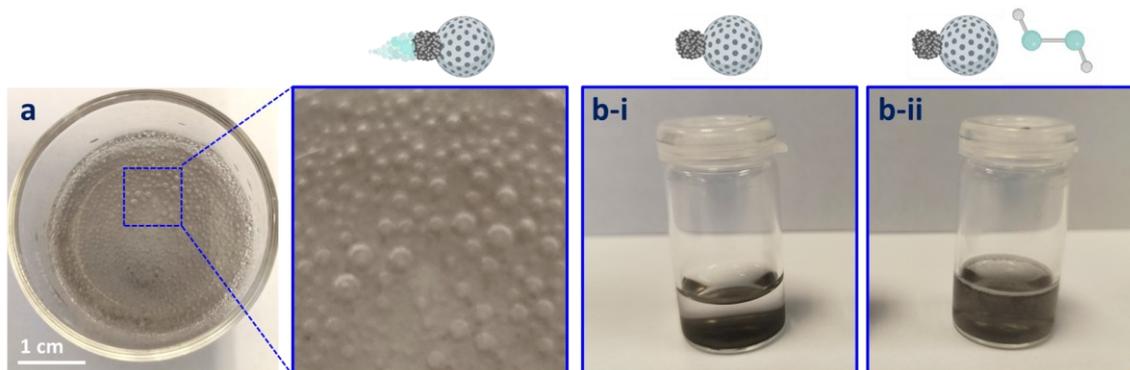


Figura III.30. Cambios en el diámetro hidrodinámico de los nanomotores a consecuencia de su autopropulsión. **a** NM (ausencia de  $H_2O_2$ : azul, presencia de  $H_2O_2$  0.07 %: azul turquesa). **b** MSN (agua: gris oscuro,  $H_2O_2$  0.07 %: gris claro). Datos obtenidos por DLS.

Finalmente, para completar la caracterización motil de NM, realizamos un análisis macroscópico del movimiento de los nanomotores. Para ello, tomamos una imagen a una solución de NM ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en PBS) en presencia de  $H_2O_2$  (0.2 %) a lo largo del tiempo. Como se

aprecia en la **Figura III.31a**, la generación de burbujas de  $O_2$  es visible para el ojo humano (diámetro medio aproximado de 2 mm) y se produce en un breve periodo de tiempo (menos de 1 min), lo que sugiere que NM sigue un mecanismo de propulsión por burbujas. Además, se registró el estado del sistema a distintos tiempos. Así, en la **Figura III.31b** se muestra una captura 3 min después de añadir el estímulo. Como se puede observar, en ausencia de combustible (**b-i**), NM decanta hasta el fondo del vial, mientras que, en presencia del combustible (**b-ii**), NM se distribuye por todo el vial a consecuencia de su autopropulsión. Nótese que en estos ensayos se aprecia el comportamiento general de múltiples nanomotores.



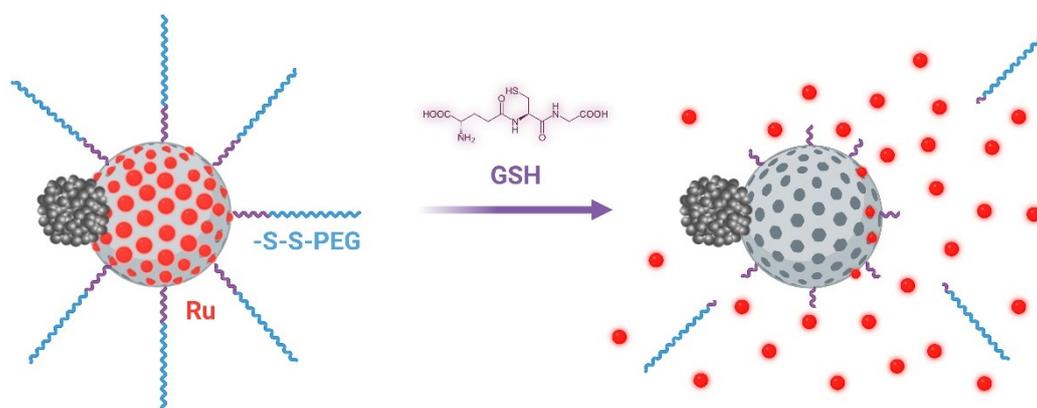
**Figura III.31. Análisis macroscópico del movimiento de NM.** **a** Generación de burbujas en respuesta a la catálisis de  $H_2O_2$  0.2 %. **b** Localización de NM tras 3 min de incubación con: PBS (**i**) o  $H_2O_2$  0.2 % (**ii**).

En conclusión, gracias a los resultados obtenidos en esta sección podemos afirmar que los nanomotores desarrollados presentan: (i) actividad peroxidasa y (ii) movimiento autónomo en respuesta a dicha actividad siguiendo seguramente un mecanismo de propulsión por burbujas. Asimismo, los nanomotores muestran una difusión considerable incluso a bajas concentraciones de combustible (0.07 %), lo que supone una ventaja frente a otros nanorobots sintetizados por las tecnologías mencionadas previamente.

En conjunto, estos hallazgos posicionan a NM como un prototipo interesante en el área de los nanomateriales activos alimentados químicamente para la entrega controlada de fármacos. En este sentido, el movimiento de la nanopartícula con carga y puerta molecular sintetizada en este capítulo ( $NM_{Ru-PEG}$ ) se estudió en un trabajo paralelo titulado «*Ultrafast Directional Janus Pt–Mesoporous Silica Nanomotors for Smart Drug Delivery*» publicado en la revista ACS Nano en 2021.<sup>303</sup> En éste, se demostró la autopropulsión de  $NM_{Ru-PEG}$  en respuesta a concentraciones más elevadas de  $H_2O_2$  como prueba de concepto. Sin embargo, dado que el objetivo de esta tesis doctoral es la aplicación de los nanomotores en entornos más relevantes (*in vitro* e *in vivo*), se optó por disminuir dicha concentración debido a su toxicidad asociada.

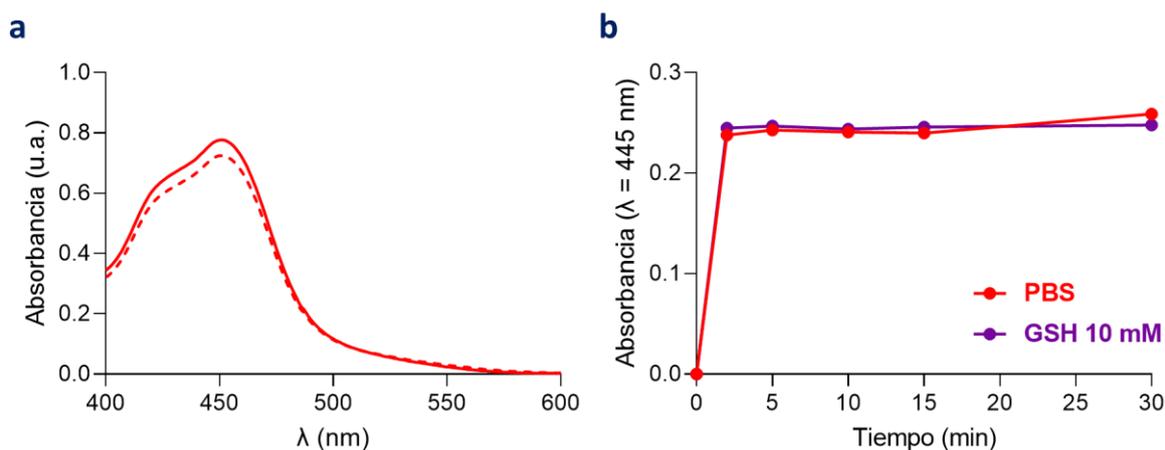
### III.6.3.2 El nanomotor libera la carga encapsulada ante el reconocimiento de un estímulo específico

Otro de los objetivos de este trabajo es emplear la nanoplataforma autopropulsada desarrollada para la entrega mejorada de fármacos en aplicaciones biomédicas. Por ello, como se ha explicado previamente, se decidió encapsular una molécula modelo en sus mesoporos y funcionalizar su superficie externa con una puerta molecular que responde a estímulos redox, como prueba de concepto. En la **Figura III.32** se ilustra el mecanismo de liberación propuesto. Con la adición de GSH a  $NM_{Ru-PEG}$ , se produce la reducción de los puentes disulfuro de la puerta molecular -S-S-PEG encargada de bloquear la salida de la carga encapsulada, provocando la liberación de ésta. De modo que, si se consigue demostrar que el nanomotor entrega controladamente un colorante, se abriría camino hacia su posible aplicación como nanotransportador de moléculas terapéuticas de interés.



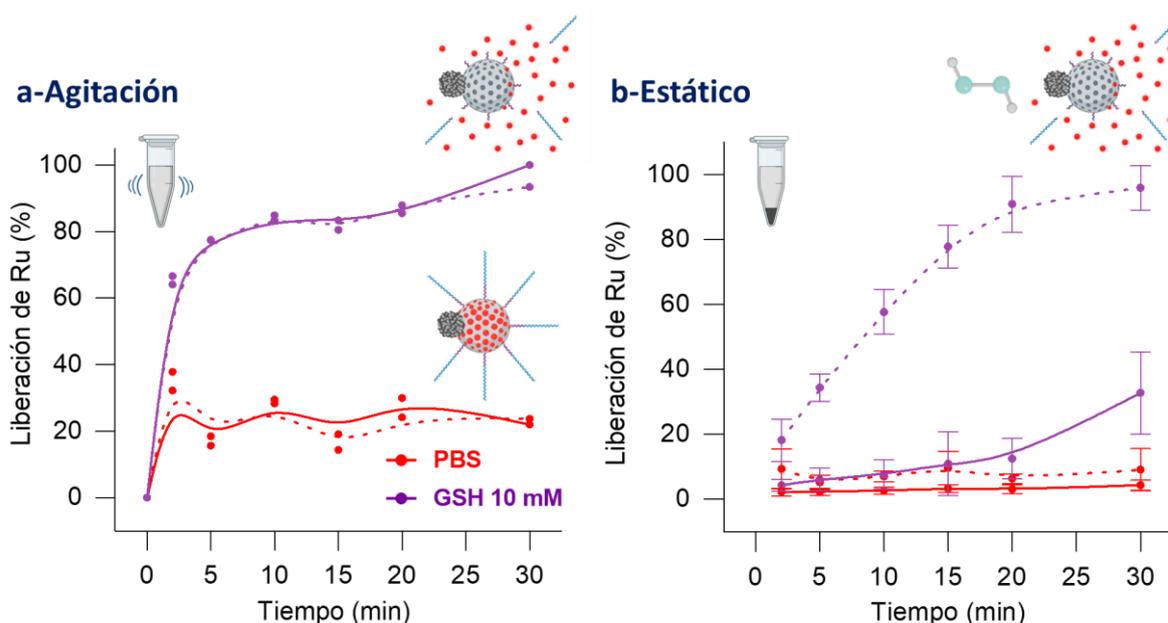
**Figura III.32.** Mecanismo de liberación de la carga de  $NM_{Ru-PEG}$  en respuesta a estímulos redox.

Para verificar este objetivo se empleó la espectroscopía UV-vis y la espectroscopía de fluorescencia. Los detalles experimentales se describen en la **Sección III.5.5**. El primer paso fue caracterizar la encapsulación del colorante por medio de espectroscopía UV-vis. Como se muestra en la **Figura III.33a**, la incubación de NM con una solución concentrada de Ru durante 24 h induce una disminución en la intensidad de la señal inicial (**línea roja**: tiempo 0 en ausencia de NM, **línea roja punteada**: tiempo 24 h de incubación con NM). Esto se atribuye a la introducción del colorante en la estructura porosa de NM dando lugar a  $NM_{Ru}$ . Seguidamente, se procedió a comprobar que el Ru encapsulado no quedaba atrapado en sistema poroso de NM (para dar  $NM_{Ru}$ ) por diversas fuerzas intermoleculares con los grupos silanol de su superficie interna. Los resultados se ilustran en la **Figura III.33b** e indican que el Ru es capaz de salir al medio en disolución. Además, en ese experimento también se comprobó que, en ausencia de puerta molecular, la liberación de la carga encapsulada desde  $NM_{Ru}$  se produce de forma incontrolada. No hay diferencias entre añadir o no el estímulo que induce la apertura del sistema de bloqueo de los poros, el cual está ausente en  $NM_{Ru}$  (**línea roja**:  $NM_{Ru}$  + PBS, **línea morada**:  $NM_{Ru}$  + GSH).



**Figura III.33. Caracterización de  $NM_{Ru}$ .** **a** Encapsulación de Ru en los poros de NM. Tiempo 0 en ausencia de NM: rojo, tiempo 24 h de incubación con NM: rojo punteado. **b** Liberación incontrolada de Ru desde  $NM_{Ru}$ . Ausencia de GSH: rojo, presencia de GSH 10 mM: morado. Medio: PBS 100 mM, pH 7.5.  $\lambda_{abs} = 445$  nm.

A continuación, se pasó a evaluar la habilidad de la puerta molecular (-S-S-PEG) para modular la liberación de Ru, siguiendo el procedimiento en dinámico que se resume en la **Figura III.7**. Además, los estudios de liberación también se realizaron en condiciones estáticas añadiendo el combustible que induce la autopropulsión, para estudiar la influencia del movimiento en este proceso. Las cinéticas de liberación de  $NM_{Ru-PEG}$  se presentan en la **Figura III.34** (**a**, en agitación; **b**, en estático). En ellas se puede observar que, en ausencia de GSH (**curva roja**) la señal fluorescente detectada es prácticamente despreciable, demostrando que el Ru no se libera al medio de forma inespecífica y que, por tanto, la puerta molecular -S-S-PEG bloquea adecuadamente los poros impidiendo la pérdida prematura de la carga. El pequeño porcentaje de liberación observado (aproximadamente el 20 % en agitación y en torno al 5 % en estático) puede deberse a la existencia de restos del compuesto (que no se eliminaron en los pasos de lavado) adsorbidos sobre la superficie del nanomotor. Por el contrario, en presencia de GSH (**curva morada**) la señal fluorescente aumenta significativamente. Esto se debe a que la reducción de los grupos disulfuro de -S-S-PEG provoca el desplazamiento de parte de la puerta molecular y, en consecuencia, el desbloqueo de los poros. En ese momento, el Ru se libera desde el nanomotor al medio acuoso debido al gradiente de concentración favorable. Sin embargo, este proceso ocurre de forma mucho más rápida en agitación mecánica (**a**, donde la liberación es prácticamente inmediata tras la adición del estímulo) que en reposo (**b**, donde la liberación comienza a tiempos superiores a 20 min). En cambio, si en esas condiciones se añade también  $H_2O_2$  (**b**, **curva morada punteada**), la liberación se acelera considerablemente. Esto puede deberse a que la mezcla de fluidos provocada por la difusión de los nanomotores favorece el proceso de liberación. En el gráfico también se observa el que el  $H_2O_2$  por sí solo (**curva roja punteada**) no tiene efecto sobre la liberación de la carga. De lo que se infiere que, aunque el movimiento mejora la liberación, no es capaz de causarla por sí solo. Por tanto, se trata de 2 eventos independientes (movimiento y liberación) que requieren el aporte de ambos sustratos ( $H_2O_2$  y GSH, respectivamente). La cantidad de Ru liberado se calculó mediante esta técnica y ascendió a  $68.5 \mu\text{g mg sólido}^{-1}$ .



**Figura III.34. Ensayos de liberación controlada de  $NM_{Ru-PEG}$ .** **a** En condiciones de agitación. **b** En condiciones estáticas. PBS: rojo, GSH 10 mM: morado,  $H_2O_2$  0.1%: rojo punteado, GSH 10 mM +  $H_2O_2$  0.1%: morado punteado. Medio: PBS 100 mM, pH 7.5.  $\lambda_{exc} = 453$  nm,  $\lambda_{em} = 595$  nm. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes.

Los resultados expuestos en este apartado demuestran que el nanomotor cumple con la funcionalidad deseada: (i) es capaz de percibir el entorno y controlar la liberación de su carga, siendo el reconocimiento de un estímulo específico un requisito indispensable para liberarla; y, además, (ii) su capacidad de autopropulsión acelera significativamente el proceso. Ambos hallazgos suponen un importante avance en vista a lograr la aplicación de los nanomotores como herramienta para la entrega de fármacos en entornos complejos. Posibilitar su administración concreta y veloz, es una ventaja frente a nanosistemas previos que solo cuentan con una de las capacidades de  $NM_{Ru-PEG}$ , bien careciendo de autopropulsión o bien careciendo de funcionalización con sistemas de control tipo estímulo-respuesta. Por estos motivos, la plataforma  $NM_{PEG}$  se ha empleado con éxito para la liberación mejorada de Doxo en células cancerosas. La caracterización funcional y la validación *in vitro* de ese nanodispositivo se describe en el artículo «*Ultrafast Directional Janus Pt–Mesoporous Silica Nanomotors for Smart Drug Delivery*».<sup>303</sup>

#### III.6.4 Caracterización de la biocompatibilidad del nanomotor

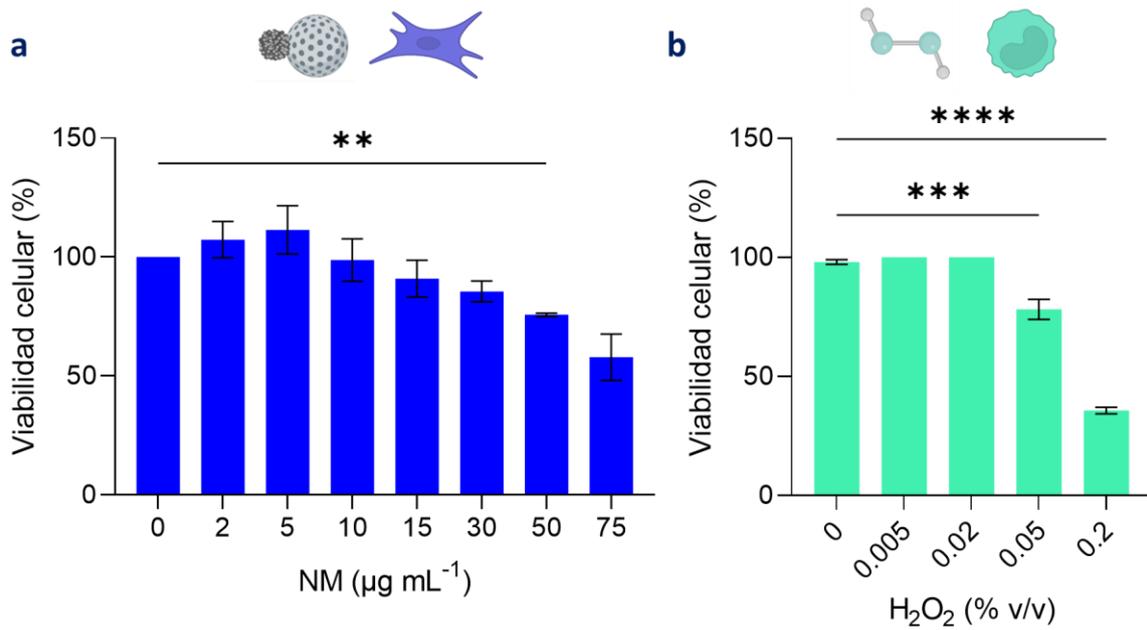
Uno de los requisitos más importantes que se les demandan a los nanomotores para su implementación en el campo biomédico es que sean biocompatibles. En este sentido, aunque está bien caracterizada la bioseguridad de las MSNs,<sup>304</sup> no hay tantos estudios sobre el posible efecto tóxico de las nanopartículas de Pt<sup>305,306</sup> y ninguno sobre la combinación de ambos elementos. Por ese motivo, se procedió a evaluar la toxicidad de NM (sin carga ni puerta molecular) en cultivo celular de fibroblastos pulmonares WI-38 (**Sección III.5.6**), ya que se pretende emplear para la encapsulación de diferentes moléculas con efecto terapéutico, cuya entrega dependerá de la funcionalización con diversas puertas moleculares. Así, para minimizar

los efectos indeseados en las dianas biológicas, se ha de asegurar que la plataforma inorgánica desarrollada es inocua.

Los ensayos de viabilidad celular, resumidos en la **Figura III.35a**, indican que el tratamiento con NM durante 24 h (dosis de 2 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) no provoca muerte celular, obteniéndose porcentajes de viabilidad cercanos al 100 %. En cambio, el tratamiento con NM a concentraciones más altas (50 y 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) comienza a afectar a la viabilidad de las células WI-38. En ese punto, los valores descienden hasta el 76 y el 60 % respecto al control no tratado, respectivamente. Estos resultados revelan que NM es seguro siempre que se administre a bajas concentraciones. Al aumentarlas, se observa una relación dosis-respuesta con el resultado de muerte celular, que se atribuye a la posible toxicidad de las nanopartículas de Pt. Este hecho desaconseja la administración de NM a altas dosis. Sin embargo, no es perjudicial necesariamente, pues la gran capacidad de almacenaje del sistema de canales de la cara de MSN permite encapsular altos niveles de carga, reduciendo así la cantidad de NM requerida para exhibir un potencial efecto terapéutico.

No obstante, es importante recalcar que este ensayo supone una primera aproximación para determinar la bioseguridad de NM. Para estudiarla a fondo, se debería ampliar en términos de tiempo de exposición, concentraciones, tipos celulares, etcétera; así como realizar otro tipo de estudios que incluyan la evaluación del efecto de NM a nivel molecular o inmunológico, como, por ejemplo, ensayos de hemólisis *in vitro*. Además, se debería abordar la evaluación de la nanotoxicidad de NM a largo plazo en modelos *in vivo*, determinándose su biodistribución en órganos y tejidos, los posibles efectos dañinos sobre ellos y su eliminación final del organismo.

Asimismo, para los motores químicos alimentados exógenamente, es fundamental que el combustible adicionado no sea tóxico por sí mismo. Esto no se puede garantizar para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a altas concentraciones (especialmente por encima del 0.2 % ya que la viabilidad celular desciende hasta valores menores del 50 %, **Figura III.35b**). Por tanto, la aplicación de NM sólo estaría indicada en entornos biológicos donde la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sea nociva. Un ejemplo son las infecciones odontológicas, donde esta molécula ya se emplea como desinfectante en clínica. En cambio, para usar NM en tareas dirigidas al interior del organismo, sería conveniente implementar nuevos mecanismos de autopropulsión autónoma, que no requieran la administración exógena del combustible.



**Figura III.35. Evaluación de la biocompatibilidad del nanosistema desarrollado mediante ensayos de viabilidad *in vitro*.** **a** Análisis de la toxicidad de NM. Ensayo WST-1 en cultivo de células WI-38. NM: azul, 24 h de tratamiento con concentraciones de 0 a  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . **b** Análisis de la toxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ensayo WST-1 en cultivo de células THP-1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : azul turquesa, 24 h de tratamiento con concentraciones de 0 a 0.2 % (v/v). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### III.7 CONCLUSIONES

En el primer capítulo experimental de esta tesis doctoral se ha descrito el diseño, síntesis y caracterización de un nanomotor multifuncional tipo Janus formado por la unión toposelectiva de nanopartículas de Pt y MSNs. A continuación, se resumen las conclusiones alcanzadas:

- ✓ Se ha llevado a cabo la síntesis de los componentes individuales que integran el nanomotor y se han combinado con éxito en un solo **nanodispositivo anisotrópico tipo Janus Pt-MSN mediante el método de emulsión de Pickering**.
- ✓ Se ha confirmado la estructura y composición del nanomotor mediante las técnicas de caracterización estándar. Éste presenta una **morfología tipo «muñeco de nieve» con dos caras diferenciadas de Pt y MSNs**. Por un lado, la cara de Pt está compuesta por la agrupación de múltiples nanodendritas que maximizan la superficie catalítica. Por otro lado, la cara de MSNs contiene un sistema mesoporoso con elevada capacidad de carga y una amplia superficie externa disponible para ser funcionalizada.
- ✓ Se ha comprobado que es posible cargar los poros del nanomotor y funcionalizar su superficie externa con una **puerta molecular (-S-S-PEG)** sin que su conformación estructural se vea alterada.
- ✓ Se ha validado la capacidad del nanomotor para **autopropulsarse** en respuesta a la **descomposición catalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>**. Esta funcionalidad se debe a la actividad peroxidasa de la cara de Pt y a la nanoarquitectura asimétrica del dispositivo. Además, los resultados sugieren que el movimiento sigue el mecanismo de **propulsión por burbujas**.
- ✓ Se ha validado la capacidad del nanomotor para **entregar sustancias de forma controlada**. Esta funcionalidad se debe a las propiedades de la cara de MSN, que permiten su modificación con sistemas de control de la liberación en función del reconocimiento de estímulos específicos. Asimismo, se ha demostrado que el movimiento del nanomotor **acelera el proceso de liberación de la carga**.
- ✓ Los ensayos realizados sugieren que el nanomotor es biocompatible a baja concentración, pero han de realizarse más estudios para aseverarlo.

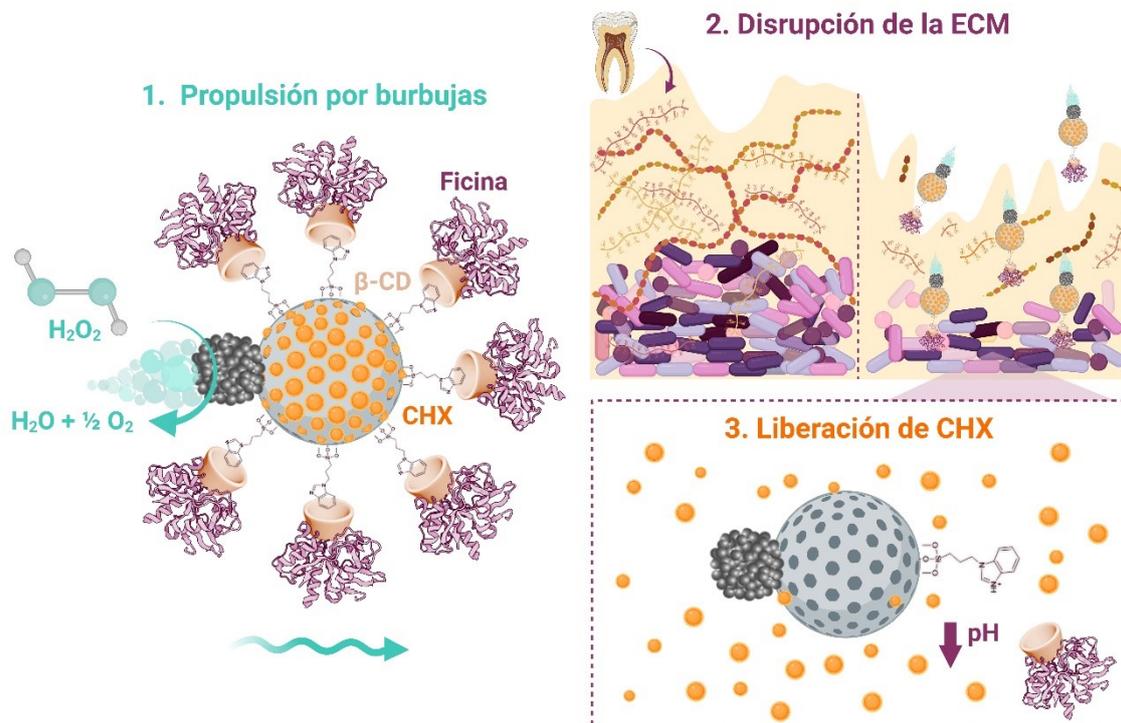
En conjunto, estos hallazgos posicionan a NM como un candidato ideal para su aplicación en la entrega mejorada de fármacos en ciertas aplicaciones biomédicas, lo cual se explora en los siguientes capítulos.

**CAPÍTULO IV:**  
**NANOMOTORES**  
**JANUS PT-MSN PARA EL**  
**TRATAMIENTO DE**  
**BIOPELÍCULAS BACTERIANAS**



## IV.1 RESUMEN GRÁFICO

### Aplicación del nanomotor Janus Pt-MSN en biopelículas bacterianas



## IV.2 RESUMEN

El tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas supone un gran reto para la salud pública. Uno de los principales motivos es que, en la mayoría de los casos, están mediadas por biopelículas. Se trata de estructuras con una compleja ECM que protege a las bacterias frente a los ataques externos, invalidando la eficacia de las terapias convencionales. Por tanto, la búsqueda de nuevos métodos para degradar la ECM y posibilitar el acceso de los agentes antimicrobianos hasta las células patógenas es prioritaria. En este contexto, proponemos la implementación de nanomotores Janus Pt-MSN propulsados por la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  (catalizada por la cara de Pt). Por otra parte, la cara de MSNs está cargada con clorhexidina y funcionalizada con un complejo supramolecular, constituido entre grupos benzimidazol (unidos a la superficie de las MSNs) y  $\beta$ -ciclodextrinas (unidas a la proteasa ficina). La puerta molecular desempeña una doble función. Por un lado, hidroliza la parte proteica de la ECM y, por otro lado, induce la liberación de clorhexidina a pH ácido en el interior de la biopelícula. La triple actividad antimicrobiana sinérgica (movimiento, degradación de la ECM y entrega de antisépticos) de los nanomotores se ha demostrado en biopelículas derivadas de saliva y biopelículas de *S. mutans* crecidas sobre dentina. Los nanomotores lograron eliminar un elevado porcentaje de células patógenas, mientras que sus componentes por separado provocaron una reducción notablemente inferior. En conclusión, nuestros resultados prueban la eficacia de la estrategia desarrollada para penetrar en una BB como la ECM de las biopelículas y causar la muerte de las células bacterianas alojadas en ellas.



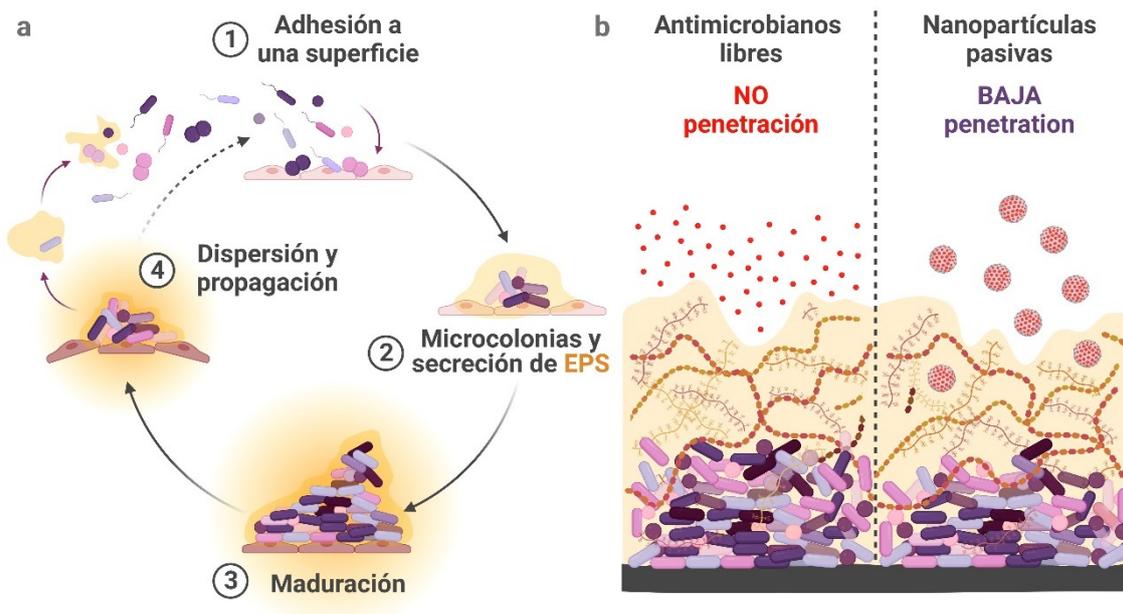
### IV.3 INTRODUCCIÓN

Por la combinación de elevada capacidad motriz y posibilidad de encapsulación de moléculas bioactivas y funcionalización con puertas moleculares, los nanomotores Janus Pt-MSN se sitúan como un prometedor vehículo para la entrega mejorada y localizada de sustancias a través de BB. Nuestra hipótesis de partida es que su **autopropulsión incrementada** puede ayudar a **disgregar las ECM patológicas favoreciendo el alcance de las dianas terapéuticas**. En concreto, en este capítulo nos vamos a centrar en la ECM de las **biopelículas que forman los microorganismos patógenos**, las cuales desencadenan graves y recalcitrantes infecciones muy difíciles de curar con los métodos convencionales. Seguidamente, se describen las características de las biopelículas y, en particular, de las causantes de infecciones endodónticas. Además, se exponen algunos ejemplos de otros nanomotores destinados a su eliminación para poner de manifiesto la idoneidad de esta aproximación y los retos a los que todavía se enfrenta.

#### IV.3.1 Biopelículas: importancia de perturbar su ECM

Tal como se ha explicado en la introducción general (**Sección I.4.1**), algunos microorganismos, tanto bacterias como hongos, forman comunidades mono- o multiespecie organizadas, asociadas a superficies y embebidas en una compleja red de exopolímeros autosecretados (**Figura IV.1a**). Estas estructuras son la forma habitual de vida de los microbios en la mayoría de los hábitats naturales, ya que la ECM protege a las células de las inclemencias ambientales y posibilita la formación de canales de comunicación e intercambio de nutrientes y otras sustancias entre ellas.<sup>307,308</sup>

El riesgo epidemiológico se origina cuando microorganismos patógenos y/u oportunistas establecen biopelículas sobre tejidos humanos y/o dispositivos médicos implantables (como prótesis ortopédicas o mamarias, válvulas cardíacas y catéteres endotraqueales, urinarios, sanguíneos o vaginales) causando infecciones. De hecho, se estima que las biopelículas están involucradas en el 80 % de las enfermedades infecciosas.<sup>309</sup> En esos casos, la ECM ampara a las células patógenas del ataque de las defensas de los hospedadores e impide la difusión de antibióticos, antifúngicos y otras moléculas antimicrobianas (como detergentes, péptidos, productos naturales, DNAsas, RNAsas, etc.) hasta ellas. Como consecuencia de la impenetrabilidad de las ECMs, es necesaria la administración de altas concentraciones de fármacos y aun así no se logra en muchas ocasiones eliminar a las bacterias de forma total. La encapsulación de los agentes antimicrobianos en nanopartículas pasivas reduce los niveles requeridos y mejora parcialmente su penetrabilidad, pero sigue siendo insuficiente para alcanzar a las células localizadas en las capas interiores de las biopelículas (**Figura IV.1b**).<sup>310</sup>



**Figura IV.1. Biopelículas.** a Ciclo de vida y formación de biopelículas. b La ECM dificulta la penetración de los agentes antimicrobianos libres y encapsulados en nanopartículas pasivas.

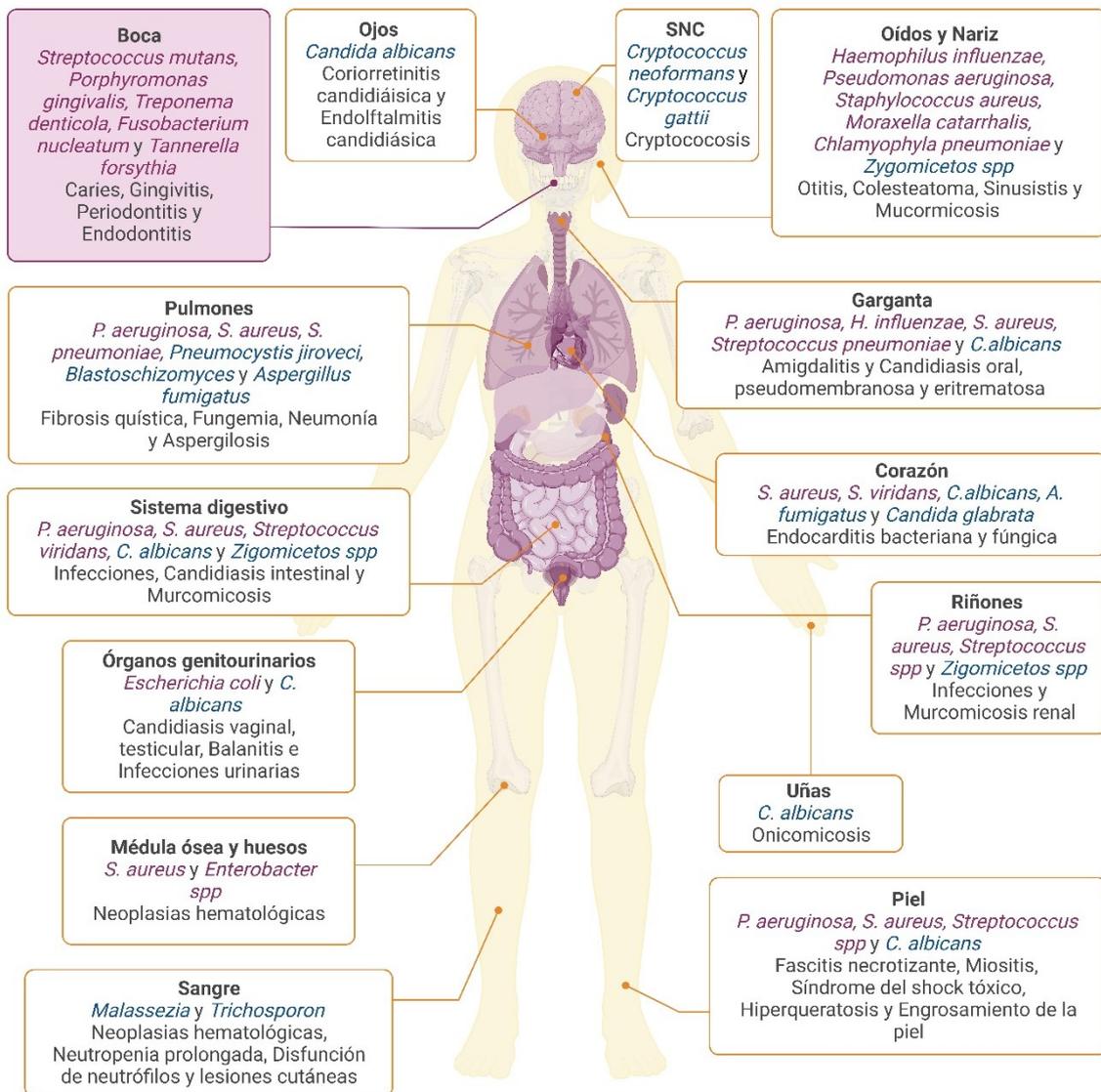
Además de suponer un obstáculo físico, las ECMs también facilitan la transmisión lateral de genes. Esto, sumado al abuso y uso indebido de los antimicrobianos en la sociedad, ha favorecido la aparición de resistencias frente a ellos. De hecho, las bacterias inmersas en biopelículas son de 100 a 1000 veces más resistentes que las bacterias en estado planctónico.<sup>311,312</sup> La existencia de bacterias multi- y pan-resistentes («*superbacterias*») es una de las principales preocupaciones de la organización mundial de la salud (OMS), quién alerta del inminente riesgo de una nueva pandemia provocada por la **resistencia a antimicrobianos** (AMR).

En resumen, debido a todos estos motivos, es **muy difícil eliminar completamente a los patógenos**, lo que da lugar a **enfermedades infecciones severas, persistentes y recurrentes** que suponen un gran problema de salud pública a nivel mundial, exhibiendo altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.<sup>313</sup>

Por último, es importante destacar que las biopelículas no son sólo un problema en medicina, sino que también afectan a la industria alimentaria, pudiendo causar peligrosas intoxicaciones alimentarias y a los sistemas de conducción de agua potable, reduciendo su capacidad de circulación.<sup>314,315</sup>

#### IV.3.1.1 Biopelículas en salud dental: infecciones endodónticas

Un sustrato biótico sobre el que crecen biopelículas bacterianas causando disbiosis es el **diente**, aunque existen numerosos ejemplos más que se ilustran en la **Figura IV.2**.



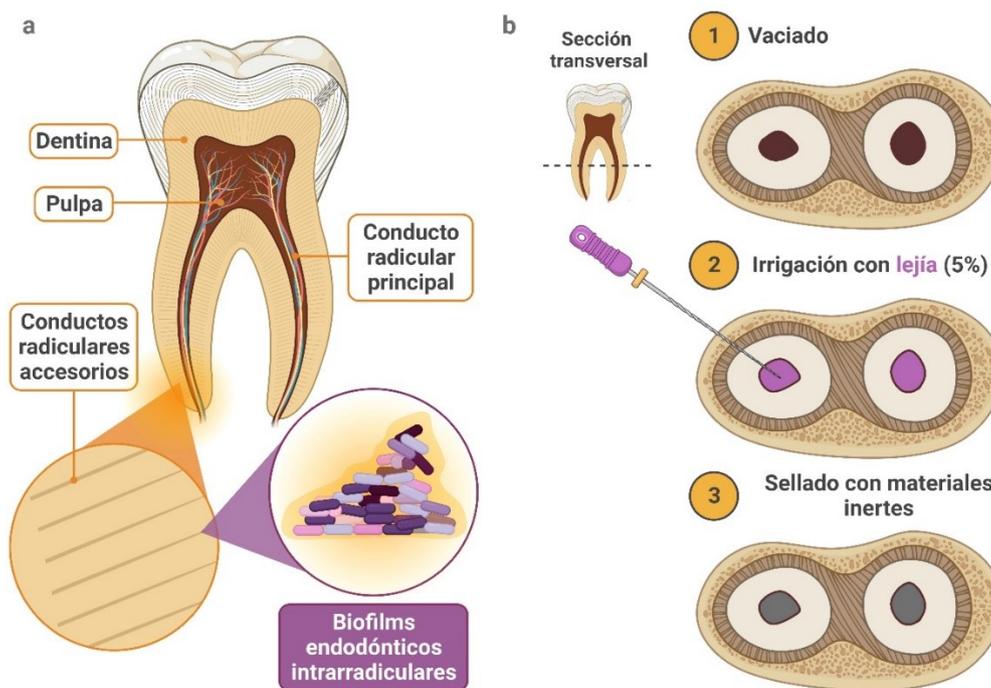
**Figura IV.2. Enfermedades infecciosas: órganos afectados y patógenos formadores de «biofilms» que las causan.** Azul: relativo a patógenos fúngicos, morado: relativo a patógenos bacterianos.

En la superficie dental se establecen comunidades de microorganismos de los géneros: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Anaerococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* y ***Streptococcus***, entre otros. Éstos dan lugar a patologías odontológicas como caries, gingivitis, periodontitis e **infecciones endodónticas**. Las endodoncias son un tipo de tratamiento por el que se extirpa la pulpa dental de piezas dentales afectadas por pulpitis provocada por caries profundas. Incluye las etapas de: (i) limpieza y desinfección de los conductos radiculares, (ii) obturación de los conductos radiculares con materiales inertes y (iii) sellado de la parte apical de los conductos radiculares por la acción de los cementoblastos. Sin embargo, este procedimiento no siempre tiene éxito, pues **nunca se logra la asepsia total en la pieza dental enferma**, lo que da lugar a las infecciones endodónticas. Las biopelículas que las causan se forman sobre la dentina de los conductos radiculares, o bien, sobre la raíz, la región periapical o la superficie del material artificial aportado.

Las **biopelículas intrarradiculares** son las más complicadas de eliminar, pues se localizan en zonas de difícil acceso por su compleja, irregular y estrecha anatomía (**Figura IV.3a**). Los conductos radiculares se dividen en principales, laterales y accesorios; y presentan multitud de morfologías, como forma de C, deltas apicales, istmos y otras configuraciones. Asimismo, su diámetro varía entre 2.5  $\mu\text{m}$  en la apertura y 0.9  $\mu\text{m}$  en la parte final. Además, en ocasiones estos «*biofilms*» están asociados a tejido necrótico fibrodentinario. En cuanto a los microorganismos presentes, destaca *Enterococcus faecalis* por su resistencia a ser eliminada con los métodos convencionales.<sup>316</sup>

En la práctica clínica, la desinfección de los conductos radiculares se realiza mediante **técnicas de irrigación** que hacen fluir soluciones antimicrobianas a través de ellos de forma pasiva (**Figura IV.3b**).<sup>317</sup> Las soluciones contienen antisépticos como hipoclorito de sodio o **digluconato de clorhexidina (CHX)**. El más empleado es el hipoclorito de sodio a baja concentración (hasta 5 %), que puede combinarse con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como quelante. No obstante, esta estrategia presenta toxicidad tisular y riesgo de desarrollo de enfisemas o alergias. En cambio, la CHX es un **agente bactericida y bacteriostático de amplio espectro**, cuya acción se debe a la inducción de un aumento de permeabilidad en la pared bacteriana. Además, su efecto es prolongado en el tiempo y no genera toxicidad en los tejidos bucales adyacentes. Adicionalmente, también se pueden emplear surfactantes catiónicos, hidróxido de calcio (CH),  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1.5 % y una pasta triple antibiótica (TAP) compuesta por metronidazol (MET), ciprofloxacino y minociclina. La efectividad de las técnicas de desinfección por irrigación es limitada debido a la inaccesibilidad de los intrincados conductos. Para aumentar su capacidad de penetración en ellos, se han combinado con agitación por US y activación por efecto fotoacústico (transmisión fotoacústica inducida por fotones, PIPS, y emisión fotoacústica mejorada por onda de choque, SWEEPS).<sup>318-320</sup> Sin embargo, la profundidad lograda sigue siendo insuficiente para alcanzar a toda la población de bacterias patógenas.<sup>321</sup>

En general, estas infecciones se producen en el 35 % de los pacientes jóvenes y en el 62 % de los pacientes mayores de 60 años, afectando en total a más de 2 millones de personas en España cada año.<sup>322</sup> Por la elevada prevalencia y riesgo para la salud integral del paciente que poseen, la búsqueda de nuevas herramientas para la desinfección en endodoncias es de gran interés económico y terapéutico.

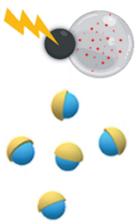


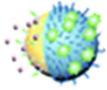
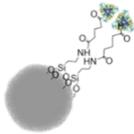
**Figura IV.3. Infecciones endodónticas.** a Descripción de la anatomía dental y la localización de los «*biofilms*» endodónticos. b Técnicas empleadas en clínica para desinfectar los conductos radiculares.

### IV.3.2 Abordaje de las infecciones mediadas por biopelículas mediante el uso de nanomotores

Ante la necesidad apremiante de emplear nuevas herramientas para perturbar la integridad de la ECM de las biopelículas y, de ese modo, eliminar de forma más efectiva las infecciones, recientemente se ha comenzado a aplicar nanopartículas autopropulsadas por sus idóneas características ya discutidas (Tabla IV.1). En particular, para el tratamiento de biopelículas endodónticas el único ejemplo descrito fue desarrollado por Ghosh y su equipo.<sup>323</sup> El nanorobot consistía en una nanohélice de sílice y hierro propulsada magnéticamente capaz de provocar la muerte bacteriana por hipertermia. Hasta la fecha, se trata de la tecnología que mayor penetración radicular ha exhibido (2000  $\mu\text{m}$ ), revelando la enorme habilidad de los nanomotores para acceder hasta la localización de las biopelículas intrarradiculares. No obstante, este nanodiseño presenta la limitación de no portar moléculas antimicrobianas hasta las células patógenas.

**Tabla IV.1. Lista de los nanomotores empleados para la eliminación de biopelículas.**

DESCRIPCIÓN	FORMA DE PROPULSION	NANOARQUITECTURA Y COMPOSICIÓN	APLICACIÓN	REFERENCIA
	Luz NIR	Dímero Janus (Pt-PDVB)	Infecciones en la piel ( <i>C. albicans</i> )	144
	Luz NIR	Esfera Janus (Au-SiO <sub>2</sub> )	Eliminación de biopelículas <i>in vitro</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	324

	Luz (UV-visible)	Tubular (Ag-TiO <sub>2</sub> )	Infecciones multi-especie en implantes maxilofaciales	325
	Ácido	Esférica (CaCO <sub>3</sub> -polidopamina, PDA)	Úlceras diabéticas ( <i>S. aureus</i> )	326
	NO	Esfera Janus (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PDA)	Infecciones en quemaduras ( <i>P. aeruginosa</i> )	327
	NO	Janus dendrítica (Au-SiO <sub>2</sub> )	Eliminación de biopelículas <i>in vitro</i> ( <i>S. aureus</i> )	212
	Enzimática	Esférica (SiO <sub>2</sub> -Ureasa)	Infecciones urinarias ( <i>E. coli</i> )	233
	Magnética	Helicoidal (SiO <sub>2</sub> -Fe)	Desinfección de endodoncias ( <i>E. faecalis</i> )	323

#### IV.4 OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es la aplicación del nanomotor **Janus Pt-MSN** desarrollado en el capítulo III para **penetrar en la ECM de las biopelículas intrarradiculares y eliminar las células bacterianas**. Para ello, la cara de MSN va a actuar como nanocontenedor del antiséptico CHX. Además, va a estar modificada externamente con una puerta molecular compuesta por un complejo de inclusión sensible a pH ácido. Éste va a estar formado entre moléculas de benzimidazol (BNZ) unidas covalentemente a la superficie del nanomotor y  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ CD) que decorarán a la enzima ficina (F- $\beta$ CD), una conocida proteasa vegetal natural con propiedades únicas para destruir la ECM de las biopelículas.

La motivación de este objetivo es la necesidad de mejorar las técnicas desinfección actuales, que son incapaces de eliminar eficazmente las bacterias supervivientes alojadas en las complejidades anatómicas del sistema de conductos radiculares. Se espera que la triple funcionalidad de los nanomotores diseñados: (i) autopropulsión por la catálisis de bajas concentraciones de  $H_2O_2$ ; (ii) degradación de la parte proteica de la ECM por la acción de la ficina; y (iii) transporte y liberación específica y sostenida de CHX por la acción de la puerta molecular sensible a pH, ayude a **eliminar las infecciones endodónticas**.

Los subobjetivos concretos que se abordan en este capítulo son:

- La síntesis del nanomotor Janus Pt-MSN-(CHX)-BNZ-F- $\beta$ CD ( $NM_{CHX-F}$ ), así como de distintas nanopartículas control que carecen de alguna de sus habilidades fundamentales, *i.e.*, actividad proteolítica ( $NM_{CHX-\beta CD}$ ), liberación de la carga ( $NM_F$ ) y movimiento ( $MSN_{CHX-F}$ ).
- El estudio del comportamiento motor de  $NM_{CHX-F}$  en respuesta a la catálisis de  $H_2O_2$  mediante las técnicas NTA y DLS.
- El estudio de la capacidad de  $NM_{CHX-F}$  para liberar CHX al medio en respuesta a pH ácido mediante espectroscopía de absorción visible.
- La evaluación de la biocompatibilidad del nanomotor en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- La evaluación de la capacidad antimicrobiana de  $NM_{CHX-F}$  en un modelo *ex vivo* de biopelículas orales derivadas de saliva.
- La evaluación de la capacidad antimicrobiana de  $NM_{CHX-F}$  en un modelo *ex vivo* de biopelículas endodónticas crecidas sobre dentina.

## IV.5 MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.5.1 Reactivos

En este capítulo, los reactivos químicos empleados para la síntesis y caracterización de los nanomateriales fueron: CTAB, TEOS,  $H_2PtCl_6$ , PVP, ácido ascórbico, citrato sódico tribásico dihidratado, parafina, MPTMS, (3-yodopropil) trimetoxisilano, benzimidazol (BNZ), trietilamina (TEA), digluconato de clorhexidina ( $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ ), ficina de látex de *Ficus carica* (EC 3.4.22.3), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), ABTS, HRP, WST-1, vitamina K1, hemina, vitamina K3 y cristal violeta (CV) adquiridos en Sigma Aldrich. *BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay* adquirido en Promega.  $H_2O_2$  (30 %, v/v) y PBS proporcionados por Thermo Fisher. Hidróxido de sodio, etanol, cloroformo, tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), ACN, fenol, ácido trifluoroacético (TFA), ácido sulfúrico, ácido acético y agar adquiridos en Scharlab. RPMI, DMEM, FBS, aminoácidos no esenciales, tripsina y *LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit* proporcionados por Gibco-Invitrogen. Medio *Brain Heart Infusion broth* (BHI) adquirido en Biolife.

### IV.5.2 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de **MSN**, **Pt** y **NM** se realizó de acuerdo con lo especificado en el capítulo III (Secciones III.5.2.1, III.5.2.2 y III.5.2.3).

#### IV.5.2.1 Síntesis de $NM_{CHX-F}$

Para la síntesis de  $NM_{CHX-F}$  se llevaron a cabo los siguientes pasos:

##### - *Funcionalización de NM con grupos benzimidazol ( $NM_{BNZ}$ )*

En primer lugar, se funcionalizó la superficie externa de la cara mesoporosa de NM con grupos BNZ que formarán complejos de inclusión con  $\beta$ -CDs unidas a ficina (F- $\beta$ CD) para generar la puerta molecular sensible al pH. Para unir los grupos BNZ a los nanomotores, previamente se decoró su superficie con grupos yoduro. Para ello, se suspendieron 60 mg de NM en 4 mL de ACN y se trataron con 60  $\mu$ L de (3-yodopropil) trimetoxisilano. La reacción se agitó magnéticamente durante 5.5 h. El producto se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min) y se lavó con tolueno 3 veces siguiendo el mismo procedimiento. A continuación, se preparó una disolución saturada de BNZ, mezclando 0.25 mg de BNZ con 990  $\mu$ L de TEA y 20 mL de tolueno. La mezcla se calentó a 80 °C hasta la disolución completa del BNZ. Tras ello, se añadieron 10 mL de la disolución sobre NM. La reacción se mantuvo en agitación magnética a 80 °C en condiciones de reflujo durante 3 días. Finalmente, el sólido  $NM_{BNZ}$  se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min), se lavó con tolueno hasta la desaparición del color grisáceo característico del BNZ y se secó en una estufa a 37 °C durante una noche.

##### - *Cargado de $NM_{BNZ}$ con CHX ( $NM_{CHX}$ )*

Los mesoporos de NM se cargaron con el antiséptico CHX. Para ello, se mezclaron 40 mg de  $NM_{BNZ}$  con una disolución concentrada de CHX (10 mg en 4 mL de una mezcla DMSO/PBS, 1:1). La reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido  $NM_{CHX}$  se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min).

#### - *Síntesis de F-βCD*

Para la unión de βCD a ficina se empleó βCD previamente modificada con grupos amino (βCD-NH<sub>2</sub>).<sup>328</sup> En primer lugar, se usó la química EDC/NHS para activar los grupos ácidos de la enzima. Para ello, se disolvieron 25 mg de ficina en 4 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) y se mezclaron con 25 mg de EDC y 25 mg de NHS. La reacción se mantuvo en agitación magnética a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 13 mg de βCD-NH<sub>2</sub> y la mezcla se agitó magnéticamente durante 24 h a 4 °C para generar enlaces amida entre los grupos amino de βCD-NH<sub>2</sub> y los grupos ácidos activados de la ficina. Finalmente, la **F-βCD** se dializó utilizando unidades de filtración para centrifuga Amicon Ultra-05 de 3kDa (13.500 rpm, 5 min) y se lavó 3 veces con PBS frío (100 mM, pH 7.5).

#### - *Funcionalización de NM<sub>CHX</sub> con F-βCD*

Para formar la puerta molecular constituida por los complejos de inclusión establecidos entre los grupos BNZ que funcionalizan la superficie de NM<sub>CHX</sub> y las βCD unidas a la ficina, se mezclaron 40 mg NM<sub>CHX</sub> con 12.5 mg de F-βCD en 3 mL de PBS. En este momento, se añadió una punta de espátula de CHX para prevenir la pérdida de la carga. La reacción se agitó magnéticamente durante una noche a 4 °C. Por último, la mezcla se centrifugó (13.500 rpm, 5 min) y el sólido resultante se lavó con PBS (100 mM, pH 7.5) siguiendo el mismo método hasta la desaparición del color blanco característico de la CHX no encapsulada, obteniendo el nanomotor final **NM<sub>CHX-F</sub>**.

#### IV.5.2.2 Síntesis de NM<sub>CHX-βCD</sub>

Para sintetizar el nanomotor control sin la actividad proteolítica de la ficina, **NM<sub>CHX-βCD</sub>**, 15 mg de NM<sub>CHX</sub> reaccionaron durante una noche con 5 mg de βCD en 3 mL de PBS (100 mM, pH 7.5).

#### IV.5.2.3 Síntesis de NM<sub>F</sub>

Para sintetizar el nanomotor control sin el efecto antimicrobiano de la CHX, **NM<sub>F</sub>**, 15 mg de NM<sub>BNZ</sub> reaccionaron con 3.75 mg de F-βCD en 3 mL de (100 mM, pH 7.5) durante una noche a 4 °C.

#### IV.5.2.4 Síntesis de MSN<sub>CHX-F</sub>

Para sintetizar el nanodispositivo control sin movimiento, **MSN<sub>CHX-F</sub>**, se siguió el procedimiento descrito para NM<sub>CHX-F</sub>, pero empleando MSN en lugar de NM.

Todas las nanopartículas se sintetizaron en condiciones de esterilidad y se almacenaron suspendidas en 1 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) a 4 °C hasta su uso.

### IV.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales

Para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas se emplearon las siguientes técnicas: HR-TEM, STEM-EDX, PXRD, adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, FTIR, TGA, DLS y espectroscopía UV-visible. Las muestras se prepararon en las mismas condiciones que en el capítulo III y se utilizaron los mismos instrumentos y métodos analíticos. Además, se evaluó la cantidad de βCD unida a la ficina y su actividad proteolítica.

#### IV.5.3.1 Determinación de la cantidad de βCD unida a ficina

Para este fin se empleó el método del fenol-sulfúrico, indicado para la cuantificación de carbohidratos.<sup>329</sup> Se basa en que estas moléculas reaccionan en presencia de ácidos fuertes generando derivados de furano que condensan con fenol, dando lugar a compuestos de color amarillo detectables por espectroscopía de absorción UV-visible. En este ensayo se mezclaron 100 μL de fenol (3 % en DI) con 100 μL de ficina no modificada o de F-βCD (1 mg mL<sup>-1</sup> en PBS 100 mM, pH 7.5), y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 500 μL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la mezcla. Además, se preparó una curva de calibrado con concentraciones conocidas de βCD (de 20 a 350 μg mL<sup>-1</sup> en DI) y se siguió el mismo procedimiento. Finalmente, se midió la absorbancia (λ<sub>abs</sub> = 490 nm) y se calculó el porcentaje de βCD en F-βCD mediante interpolación en la curva de calibrado.

#### IV.5.3.2 Determinación de la actividad proteasa

La actividad proteolítica de las nanopartículas se determinó mediante un ensayo de degradación de caseína.<sup>330</sup> Para ello, se disolvió 1 g de caseína en 10 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) a 60 °C durante 15 min. Después, se añadió 1 mL de esa disolución a 500 μL de NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>, PBS 100 mM, pH 7.5) y la mezcla se incubó a 40 °C durante 20 min. En ese momento, se añadieron 3 mL de TFA para detener la reacción. A continuación, las muestras se centrifugaron (13.500 rpm, 3 min) y se filtraron (filtro de nailon, 0.22 μm). En último lugar, se midió la concentración de proteína por el método BCA. Este proceso se realizó en las mismas condiciones para las muestras control y los estándares (caseína, ficina, y caseína + ficina libre). La actividad proteasa se calculó aplicando la **Ecuación IV.1**.

$$\text{Actividad ficina (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{A_M - A_B}{pte \cdot t \cdot c}$$

**Ecuación IV.1. Actividad ficina.** Donde A<sub>M</sub> es la absorbancia de la muestra, A<sub>B</sub> es la absorbancia del blanco (λ<sub>abs</sub> = 570 nm), pte es la pendiente de la recta de calibrado, t es el tiempo de incubación con caseína y c es la concentración de la muestra.

### IV.5.4 Caracterización del movimiento de los nanomotores

Para caracterizar el movimiento de NM<sub>CHX-F</sub> primero se confirmó su actividad catalítica mediante el ensayo de actividad peroxidasa descrito en el capítulo III (**Reacción III.1**, **Ecuación III.12**). En segundo lugar, se evaluó su difusión en respuesta a la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante análisis NTA empleando el equipo Nanosight NS300 (Malvern Panalytical), **Sección III.3.2.2**. Para ello, se prepararon soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentraciones de 0 a 0.2 %, v/v) y se introdujeron en la cámara del dispositivo. A continuación, se introdujo la suspensión de NM<sub>CHX-</sub>

se a una concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  y se grabaron 5 vídeos de 30 s de duración a una velocidad de 30 fps. El software NTA 3.0 analizó las coordenadas espaciales de las nanopartículas registradas en los videos y calculó su MSD de forma individual (**Ecuación III.2**). El  $D_{\text{eff}}$  (nanomotores en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el  $D_0$  (nanomotores en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se obtuvo trazando gráficamente MSD frente a  $\Delta t$  (1 s) y aplicando la **Ecuación III.5** mediante un código R de desarrollo propio. Del mismo modo, se obtuvo la representación gráfica de las trayectorias seguidas por las nanopartículas. Estos experimentos se realizaron en PBS (100 mM, pH 7.5) y el análisis se aplicó a una población de 20 nanodispositivos con un tamaño similar al observado por DLS. La difusión de las nanopartículas pasivas,  $\text{MSN}_{\text{CHX-F}}$ , fue analizada por el mismo procedimiento. En tercer lugar, se investigó por DLS el cambio en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en ausencia y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las muestras se dispersaron en DI a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y se sometieron a ultrasonidos y a un pulso de centrifugación (10.000 rpm). Por último, al sobrenadante se adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta alcanzar una concentración final de 0.2 %.

#### IV.5.5 Ensayos de liberación

Con el objetivo de estudiar la capacidad de  $\text{NM}_{\text{CHX-F}}$  para entregar CHX de forma controlada se realizaron ensayos de liberación a diferente pH. En un experimento típico se prepararon 2 suspensiones de  $\text{NM}_{\text{CHX}}/\text{NM}_{\text{CHX-F}}$  a una concentración de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Una de ellas en PBS 100 mM a pH 7.5 y la otra en PBS 100 mM a pH 5. Las mezclas se dispusieron en un agitador (Thermo-shaker HC24N Grant Instruments, 14.000 rpm) a  $37^\circ\text{C}$  y, a los tiempos de 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min, se centrifugaron para eliminar los nanodispositivos (13.500 rpm, 3 min). El sobrenadante resultante se filtró para eliminar los restos de F- $\beta$ CD presentes en el medio (centrifugación a 13.500 rpm durante 3 min en filtros Amicon Ultra-05 de 3kDa). Finalmente, el porcentaje de CHX liberado al medio se determinó mediante espectroscopía UV-visible ( $\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$ ) y el líquido se devolvió al tubo para continuar el ensayo.

##### IV.5.5.1 Determinación de la carga

Para determinar la cantidad de CHX encapsulada en las diferentes nanopartículas se llevaron a cabo ensayos de liberación forzada. En cada caso, se prepararon suspensiones de nanopartículas a una concentración de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en DMSO. A continuación, se agitaron magnéticamente durante 24 h, se centrifugaron (13.500 rpm, 3 min), se filtraron (unidades Amicon Ultra-05 de 3kDa, 13.500 rpm, 3 min) y se midió la absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$ ). La concentración de CHX se obtuvo mediante interpolación en una curva de calibrado de concentraciones conocidas de CHX (de 0 a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  en DMSO).

#### IV.5.6 Ensayos de toxicidad *in vitro*

##### IV.5.6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Los ensayos de toxicidad *in vitro* se realizaron en 2 líneas celulares humanas: fibroblastos pulmonares WI-38 y monocitos THP-1 derivados de un paciente con leucemia. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones que en el capítulo III. La línea WI-38 en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de aminoácidos no esenciales,  $37^\circ\text{C}$ , atmósfera húmeda

con 5 % de CO<sub>2</sub> y pases 2 veces por semana. Las células THP-1 en las mismas condiciones, pero en medio RPMI suplementado con 10 % de FBS.

#### IV.5.6.2 Ensayos de citotoxicidad

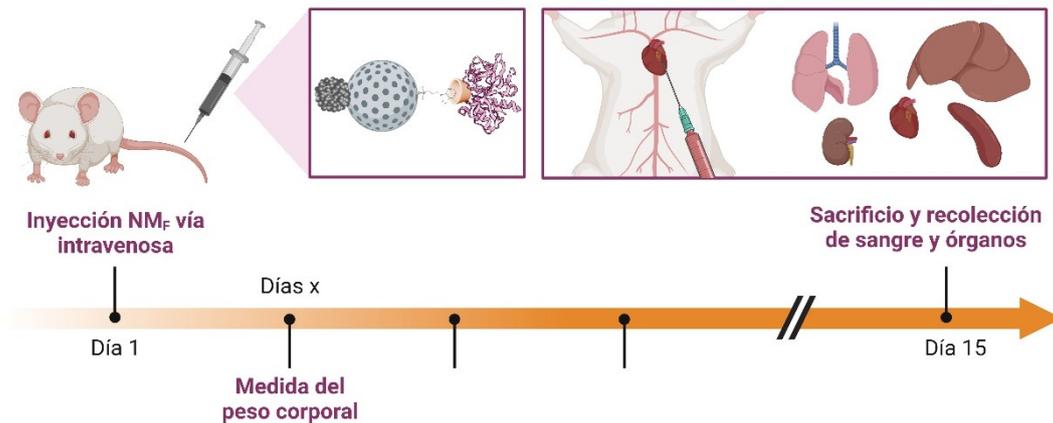
La biocompatibilidad de los nanomotores se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular WST-1. Para ello, las células WI-38 se sembraron a una densidad de 5.500 células pocillo<sup>-1</sup> y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se trataron con NM<sub>F</sub> (concentraciones de 2 a 75 µg mL<sup>-1</sup>) durante 30 min. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado con PBS y las células se mantuvieron en medio fresco durante 48 h. Las células THP-1 se sembraron a una densidad de 10.000 células pocillo<sup>-1</sup> y se trataron con NM<sub>F</sub> (concentraciones de 2 a 75 µg mL<sup>-1</sup>) durante 48 h. En ambos casos se añadieron 10 µL de WST-1 al medio y se registró la absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ nm}$ ) en un lector Perkin Elmer Life Sciences Wallac Victor2<sup>TM</sup> tras 1 h de incubación. El porcentaje de viabilidad celular se calculó aplicando la **Ecuación III.13**.

#### IV.5.7 Ensayos de toxicidad *in vivo*

##### IV.5.7.1 Modelo animal y administración de los nanomotores

Los ensayos de toxicidad *in vivo* se realizaron en ratones hembra Balb/c inmunocompetentes de 5 semanas (cepa Balb/cOlaHsd). Los animales se adquirieron en la casa comercial Envigo y se mantuvieron en las instalaciones del CIPF dentro de jaulas de polietileno ventiladas en una sala con temperatura controlada y condiciones libres de patógenos. Se les administró agua y comida *ad libitum* y se les sometió a ciclos alternos de luz/oscuridad de 12 h de duración. Los animales se trataron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y todos los procedimientos realizados se aprobaron por el Comité de Experimentación Animal del CIPF (2022\_22) y por el Comité Ético de Investigación y Bienestar Animal de la Generalitat Valenciana, Conselleria d'Àgricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural (2023-VSC-PEA-40).

Para la administración de los nanomotores, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos formados por 5 individuos. A uno de ellos, se le administró una única dosis de NM<sub>F</sub> (10 mg kg<sup>-1</sup> en 100 µL de PBS) por vía sanguínea a través de la vena de la cola. Al grupo restante se le inyectó el mismo volumen de PBS (vehículo). Durante los siguientes 15 días se monitorizó el peso corporal de los animales y su bienestar general siguiendo los criterios de la escala de Morton y Griffiths. El día 15 se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardiaca para su posterior análisis hematológico y bioquímico. Finalmente, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se recogieron los principales órganos (pulmones, corazón, riñones, hígado y bazo) para su evaluación histológica (**Figura IV.4**).



**Figura IV.4.** Descripción gráfica de la evaluación de la toxicidad de NM<sub>f</sub> en ratones Balb/c inmunocompetentes.

#### IV.5.7.2 Análisis sanguíneo e histológico

Las muestras de sangre fueron enviadas al Laboratorio Veterinario ACVLAB, donde se realizó un análisis hematológico y bioquímico. Por un lado, el hemograma incluyó el recuento de: leucocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), glóbulos rojos ( $\text{T L}^{-1}$ ), hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ ), hematocrito (%), volumen corpuscular medio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular media (HCM, pg), plaquetas ( $\text{g L}^{-1}$ ), eosinófilos ( $\text{g L}^{-1}$ ), linfocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), monocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), neutrófilos segmentados ( $\text{g L}^{-1}$ ) y neutrófilos cayados ( $\text{g L}^{-1}$ ). Por otro lado, el análisis bioquímico incluyó la determinación de los niveles de: creatinina ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), urea ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), colesterol ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), bilirrubina ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), albúmina ( $\text{g dL}^{-1}$ ) y las proteínas totales ( $\text{mg dL}^{-1}$ ); así como de la actividad de las enzimas: fosfatasa alcalina (FA,  $\text{U L}^{-1}$ ), alanina aminotransferasa (ALT,  $\text{U L}^{-1}$ ) y aspartato aminotransferasa (AST,  $\text{U L}^{-1}$ ).

Los órganos extraídos se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.5) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) durante 1 día a 4 °C. A continuación, se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.5) y se incluyeron en parafina. Las muestras fueron enviadas al Instituto Valenciano de Patología (IPV), quienes llevaron a cabo su procesamiento y tinción. Los órganos se cortaron en microtomo en secciones de 2  $\mu\text{m}$ , se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Por último, las secciones se escanearon en un equipo Leica Aperio Versa 200 con una magnificación de 10 x.

#### IV.5.8 Ensayos antimicrobianos

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Laboratorio del Microbioma Humano de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) y el Departamento de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada (UGR).

##### IV.5.8.1 Modelo *ex vivo* de biopelículas polimicrobianas orales derivadas de saliva

###### - *Formación de las biopelículas orales y administración de los tratamientos*

Para evaluar el efecto de los nanomotores sobre las biopelículas orales, se recogieron muestras de saliva de 5 donantes sanos que no presentaban enfermedad periodontal ni lesiones de caries activas. Las biopelículas derivadas de saliva se cultivaron en medio BHI suplementado

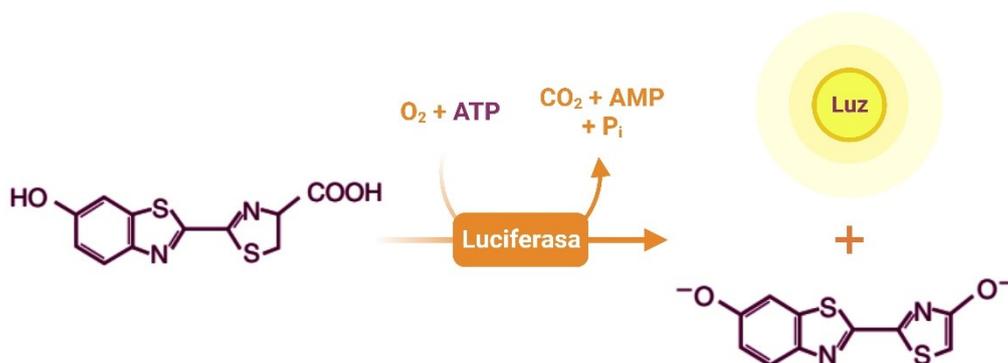
con 2 mL L<sup>-1</sup> de vitamina K1, 5 mg L<sup>-1</sup> de hemina y 1 mg L<sup>-1</sup> de vitamina K3. Para ello, se mezclaron 150 µL de este medio con 150 µL de la saliva de cada donante en placas de fondo plano de 96 pocillos 89626. A continuación, se cultivaron a 37 °C durante 24 h para formar las biopelículas. Una vez establecidas, las biopelículas se cultivaron durante otras 24 h en presencia de los distintos tratamientos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %), CHX (0.02 %), NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %) y el nanodispositivo desensamblado + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %) (NE, concentraciones equivalentes a 1 mg mL<sup>-1</sup> de NM<sub>CHX-F</sub>). Finalmente, se desechó el sobrenadante del cultivo y las células incrustadas en la biopelícula se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.4).

- **Evaluación de la biomasa de las biopelículas: tinción con cristal violeta**

Para cuantificar la biomasa adherida, las biopelículas se sometieron a tinción con cristal violeta (CV) (0.1 %, v/v) durante 20 min. La solución de CV se retiró tras el periodo de tinción y las biopelículas se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.4) para eliminar las células no adheridas y cualquier resto de CV. A continuación, las células se suspendieron en 300 µL de ácido acético glacial (30 %, v/v). Tras este paso, se cuantificó la densidad óptica del CV liberado ( $\lambda_{\text{abs}} = 610 \text{ nm}$ ) utilizando un lector de placas Infinite M200 de Tecan. El experimento incluyó 4 réplicas técnicas para cada condición, así como los correspondientes controles negativos.

- **Evaluación de la viabilidad celular: medidas de ATP**

Para cuantificar el número de células viables presentes en las biopelículas, se realizaron medidas del ATP presente empleando el kit de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™. Para ello, se recogieron los sobrenadantes y las biopelículas por separado en tubos estériles. Seguidamente, se añadieron 15 µL de éstos y 85 µL de PBS (100 mM, pH 7.4) en placas de fondo transparente de 96 pocillos (por duplicado para cada condición). A continuación, se añadieron 100 µL de reactivo BacTiter-Glo™ y la placa se agitó cuidadosamente durante 5 min en un agitador orbital a temperatura ambiente para facilitar la distribución del reactivo. Tras la incubación, se midió la luminiscencia ( $\lambda_{\text{abs}} = 610 \text{ nm}$ ) en un lector de microplacas Infinite M200 de Tecan. En este ensayo, la señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (**Reacción IV.1**), que a su vez es directamente proporcional al número de células microbianas viables en el cultivo. El porcentaje de viabilidad celular se expresó con respecto al control no tratado (**Ecuación III.13**).



**Reacción IV.1. Fundamento de la determinación de los niveles de ATP mediante el kit BacTiter-Glo™.**

La luciferasa cataliza transformación de luciferina a oxiluciferina en presencia de ATP, generando luminiscencia.

#### IV.5.8.2 Modelo *ex vivo* de biopelículas endodónticas de *Streptococcus mutans* crecidas sobre dentina

##### - *Formación de las biopelículas endodónticas y administración de los tratamientos*

Los bloques de dentina se obtuvieron de dientes humanos no cariosos recién extraídos. Se pulieron (con papeles SiC de grano 500-800), se les eliminó la capa residual dentinaria (con EDTA al 17 % durante 4 min), se esterilizaron en autoclave y se conservaron en solución salina estéril a 4 °C. Las dimensiones de los bloques de dentina fueron de  $2 \times 2 \times 1.2$  mm.<sup>331,332</sup> El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética institucional de la UGR. En estos experimentos se empleó la cepa de referencia *Streptococcus mutans* 25175 (adquirida en la ATCC). Para establecer las biopelículas endodónticas sobre los bloques de dentina, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> en medio BHI. A continuación, cada bloque de dentina se expuso a 200  $\mu$ L de la suspensión bacteriana durante 1 semana en condiciones de anaerobiosis. Durante ese tiempo, el medio se cambió cada 2-3 días. Posteriormente, los bloques de dentina se lavaron en una solución salina y se procedió a la administración de los tratamientos. Para ello, se añadieron 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %), CHX (0.02 %), NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %) o NE + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %) (a concentraciones equivalentes a 1 mg mL<sup>-1</sup> de NM<sub>CHX-F</sub>) y se incubaron durante el tiempo estipulado (1 y 5 min).

##### - *Evaluación de la viabilidad celular: recuento de unidades formadoras de colonias (CFU), medidas de ATP y microscopía confocal láser de barrido (CLSM)*

La actividad antimicrobiana de los tratamientos se determinó mediante 3 métodos: recuento de CFUs, medidas de ATP y CLSM. Para el recuento de CFU, los bloques de dentina se introdujeron en tubos con solución salina y se agitaron en vórtex para permitir la recuperación de la biopelícula en la solución. A continuación, la biopelícula recuperada se diluyó en serie ( $10^1 - 10^5$ ). 10  $\mu$ L de cada dilución se dispusieron en placas con medio agar BHI y se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 24 h a 37 °C. Tras este periodo, se contaron las colonias y se calculó el número de CFU mL<sup>-1</sup>. Finalmente, éste se expresó en escala logarítmica.

Para las medidas de ATP se empleó el kit de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™ (Reacción IV.1). En particular, se añadieron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana recuperada a 100  $\mu$ L del reactivo BacTiter-Glo™ en una placa negra de 96 pocillos y la mezcla se incubó durante 5 min. La luminiscencia producida ( $\lambda_{\text{abs}} = 610$  nm) se midió con un lector de microplacas GloMax de Promega. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de reducción con respecto al control no tratado (Ecuación III.13).

Por último, la viabilidad de *S. mutans* también se determinó mediante CLSM. Para ello, se empleó el kit «LIVE/DEAD», en el cual las células viables se tiñen con SYTO9 (color verde) y las células no viables con yoduro de propidio (color rojo). Esta sustancia sólo es capaz de alcanzar los núcleos celulares si la membrana plasmática se encuentra dañada, lo cual es un indicativo de muerte celular. Las imágenes de CLSM se obtuvieron en un microscopio Nikon Eclipse Ti-E (40 aumentos). Cada una de ellas representa un área de  $317 \times 317$   $\mu$ m situada a una profundidad de 5-10  $\mu$ m con respecto al nivel subsuperficial de la estructura dentinaria.<sup>333,334</sup>

#### IV.5.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 9.0.2. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) se aplicó la prueba de la T o la ANOVA de una vía seguido por la prueba post-hoc de Turkey o la comparación múltiple de Dunnett. Los valores representan la media  $\pm$  SEM o SD de al menos 2 experimentos independientes. Excepto en el ensayo *in vivo*, en el que se realizó un único experimento representativo con 5 ratones por grupo (vehículo y NM<sub>ε</sub>), asignados de forma aleatoria.

## IV.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor

En vista a lograr el objetivo propuesto, favorecer la entrega de agentes antimicrobianos a través de la ECM de las biopelículas bacterianas, se decidió emplear NM como plataforma. Esta elección se debe a las funcionalidades que presenta (validadas en el capítulo III): difusividad mejorada en respuesta a la catálisis de  $H_2O_2$ , capacidad de portar sustancias en su sistema de canales y posibilidad de funcionalización superficial con entidades moleculares. Así, se optó por cargar CHX en los mesoporos de la cara de MSN porque es uno de los antisépticos orales de amplio espectro más usados en terapia odontológica.<sup>335</sup> Como puerta molecular se escogió una nanoválvula sensible a cambios en el pH ya que, en general, la zona interna de las biopelículas bacterianas presenta pH ácido.<sup>336</sup> La nanoválvula está compuesta por un complejo de inclusión establecido entre grupos BNZ y  $\beta$ CDs. Además, las  $\beta$ CDs están unidas covalentemente a la enzima proteolítica ficina puesto que, al hidrolizar la parte proteica de la ECM y los enlaces que unen las células bacterianas a ésta, las proteasas son una de las enzimas más eficaces para la erradicación de las biopelículas.<sup>337,338</sup>

Esperamos que la combinación de autopropulsión y degradación de la ECM resulte en una penetración incrementada de  $NM_{CHX-F}$  en las biopelículas, y que la liberación específica de CHX en su interior induzca la muerte de las células patógenas alojadas en ellas, con el objetivo de eliminar las infecciones endodónticas.

En la **Figura IV.5** se resume el proceso de síntesis de  $NM_{CHX-F}$ :

- i. Se partió de la plataforma inorgánica NM, sintetizada por emulsión de Pickering a partir de Pt y MSNs (**Figuras III.4, III.5 y III.6**).
- ii. La cara de MSN se funcionalizó con (3-yodopropil) trimetoxisilano.
- iii. Se añadieron grupos BNZ a la cara de MSN (previamente modificada con grupos yodopropil) para la sucesiva formación de complejos de inclusión con F- $\beta$ CD.
- iv. Los mesoporos de la cara de MSN se cargaron con CHX.
- v. En último lugar, se añadió F- $\beta$ CD para establecer, junto a los grupos BNZ, la nanoválvula molecular sensible a pH ácido que constituye la puerta molecular (BNZ-F- $\beta$ CD).

Todas las nanopartículas empleadas en este capítulo se ilustran en la **Tabla IV.2**.

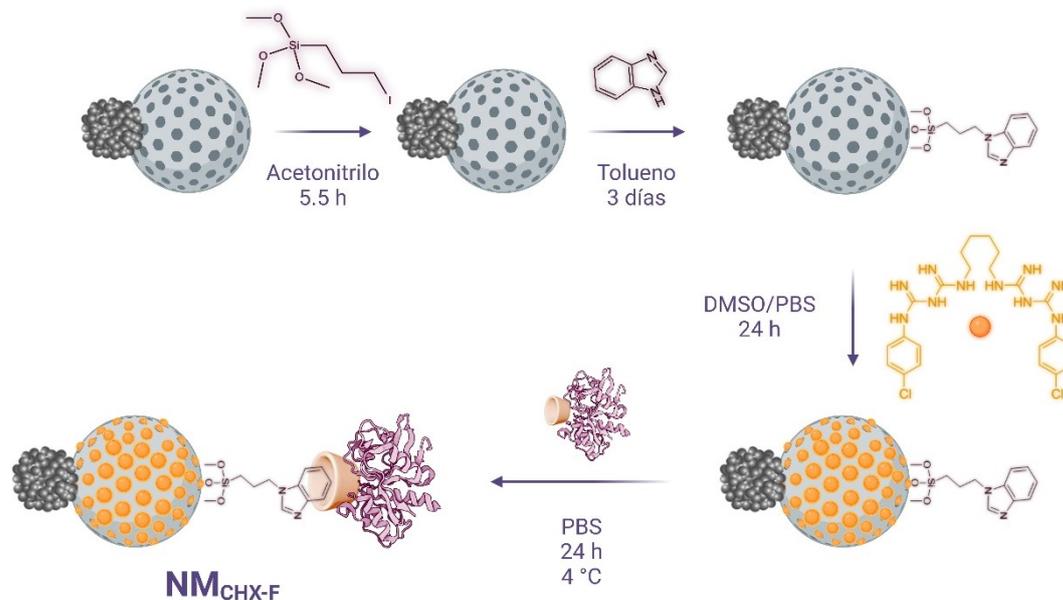


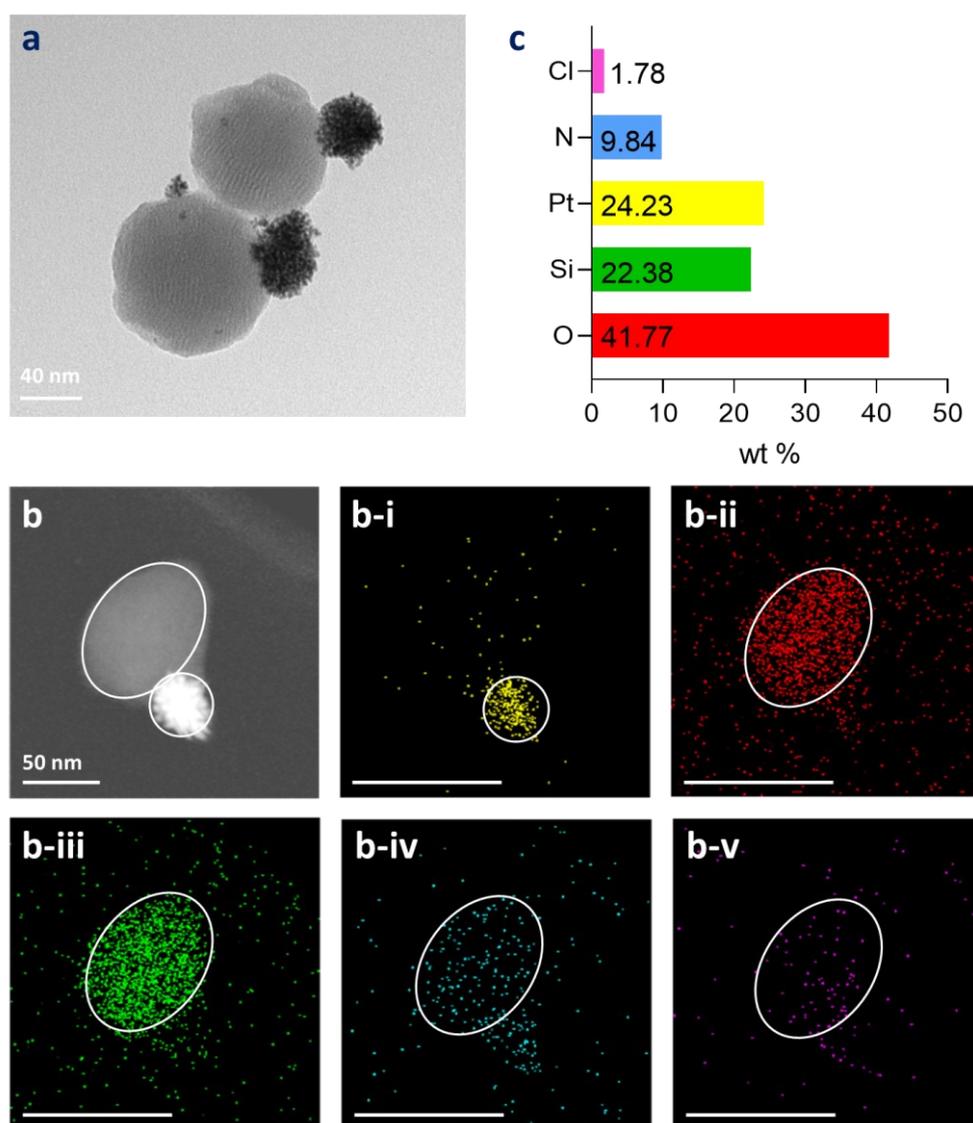
Figura IV.5. Ilustración esquemática de la síntesis de **NM<sub>CHX-F</sub>**.

Tabla IV.2. Resumen de las nanopartículas empleadas en el capítulo IV.

NANOPARTÍCULA	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
	<b>NM</b>	Nanomotor Janus Pt-MSN formado por la conjunción anisotrópica de Pt y MSN. Muestra autopropulsión por la catálisis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
	<b>NM<sub>CHX-F</sub></b>	<b>Nanomotor final:</b> NM cargado con CHX y funcionalizado con F-βCD. Muestra autopropulsión por la catálisis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , actividad proteolítica y liberación controlada de CHX en respuesta a pH ácido.
	<b>NM<sub>CHX</sub></b>	Nanomotor control: NM cargado con CHX y funcionalizado con BNZ. <b>Sin F-βCD.</b> Muestra liberación incontrolada de CHX.
	<b>NM<sub>CHX-βCD</sub></b>	Nanomotor control: NM cargado con CHX y funcionalizado con βCD. <b>Sin ficina.</b> Muestra autopropulsión y liberación de CHX, pero no actividad proteolítica.
	<b>NM<sub>F</sub></b>	Nanomotor control: NM funcionalizado con F-βCD. <b>No cargado con CLX.</b> Muestra autopropulsión y actividad proteolítica, pero no liberación del antiséptico.
	<b>MSN<sub>CHX-F</sub></b>	Nanopartícula control: MSN cargada con CHX y funcionalizada con F-βCD. <b>Sin Pt.</b> Muestra actividad proteolítica y liberación de CHX, pero no autopropulsión.
	<b>NE</b>	Control formado por todos los elementos que conforman <b>NM<sub>CHX-F</sub></b> , pero <b>no ensamblados.</b>

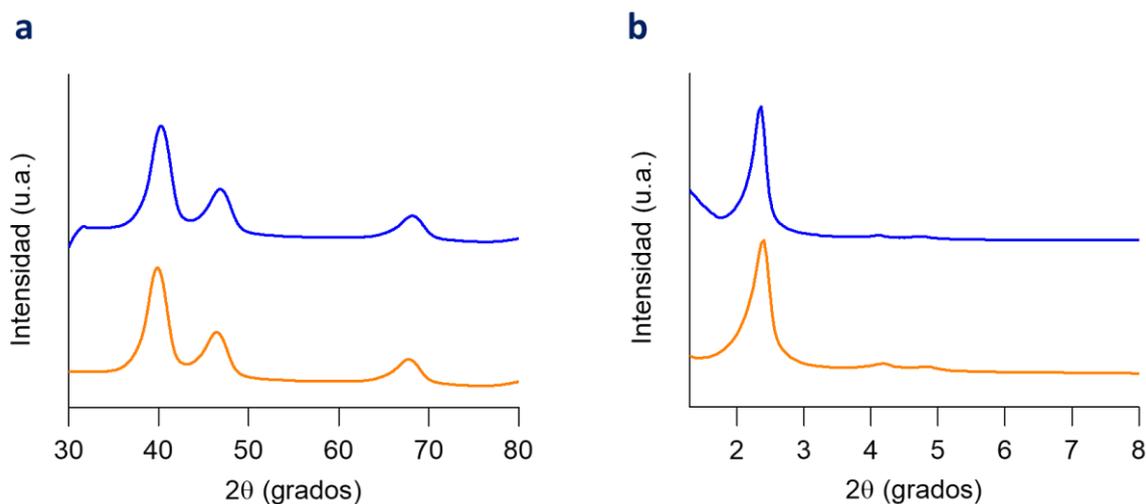
#### IV.6.2 Caracterización estructural del nanomotor

El nanomotor final  $NM_{CHX-F}$  fue caracterizado mediante técnicas habituales de caracterización de nanomateriales. Primero, se tomaron imágenes de  $NM_{CHX-F}$  por HR-TEM y se analizaron por STEM-EDX. Los resultados, mostrados en la **Figura IV.6**, indican que el nanomotor presenta la estructura de «muñeco de nieve» esperada, con caras opuestas de Pt y MSN. Asimismo, se pueden observar las nanodendritas de Pt, así como la estructura mesoporosa de la MSN (**a**). En cuanto a la composición del nanomotor (**b-c**), se observan los elementos característicos de NM: Pt (**amarillo**, 24.23 wt %), O (**rojo**, 41.77 wt %) y Si (**verde**, 22.38 wt %). Además, también se detectan átomos de N (**azul**, 9.84 wt %), atribuidos a la funcionalización con la enzima que constituye la puerta molecular y átomos de Cl (**rosa**, 1.78 wt %), atribuidos a la CHX encapsulada en los poros.



**Figura IV.6. Caracterización de  $NM_{CHX-F}$  por microscopía. a** Imagen HR-TEM. **b** Análisis por STEM-EDX (**b-i** Pt, amarillo. **b-ii** O, rojo. **b-iii** Si, verde. **b-iv** N, azul. **b-v** Cl, rosa. Barra de escala = 100 nm). **c** Composición atómica en wt %.

Los espectros de PXRD confirman los resultados de HR-TEM (**Figura IV.7**).  $NM_{CHX-F}$  presenta los picos de Bragg a ángulos altos característicos de las nanopartículas de Pt, indexados como planos (111), (200) y (220) (**a**). Además, el espectro a ángulos bajos revela el típico pico de difracción a  $2.4^\circ$ , indexado como plano (100), así como 2 picos minoritarios a aproximadamente  $4.2^\circ$  y  $4.8^\circ$ , correspondientes a los planos (110) y (200). Todos ellos son relativos a la estructura mesoporosa de tipo MCM-41 (**b**).



**Figura IV.7. Difractogramas de PXRD de los nanomotores. a** Ángulos altos. **b** Ángulos bajos. NM: azul,  $NM_{CHX-F}$ : naranja.

Para demostrar que los procesos de carga y funcionalización se llevaron a cabo de forma adecuada, NM y  $NM_{CHX-F}$  se sometieron a diferentes estudios (**Figuras IV.8-11**). La isoterma de adsorción-desorción de  $N_2$  de NM (**Figura IV.8, azul**) muestra un paso de adsorción en valores intermedios de  $P/P_0$  ( $0.1 < P/P_0 < 0.3$ ), atribuido a la condensación del gas en el interior del ordenamiento mesoporoso. En el caso de  $NM_{CHX-F}$  (**Figura IV.8, naranja**) ese paso está ausente, lo cual revela una drástica reducción en el volumen de gas adsorbido debido al cargado y bloqueo de los poros. Los resultados de la aplicación de los modelos BJH y BET a los datos de estas isotermas se recogen en la **Tabla IV.3**. El volumen de poro se redujo desde  $0.3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  en NM hasta casi 0 en  $NM_{CHX-F}$  y el área superficial desde  $551 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  hasta  $5.8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

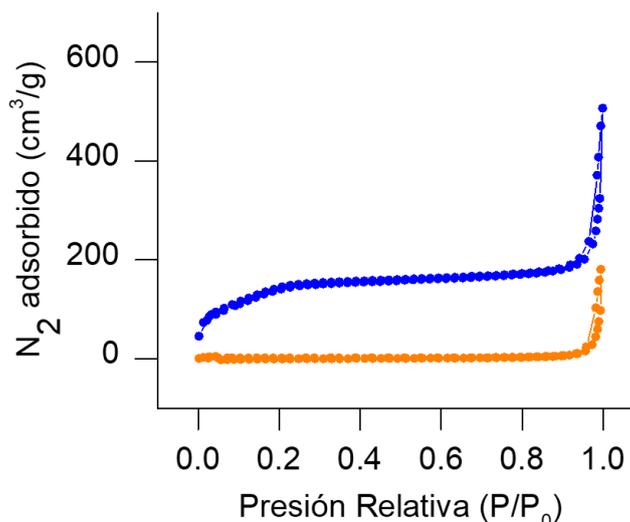


Figura IV.8. Isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$ . NM: azul,  $NM_{CHX-F}$ : naranja.

Tabla IV.3. Diámetro de poro, volumen de poro y superficie específica de MSN, NM y  $NM_{CHX-F}$ . Calculados aplicando los modelos BJH y BET a las isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$ .

NANOPARTÍCULA	DIÁMETRO PORO (BJH, nm)	VOLUMEN PORO (BJH, $cm^3 g^{-1}$ )	SUPERFICIE ESPECÍFICA ( $S_g$ ) (BET, $m^2 g^{-1}$ )
MSN	2.2	1	1085
NM	2.2	0.3	551
$NM_{CHX-F}$	-	-	5.8

El espectro FTIR de  $NM_{CHX-F}$  (Figura IV.9, naranja) muestra bandas de absorción a 806, 946 y 1066 (con un hombro a 1242)  $cm^{-1}$ , que también están presentes en NM (Figura IV.9, azul). Se atribuyen a los tetraedros de  $SiO_4$ , grupos Si-OH y enlaces Si-O-Si de los nanomateriales silíceos. No obstante, el espectro de  $NM_{CHX-F}$  también muestra una banda ancha a 1060  $cm^{-1}$ , correspondiente al oligosacárido cíclico  $\beta$ -CD; una banda a 1651  $cm^{-1}$ , correspondiente a los enlaces amida de tipo I de la ficina; y una banda a 2945  $cm^{-1}$ , que se atribuye al estiramiento de los grupos  $CH_2$  de la enzima. Estos resultados confirman la presencia de la puerta molecular en el nanomotor final.

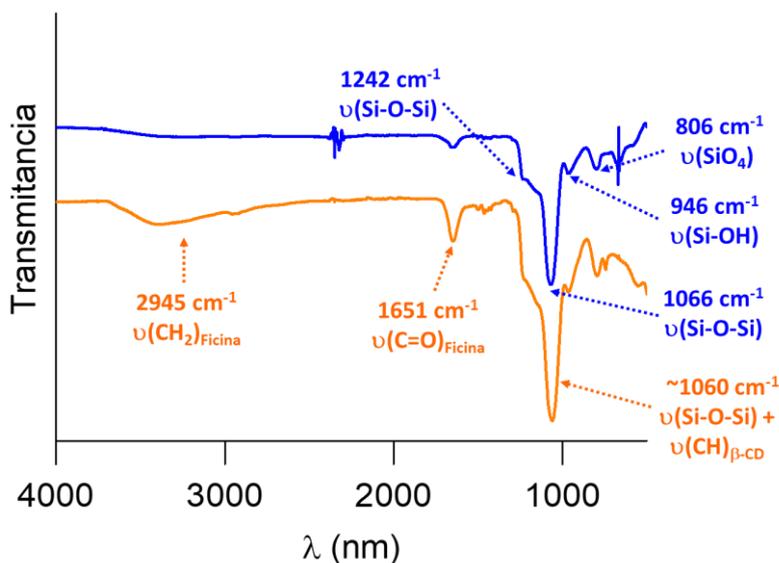


Figura IV.9. Espectros FTIR. NM: azul, NM<sub>CHX-F</sub>: naranja.

Adicionalmente, el contenido de F- $\beta$ CD en NM<sub>CHX-F</sub> se cuantificó por TGA (Figura IV.10, naranja). La cantidad asciende a 18.6  $\mu$ g por mg de sólido. La cantidad de  $\beta$ CD en F- $\beta$ CD se calculó en un 4 wt% por el método del ácido fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos. Además, mediante TGA la cantidad de CHX cargada se cuantificó en 106  $\mu$ g mg sólido<sup>-1</sup>.

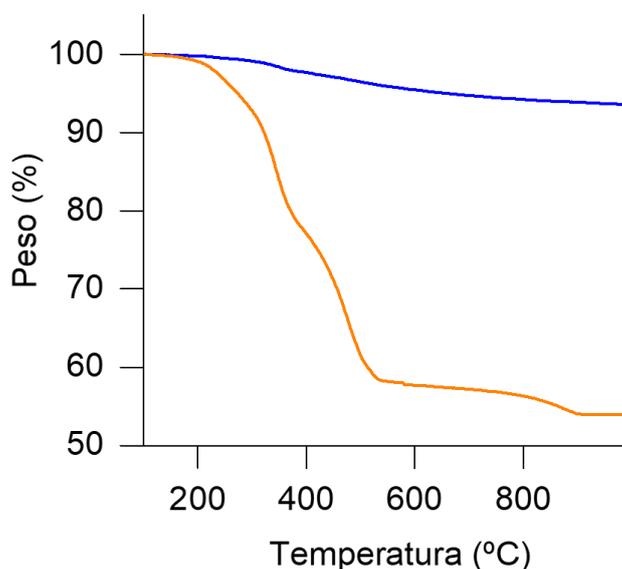
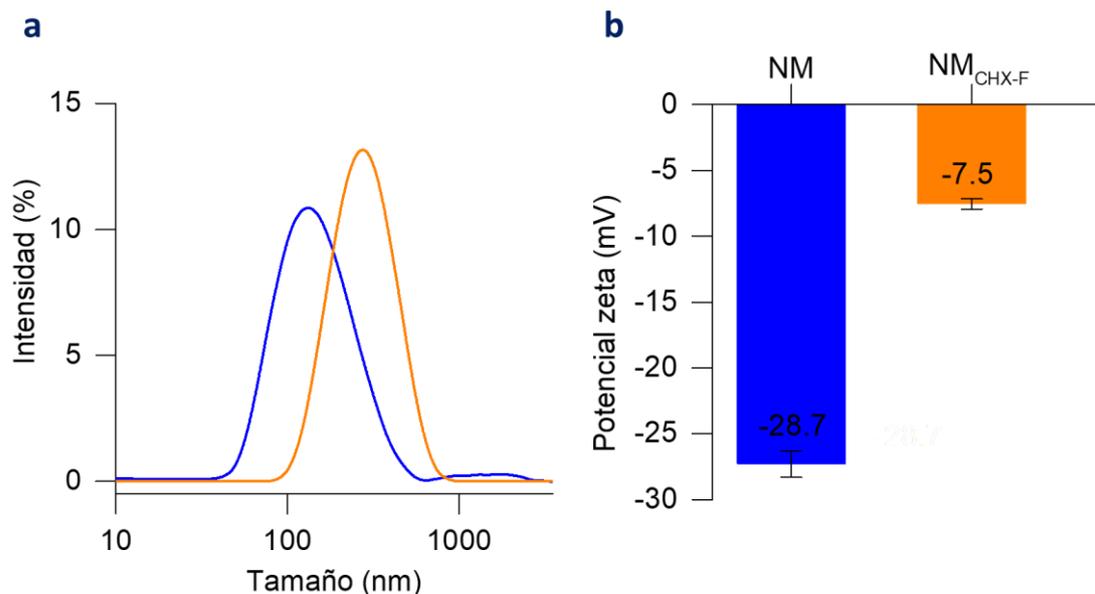


Figura IV.10. Análisis TGA. NM: azul, NM<sub>CHX-F</sub>: naranja.

La construcción del nanomotor final también se estudió por DLS (Figura IV.11). El diámetro hidrodinámico medio aumentó desde  $221 \pm 4$  nm en NM (a, azul) hasta alcanzar un tamaño final de  $383 \pm 7$  nm en NM<sub>CHX-F</sub> (a, naranja). Del mismo modo, la carga superficial se incrementó de -28.7 mV en NM (b, azul) a -7.5 mV en NM<sub>CHX-F</sub> (b, naranja). Este cambio está debido a la presencia de F- $\beta$ CD, que tiene un punto isoeléctrico (PI) de 9 y, por tanto, está cargada positivamente a pH neutro.<sup>339</sup> Ambos resultados indican el éxito de los procesos de funcionalización de la superficie de NM con la puerta molecular.

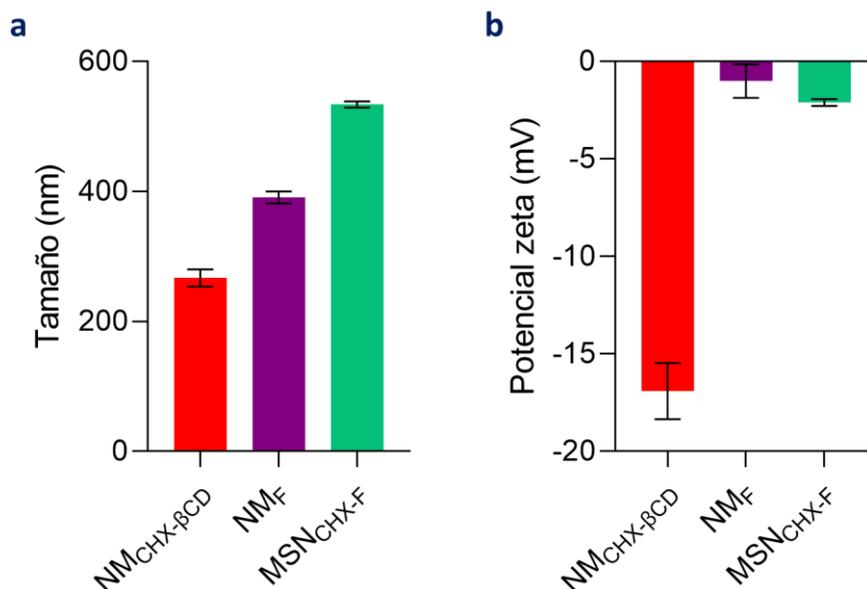


**Figura IV.11. Caracterización de NM<sub>CHX-F</sub> por DLS. a** Diámetro hidrodinámico (nm). **b** Potencial zeta (mV). NM: azul, NM<sub>CHX-F</sub>: naranja.

Asimismo, las distintas nanopartículas control sintetizadas (NM<sub>CHX-βCD</sub>, NM<sub>F</sub> y MSN<sub>CHX-F</sub>) también se caracterizaron por TGA y DLS (Tabla IV.4 y Figura IV.12). La cantidad de puerta molecular en los nanodispositivos control (βCD o F-βCD) es comparable a la obtenida para el nanomotor final (18.6 μg mg sólido<sup>-1</sup>). En cuanto al diámetro hidrodinámico medio, NM<sub>CHX-βCD</sub> presenta un valor menor debido a la ausencia de la enzima (βCD). En cambio, MSN<sub>CHX-F</sub> presenta un valor mayor debido a la funcionalización con la voluminosa puerta molecular por toda su superficie (ausencia de cara de Pt). El tamaño de NM<sub>F</sub> es similar al del nanodispositivo final (383 ± 7 nm). En cuanto a la carga superficial, todos los nanomateriales presentan valores de potencial zeta negativos, especialmente NM<sub>CHX-βCD</sub> debido a la ausencia de ficina (PI = 9, carga positiva).

**Tabla IV.4. Resumen de la caracterización de los nanodispositivos control.** Cantidad de puerta molecular determinada por TGA. Tamaño y carga superficial determinados por DLS.

NANOPARTÍCULA	PUERTA MOLECULAR (TGA, μg mg <sup>-1</sup> )	TAMAÑO (DLS, nm)	POTENCIAL ZETA (DLS, mV)
NM <sub>CHX-βCD</sub>	16.6	267 ± 23	- 16.9
NM <sub>F</sub>	19.8	391 ± 16	- 1
MSN <sub>CHX-F</sub>	10.2	534 ± 8	- 2.1



**Figura IV.12. Caracterización de la funcionalización de las nanopartículas control por DLS.** a) Diámetro hidrodinámico (nm). b) Potencial zeta (mV). NM<sub>CHX-βCD</sub> (rojo), NM<sub>F</sub> (morado) y MSN<sub>CHX-F</sub> (verde).

En resumen, los resultados de caracterización proporcionados por las diferentes técnicas confirman que: (i) la plataforma inorgánica de partida fue sintetizada correctamente; (ii) los procesos de cargado con CHX y funcionalización con F-βCD no perjudicaron a la estructura de NM; (iii) el nanomotor final NM<sub>CHX-F</sub> mostró la nanoarquitectura y composición deseadas; y (iv) los distintos nanodispositivos control privados de alguno de los elementos fundamentales fueron sintetizados satisfactoriamente.

### IV.6.3 Caracterización funcional del nanomotor

Según nuestra hipótesis, NM<sub>CHX-F</sub> ha de exhibir una triple funcionalidad: actividad proteasa, autopropulsión y liberación controlada de CHX. La primera de ellas se confirmó mediante un ensayo de actividad proteasa frente a caseína (una proteína modelo), con un resultado de  $1.02 \cdot 10^{-5}$  U mg de NM<sub>CHX-F</sub><sup>-1</sup> (Ecuación IV.1). La confirmación de las siguientes habilidades se describe a continuación.

#### IV.6.3.1 NM<sub>CHX-F</sub> se autopropulsa por la descomposición catalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En cuanto al movimiento de NM<sub>CHX-F</sub>, se espera que se comporte de forma similar a NM, descomponiendo catalíticamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y ½ O<sub>2</sub> (g) en la cara de Pt. En la Figura IV.13 se representa el mecanismo de propulsión esperado. Para caracterizarlo se siguieron los protocolos experimentales descritos en la Sección IV.5.4.

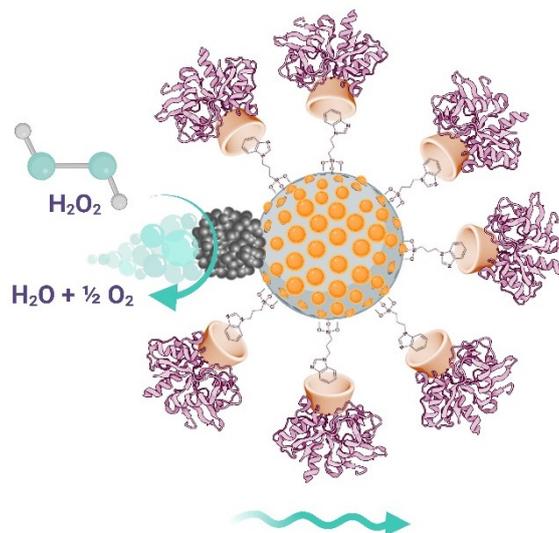


Figura IV.13. Mecanismo de propulsión de  $NM_{CHX-F}$ .

En primer lugar, se evaluó la actividad peroxidasa de la cara de Pt de  $NM_{CHX-F}$ . Como se observa en la **Figura IV.14**, la gráfica de velocidad de reacción muestra una cinética tipo Michaelis-Menten (**a**). Además, mediante el gráfico de Lineweaver-Burk (**b**) y la aplicación de la **Ecuación III.12**, se extrajeron los parámetros cinéticos que definen el comportamiento «enzimático» del nanomotor.  $NM_{CHX-F}$  presenta una  $V_{max}$  de  $6.99 \mu M \text{ min}^{-1}$  y una  $K_M$  de  $14.95 \text{ mM}$  para la catálisis de  $H_2O_2$ .

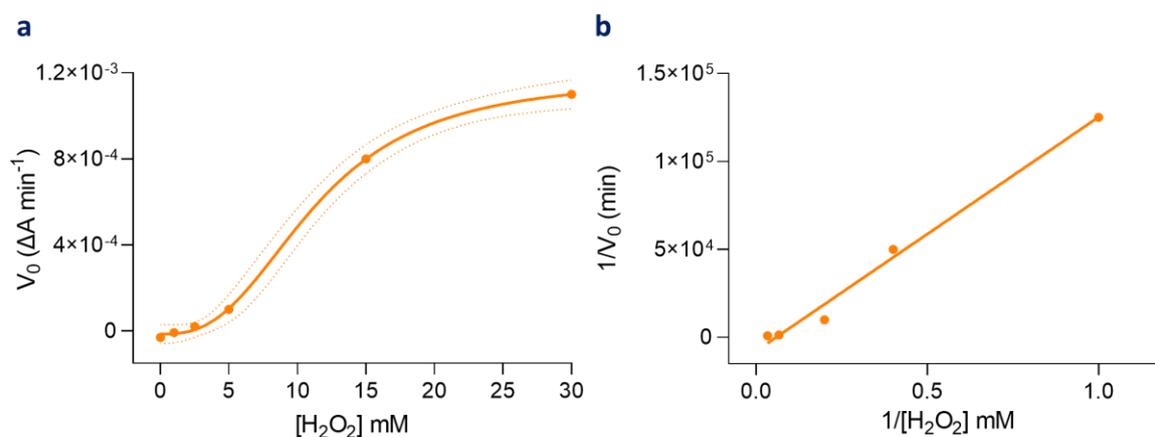
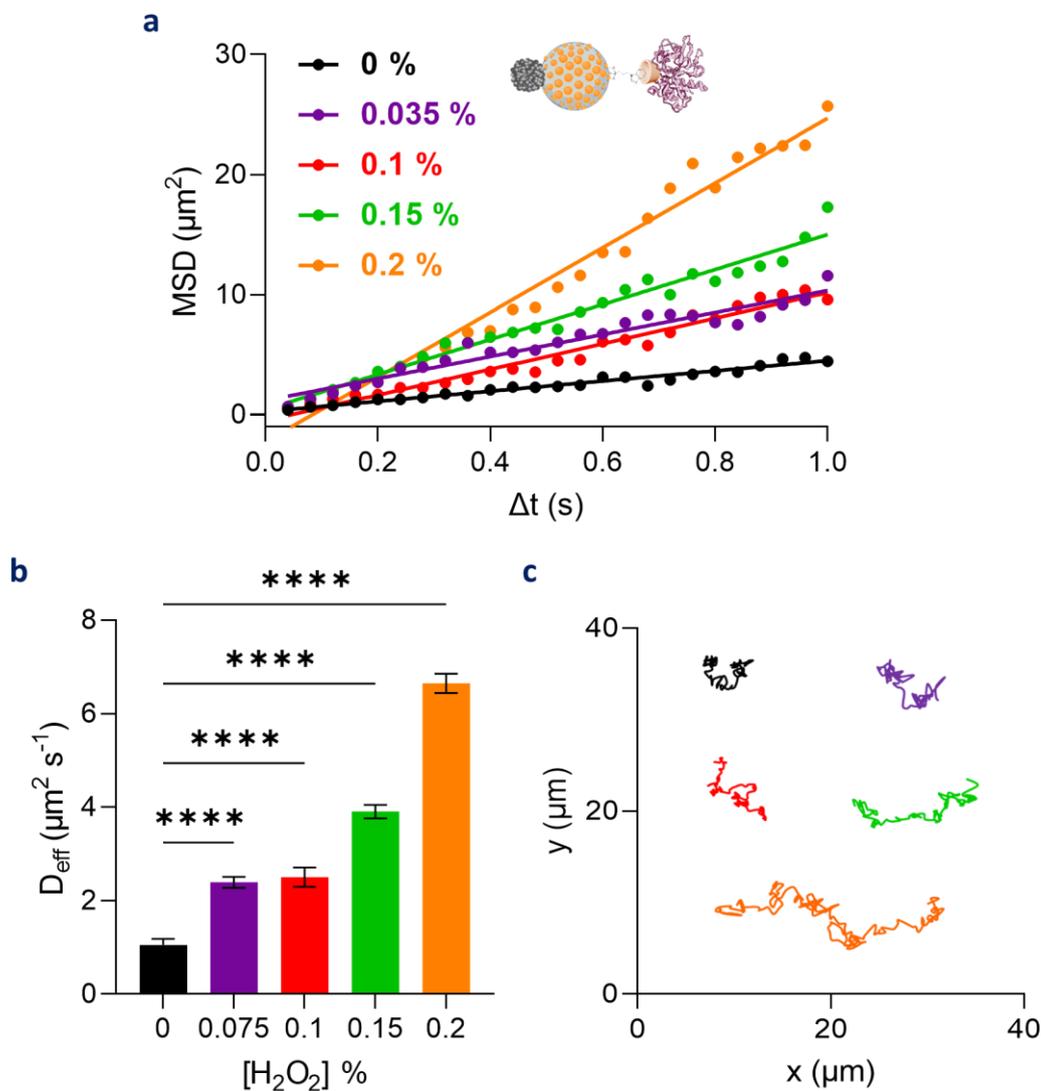


Figura IV.14. Actividad peroxidasa de  $NM_{CHX-F}$ . **a** Efecto de variar la concentración de  $H_2O_2$  sobre la velocidad de reacción para una concentración fija de ABTS (9 mM). **b** Gráfico de Lineweaver-Burk empleado para determinar  $K_M$  y  $V_{max}$ , aplicando la **Ecuación III.12**.

A continuación, se procedió a investigar la autopropulsión de  $NM_{CHX-F}$  en respuesta a su actividad peroxidasa mediante diferentes técnicas. Primero, se caracterizó mediante análisis NTA. En la **Figura IV.15** y la **Tabla IV.5** se resumen los resultados obtenidos. Como se puede observar, el MSD (**Ecuación III.2**) presenta una correlación lineal con  $\Delta t$  en todas las concentraciones de  $H_2O_2$  evaluadas (**a**). Además, los coeficientes de difusión obtenidos (**Ecuación III.5**) revelan un aumento en la difusión dependiente de la concentración de combustible (**b**).  $NM_{CHX-F}$  en ausencia de  $H_2O_2$  muestra un valor de  $D_0$  de  $1.06 \pm 0.12 \mu m^2 s^{-1}$ , el cual se aproxima al valor teórico ( $1.1 \mu m^2 s^{-1}$ ) para nanopartículas de esas dimensiones (383 nm,

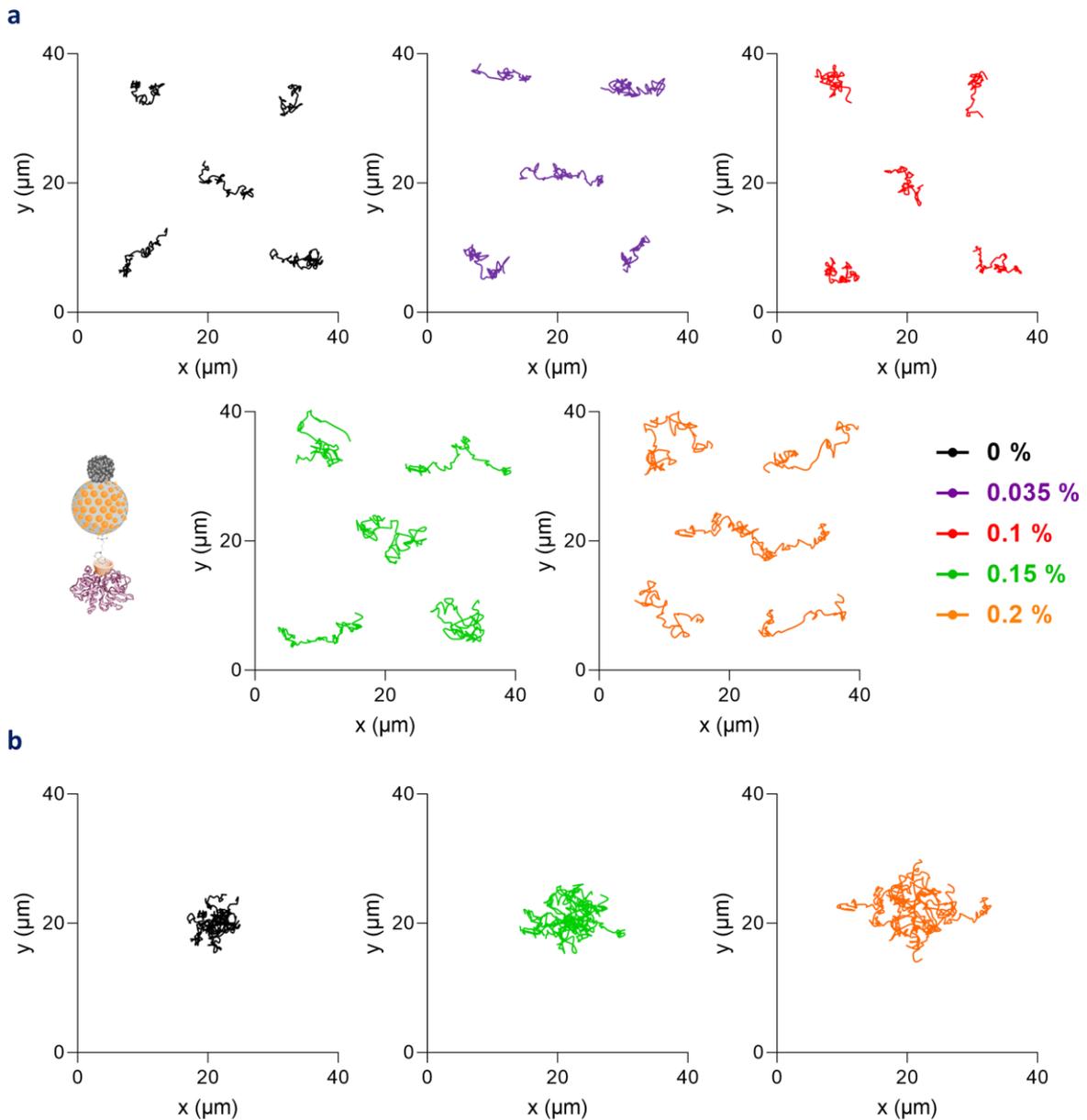
**Ecuación I.2).** En cambio, el  $D_{\text{eff}}$  se incrementa desde  $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 0.075 % hasta  $6.6 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 0.2 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las trayectorias de los nanomotores propulsados en comparación con las trayectorias de los nanomotores sin propulsión (en PBS) también confirman este aumento difusivo (c y Figura IV.16).



**Figura IV.15. Caracterización del movimiento de  $\text{NM}_{\text{CHX-F}}$  por NTA. a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$ , calculados a partir de la Ecuación III.5. **c** Trayectorias representativas a todas las concentraciones de combustible testadas.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0$ , negro; 0.075, morado; 0.1, rojo; 0.15, verde; y 0.2 % (v/v), naranja. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 20 nanomotores. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

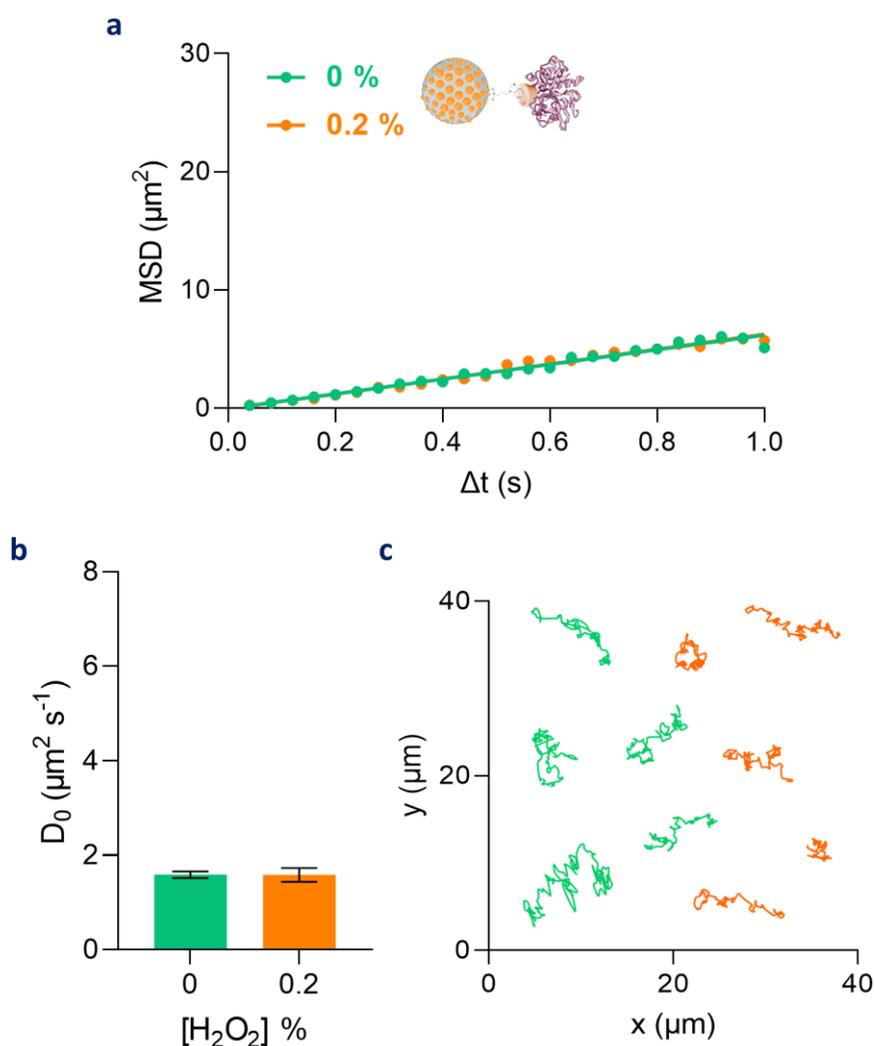
**Tabla IV.5. Resumen de los parámetros que definen el movimiento de  $NM_{CHX-F}$ .** Calculados a partir del análisis NTA. El  $\tau_r$  de estos nanomotores es de 43 ms (**Ecuación III.3**).

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] % (v/v)	$D_0/D_{eff}$ ( $\mu m^2 s^{-1}$ )
0	$1.1 \pm 0.1$
0.075	$2.4 \pm 0.1$
0.1	$2.5 \pm 0.2$
0.15	$3.9 \pm 0.1$
0.2	$6.6 \pm 0.2$



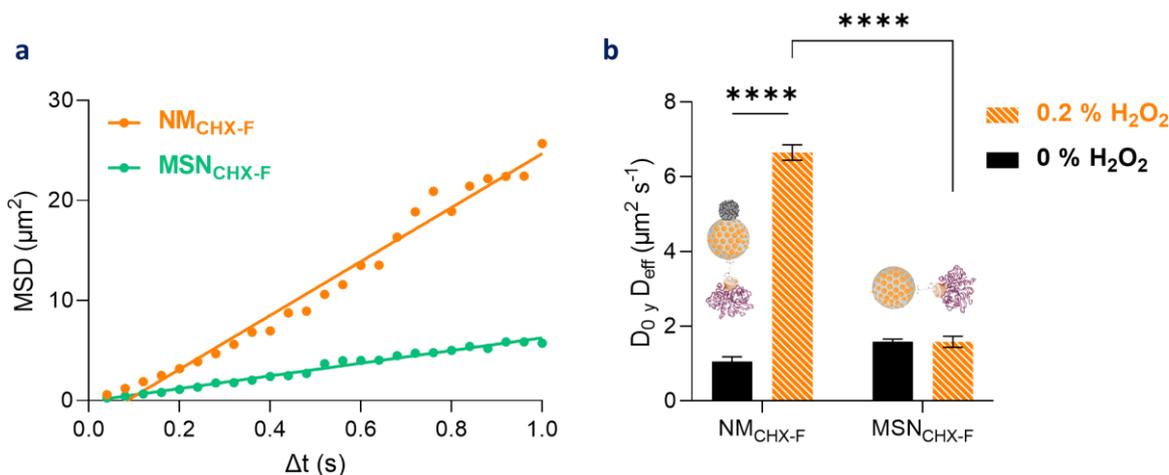
**Figura IV.16. Trayectorias seguidas por  $NM_{CHX-F}$ .** **a** En presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0, negro; 0.075, morado; 0.1, rojo; 0.15, verde; 0.2 % (v/v), naranja. **b** Comparación del alcance de las trayectorias a 0, 0.15 y 0.2 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. n= 5 nanomotores representativos.

Adicionalmente, se caracterizó el movimiento de las nanopartículas control que carecen de Pt y, por tanto, de actividad peroxidasa ( $\text{MSN}_{\text{CHX-F}}$ ). El análisis por NTA de  $\text{MSN}_{\text{CHX-F}}$  llevado a cabo se muestra en la **Figura IV.17**. No se aprecia un aumento significativo en la pendiente del MSD (**a**), en el  $D_0$  (**b**, en ambos casos con un valor de  $1.5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) ni en la longitud de las trayectorias seguidas por las nanopartículas (**c**). Así pues, se confirma la necesidad de contar un elemento catalítico distribuido de forma asimétrica para que las nanopartículas sean capaces de exhibir autopropulsión.



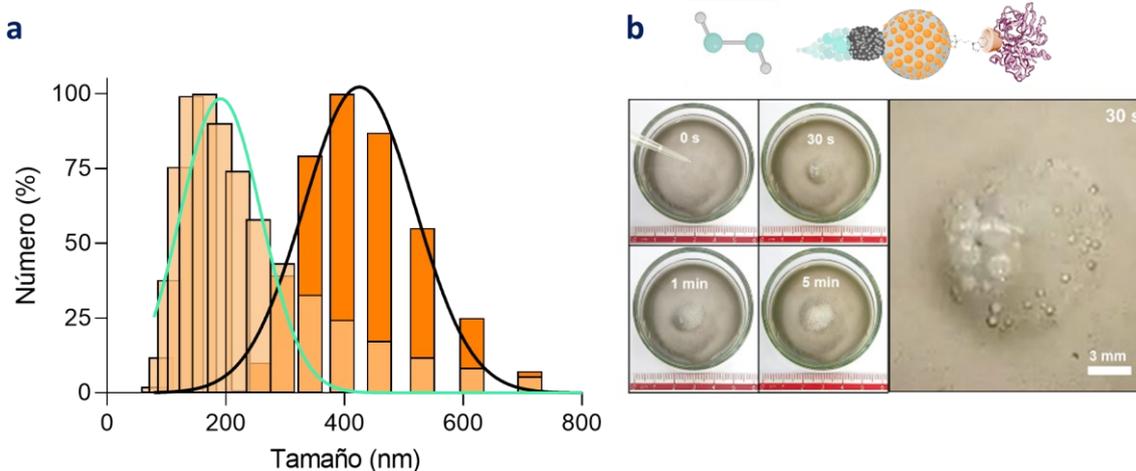
**Figura IV.17. Análisis NTA de  $\text{MSN}_{\text{CHX-F}}$ .** **a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$  (Ecuación III.5). **c** Trayectorias representativas de 5 nanodispositivos. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 20 nanopartículas.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0$ , verde;  $0.2 \%$  (v/v), naranja. La diferencia entre 0 y  $0.2 \%$  no es significativa y, por tanto, no se indica.

A modo de comparación, la **Figura V.18** recoge el movimiento de las nanopartículas activas,  $\text{NM}_{\text{CHX-F}}$  y de las nanopartículas pasivas,  $\text{MSN}_{\text{CHX-F}}$ , como consecuencia de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al  $0.2 \%$ . Como se puede apreciar, sólo el nanomotor final (**naranja**) muestra un aumento significativo en su difusión (de 5.5 unidades). Contrariamente, la difusividad de los nanodispositivos sin Pt (**verde**) es prácticamente similar en presencia y en ausencia del combustible.



**Figura IV.18. Comparación de la difusión de NM<sub>CHX-F</sub> y MSN<sub>CHX-F</sub>.** **a** MSD vs  $\Delta t$  a 0.2 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NM<sub>CHX-F</sub>: naranja, MSN<sub>CHX-F</sub>: verde). **b** D<sub>0</sub> y D<sub>eff</sub> a 0 (negro) y 0.2 % (naranja rayado) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Datos extraídos del análisis NTA (n = 20). \*\*\*\* p < 0.0001.

Seguidamente, el movimiento de NM<sub>CHX-F</sub> se caracterizó mediante DLS (**Figura IV.19a**) en ausencia (**a**, naranja) y presencia de 0.2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**a**, naranja claro). Los resultados indican que el nanomotor propulsado exhibe una reducción de aproximadamente 200 nm en el tamaño aparente en comparación con el nanomotor no impulsado. Esto concuerda con los valores D<sub>eff</sub> obtenidos ya que el tamaño y el coeficiente de difusión están inversamente relacionados según la ecuación de Stokes-Einstein (**Ecuación I.2**). Como punto final a la caracterización motil, se llevó a cabo un análisis macroscópico del movimiento de NM<sub>CHX-F</sub>. Para ese fin, se tomaron varias imágenes a una dispersión del nanomotor (1 mg mL<sup>-1</sup> en PBS) en contacto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 %). Como indica la **Figura IV.19b**, la generación de burbujas puede apreciarse a simple vista en tan sólo 30 s, sugiriendo que NM<sub>CHX-F</sub> sigue un mecanismo de propulsión por generación de burbujas.



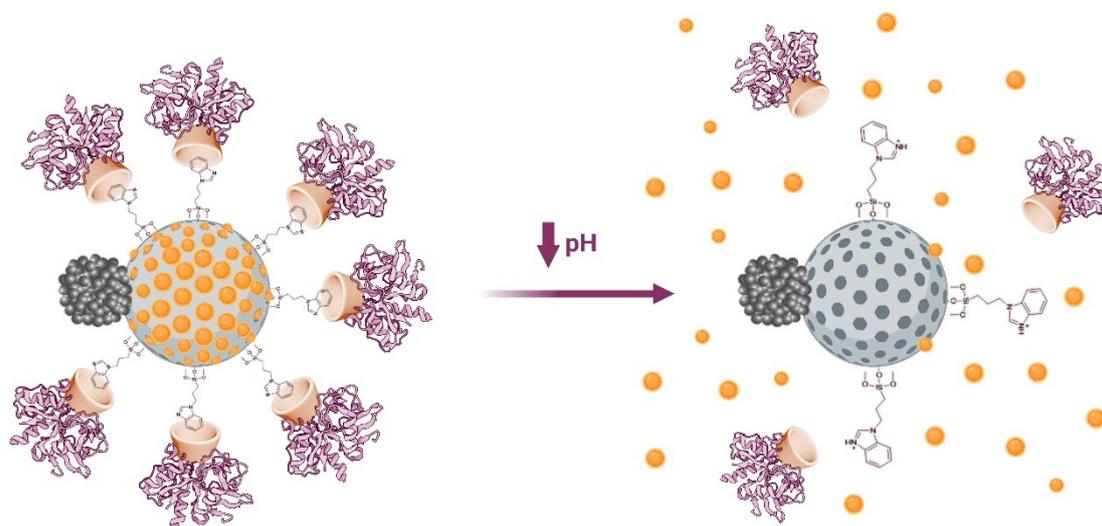
**Figura IV.19. a** Caracterización del movimiento de NM<sub>CHX-F</sub> por DLS. NM<sub>CHX-F</sub> en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: naranja, NM<sub>CHX-F</sub> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 %: naranja claro. **b** Evaluación de la capacidad motil de NM<sub>CHX-F</sub> a nivel macroscópico: generación de burbujas en respuesta a la catálisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 %.

Los resultados presentados en este apartado permiten concluir que el nanomotor construido presenta: (i) capacidad de catalizar la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y (ii) autopropulsión por la generación de burbujas de O<sub>2</sub> en respuesta a ese fenómeno. Por último, la evaluación de

la movilidad de una nanopartícula control privada de Pt revela de nuevo la necesidad que las partículas cuenten con un catalizador y una estructura asimétrica para vencer el movimiento Browniano y propulsarse químicamente.

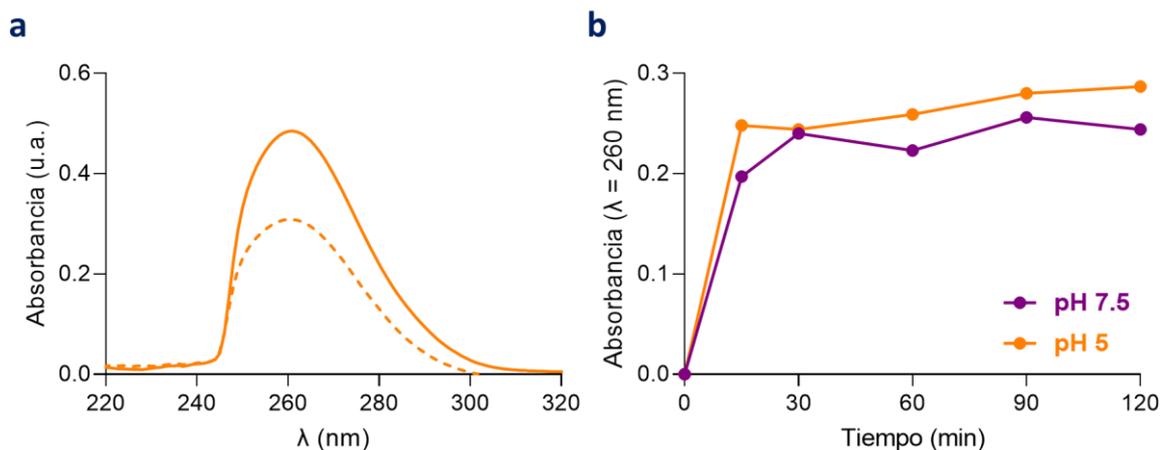
#### IV.6.3.2 $NM_{CHX-F}$ libera CHX a pH ácido

El fin del trabajo es aplicar el nanomotor desarrollado para la administración de agentes antimicrobianos. Por ello, como se ha explicado previamente, se decidió cargar CHX en sus mesoporos y bloquearlos con F- $\beta$ CD. En la **Figura IV.20** se representa el mecanismo de liberación propuesto. Ante un descenso en el pH del medio, se produce la protonación de los grupos BNZ que funcionalizan la superficie de la MSN ( $pK_a = 5.55$ ).<sup>340</sup> Esto da lugar a la desarticulación del complejo de inclusión formado entre esos grupos y la F- $\beta$ CD. La constante de formación del complejo BNZ- $\beta$ CD se reduce de  $104 \pm 8 \text{ M}^{-1}$  ( $K_{BNZ-\beta CD}$ ) para el benzimidazol neutro a  $42 \pm 12 \text{ M}^{-1}$  ( $K_{BNZ^+-\beta CD}$ ) para el benzimidazol protonado.<sup>341</sup> En consecuencia, los mesoporos de NM quedan desbloqueados y la carga encapsulada sale al medio por el gradiente de concentración.



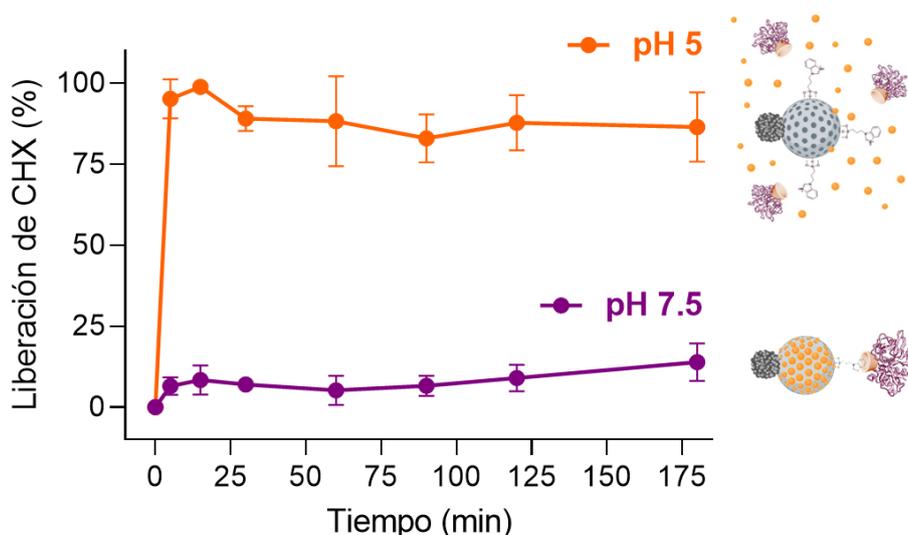
**Figura IV.20. Mecanismo de liberación de la carga de  $NM_{CHX-F}$  en respuesta a pH ácido.**

Una vez confirmada la habilidad motora de  $NM_{CHX-F}$  se procedió a validar este objetivo. Para ello, se empleó la espectroscopía UV-vis siguiendo los procedimientos detallados en la **Sección IV.5.5**. En primer lugar, se caracterizó la encapsulación de CHX en  $NM_{BNZ}$  dando lugar a  $NM_{CHX}$  (**Figura IV.21a**) y acto seguido, su liberación incontrolada al medio a pH 5 y 7.5 (**Figura IV.21b**). Estos ensayos nos permiten concluir que la CHX es capaz de transitar a través de la estructura mesoporosa de  $NM_{BNZ}$  sin quedar retenida en ella. Asimismo, el ensayo de liberación de  $NM_{CHX}$  (**b**) nos informa de la necesidad de contar con una puerta molecular para que el pH pueda modular el proceso (**línea morada**: pH neutro, **línea naranja**: pH ácido).



**Figura IV.21. Caracterización de NM<sub>CHX</sub> por espectroscopía UV-vis.** **a** Encapsulación de CHX en NM<sub>BNZ</sub> para formar NM<sub>CHX</sub> tras 24 h de reacción. Tiempo 0 en ausencia de NM<sub>BNZ</sub>: naranja, tiempo 24 h en presencia de NM<sub>BNZ</sub>: naranja punteado. **b** Liberación incontrolada de CHX desde NM<sub>CHX</sub>. pH 7.5: morado, pH 5: naranja. Medio: PBS 100 mM. λ<sub>abs</sub> = 260 nm.

Los resultados de los ensayos de liberación controlada de NM<sub>CHX-F</sub> se muestran en la **Figura IV.22**. En este caso, sí se observan cambios en función del pH del medio. A pH neutro (**curva morada**), la CHX permanece encapsulada en NM debido al bloqueo de sus mesoporos por el complejo de inclusión entre BNZ y F-βCD. Por el contrario, a pH ácido (**curva naranja**), el antiséptico sale del interior del nanomotor alcanzando su nivel máximo en el medio en torno a los 15 min. Este resultado demuestra que la protonación de los grupos BNZ provoca que se desensamble el complejo induciendo la liberación de la carga. Por tanto, se confirma la idoneidad del diseño de la nanoválvula BNZ-F-βCD como puerta molecular sensible al pH para la encapsulación y liberación controlada de CHX. Además, la carga encapsulada se determinó mediante un ensayo de liberación forzada. La cantidad de CHX portada en NM<sub>CHX-F</sub> es de 131.4 μg mg sólido<sup>-1</sup>. Un resultado en concordancia con lo obtenido por TGA (106 μg mg sólido<sup>-1</sup>).



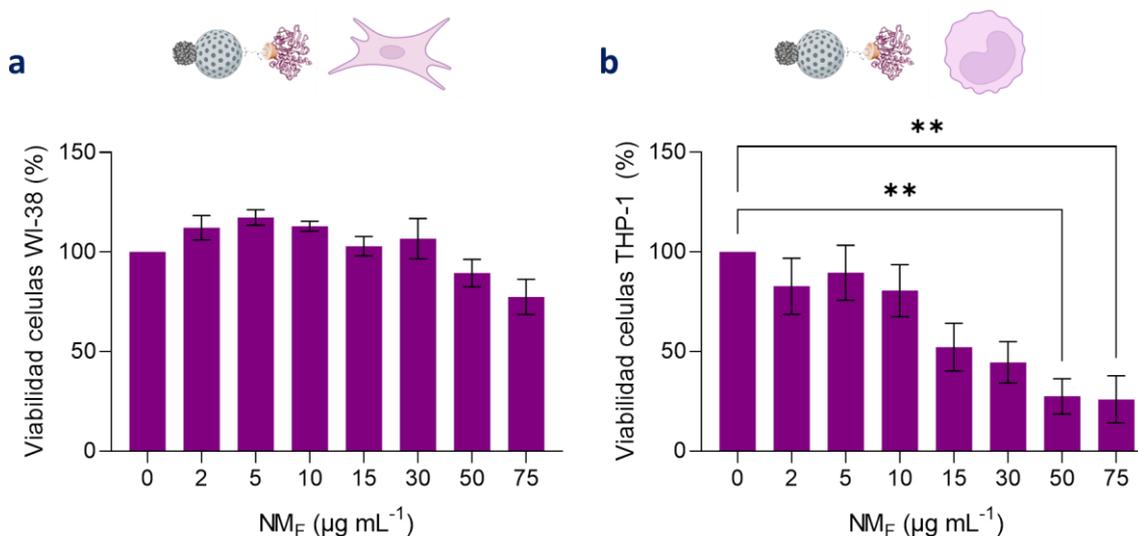
**Figura IV.22. Ensayo de liberación controlada de NM<sub>CHX-F</sub>.** pH 7.5: morado, pH 5: naranja. Medio: PBS 100 mM. λ<sub>abs</sub> = 230 nm. Se muestra la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en esta sección indican que el nanomotor desarrollado puede modular la liberación de CHX en función del pH del medio. Así, se completa la confirmación de la multifuncionalidad del nanodispositivo *in vitro*. A continuación, se pasa a determinar si esas capacidades dan lugar a la erradicación de las biopelículas bacterianas en distintos modelos, así como la biocompatibilidad del nanomotor.

#### IV.6.4 Caracterización de la biocompatibilidad del nanomotor

De forma previa a validar las habilidades antimicrobianas del nanomotor desarrollado, se procedió a evaluar su biocompatibilidad en modelos *in vitro* e *in vivo*. Para estos ensayos se decidió emplear el nanodispositivo no cargado,  $NM_F$ , en lugar del nanomotor final,  $NM_{CHX-F}$  porque es bien conocida la bioseguridad de la CHX.<sup>342</sup>

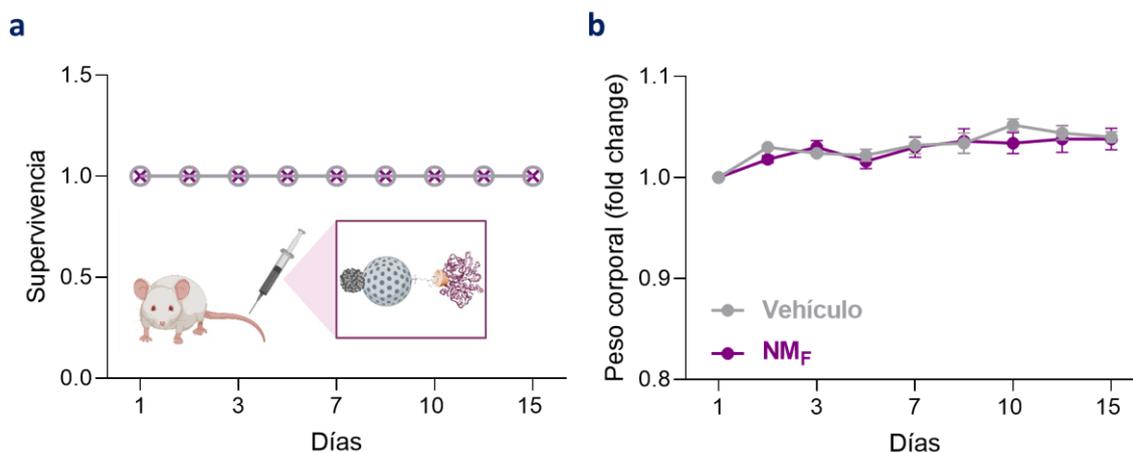
Para comenzar, se evaluó la toxicidad de  $NM_F$  *in vitro* (Sección IV.5.6). A ese efecto, se realizaron ensayos de viabilidad celular WST-1 en 2 líneas celulares comúnmente empleadas en la bibliografía para el estudio de bioseguridad de nuevos nanomateriales: fibroblastos WI-38 y monocitos THP-1.<sup>343</sup> Como se observa en la Figura IV.23a, el nanomotor es bien tolerado en las células WI-38. A concentraciones de hasta  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , las viabilidades se encuentran en el intervalo del 77-100 % a las 48 h de tratamiento. Así, se puede concluir que la funcionalización de NM con F- $\beta$ CD no induce una mayor toxicidad en fibroblastos (Figura III.35). En cambio, el nanomotor genera más citotoxicidad a dosis menores en las células THP-1. Como se observa en la Figura IV.23b, las células viables representan solo el 30 % del total tras la incubación con  $NM_F$  a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura IV.23. Evaluación de la toxicidad de  $NM_F$  *in vitro*.** **a** En células WI-38. **b** En células THP-1.  $NM_F$  (concentraciones de 0 a  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): morado. Determinada mediante el ensayo de proliferación celular WST-1. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ .

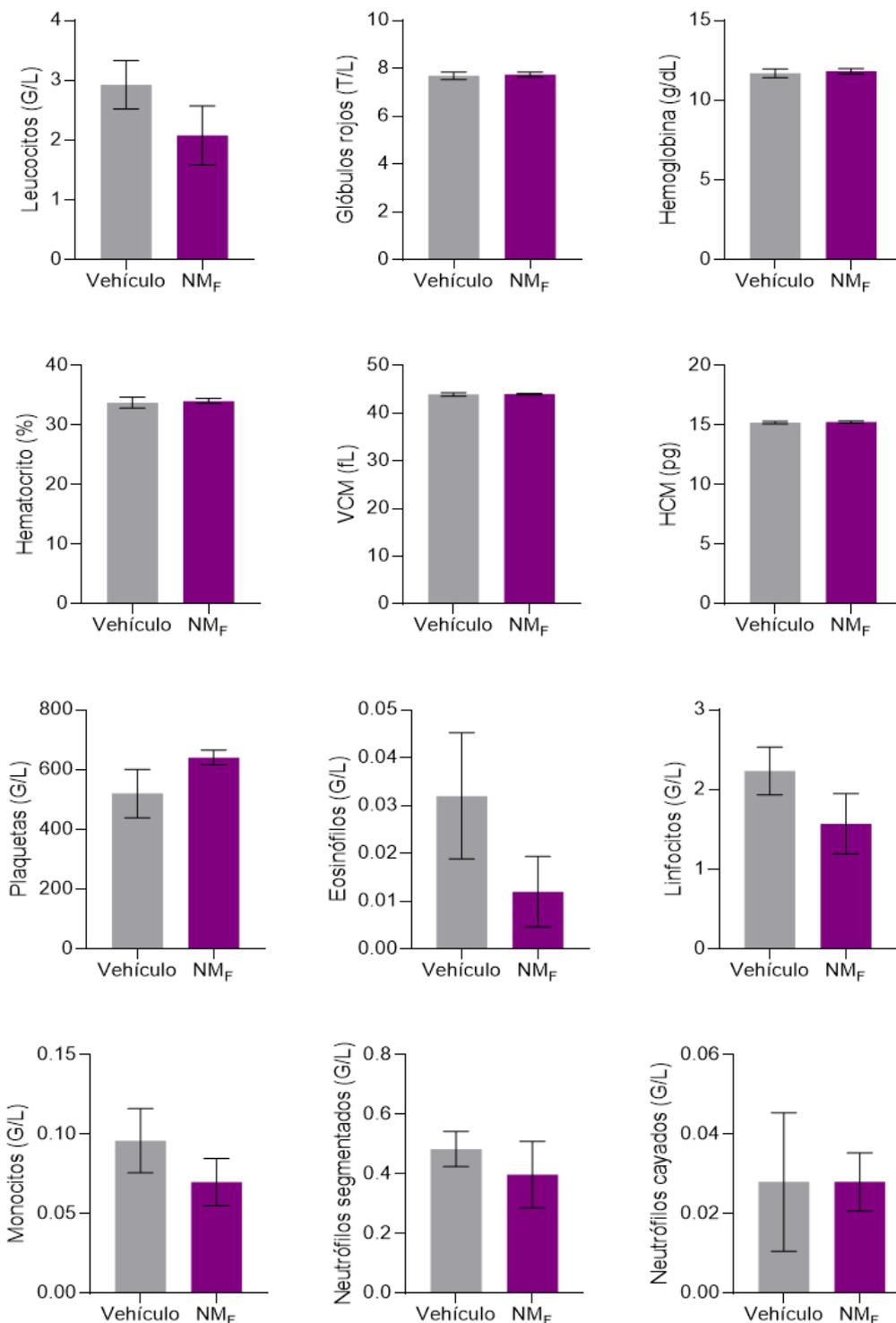
Estos resultados motivaron la necesidad de ir un paso más allá en la caracterización de la biocompatibilidad del nanomotor. Para ello, se evaluó la toxicidad sistémica aguda de  $NM_F$  en un modelo murino. Se actuó de acuerdo con el protocolo experimental descrito en la Directriz 423 de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE).<sup>344</sup> Así, se inyectó por vía intravenosa una única dosis de  $NM_F$  a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (o el volumen equivalente de vehículo, PBS)

a ratones Balb/c inmunocompetentes sanos. Durante 15 días los ratones fueron revisados periódicamente prestando especial atención a su bienestar y comportamiento (**Sección IV.5.7, Figura IV.4**). Al final del experimento todos los animales sobrevivieron sin ningún perjuicio en su peso corporal (**Figura IV.24**).



**Figura IV.24. Evaluación de la toxicidad sistémica aguda de NM<sub>F</sub>.** **a** Curva Kaplan-Meier de supervivencia. **b** Evaluación del cambio en el peso corporal de los ratones (expresado como *fold-change*, media ± SEM). NM<sub>F</sub> (una única dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup>): morado, vehículo: gris. n = 5 animales por grupo.

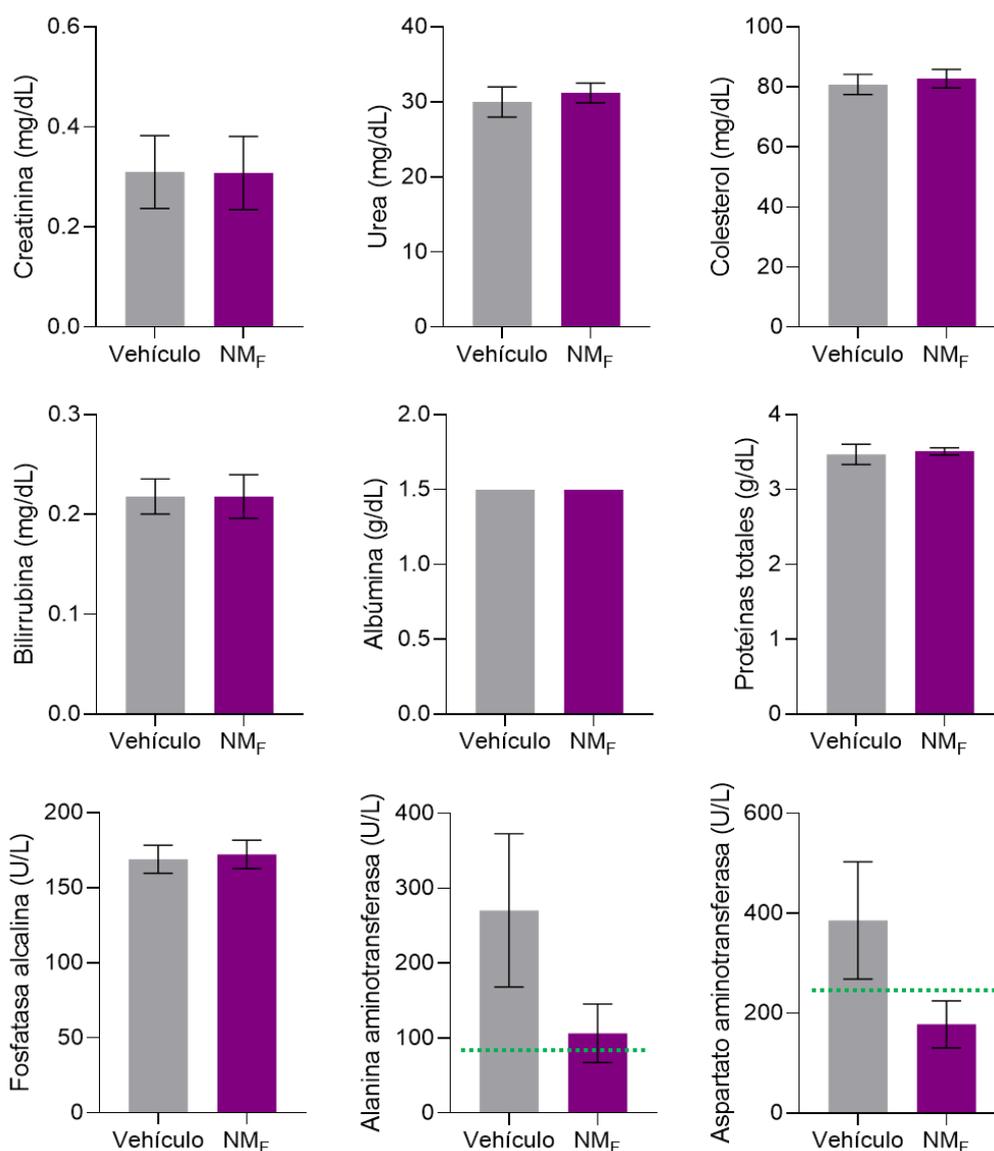
Además, en ese punto se les extrajo sangre, que fue analizada en búsqueda de disfunciones hematológicas y bioquímicas. Por un lado, la **Figura IV.25** recoge los resultados de los análisis hematológicos. Como se puede observar, no se han encontrado variaciones significativas en el grupo tratado con NM<sub>F</sub> en comparación con el grupo tratado con PBS, con respecto a la hemoglobina y los linajes de glóbulos rojos y blancos. En concreto, los niveles de monocitos (progenie de las células THP-1) son normales. Por tanto, se puede concluir que la función hematológica de los ratones no se ve afectada por el nanomotor.



**Figura IV.25. Análisis hematológicos.** Leucocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), glóbulos rojos ( $\text{T L}^{-1}$ ), hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ ), hematocrito (%), VCM (fL), HCM (pg), plaquetas ( $\text{g L}^{-1}$ ), eosinófilos ( $\text{g L}^{-1}$ ), linfocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), monocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), neutrófilos segmentados ( $\text{g L}^{-1}$ ) y neutrófilos cayados ( $\text{g L}^{-1}$ ). NM<sub>F</sub> ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ): morado, vehículo: gris.  $n = 5$  animales por grupo.

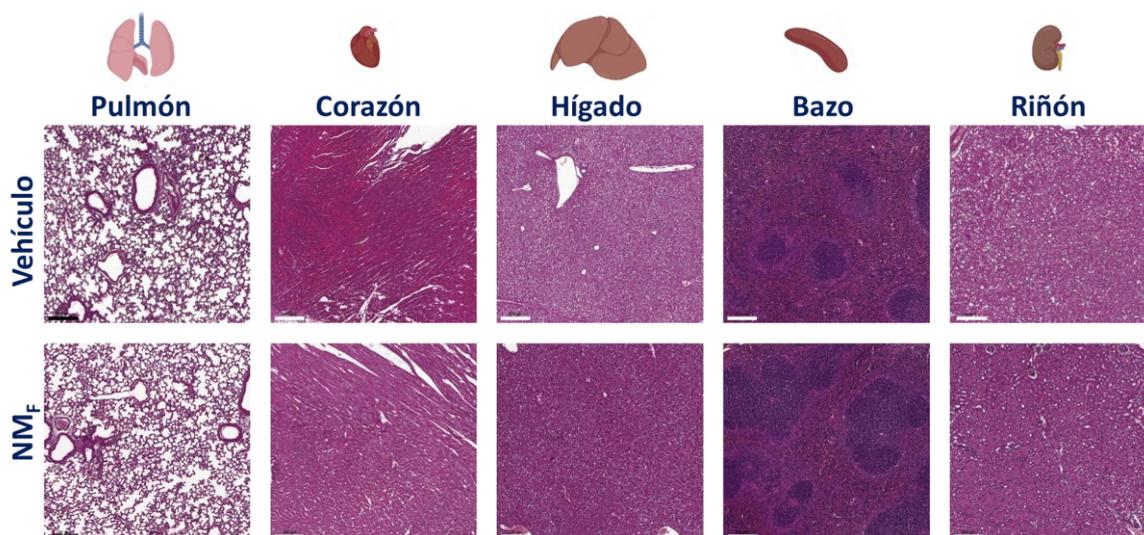
Por otro lado, la **Figura IV.26** recopila los resultados de los análisis bioquímicos. En este caso, todos los parámetros analizados se encuentran dentro de la normalidad, con excepción de la función hepática. Los niveles de actividad de la enzima ALT son superiores a los valores considerados saludables. No obstante, este incremento se observa tanto en el grupo tratado

con vehículo como en el grupo tratado con NM<sub>F</sub>. Además, los niveles de actividad de la enzima AST también son elevados en los ratones control. Por consiguiente, la disfunción hepática observada no puede ser atribuida al nanomotor.



**Figura IV.26. Análisis bioquímicos.** Creatinina ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), urea ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), colesterol ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), bilirrubina ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), albúmina ( $\text{g dL}^{-1}$ ), proteínas totales ( $\text{mg dL}^{-1}$ ), FA ( $\text{U L}^{-1}$ ), ALT ( $\text{U L}^{-1}$ ) y AST ( $\text{U L}^{-1}$ ). NM<sub>F</sub> ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ): morado, vehículo: gris.  $n = 5$  animales por grupo. La línea verde indica el valor umbral a partir del cual la actividad de ALT y AST se considera fuera de lo normal.

En último lugar, se realizó un análisis histopatológico en búsqueda de alteraciones estructurales o morfológicas en los principales órganos. En la **Figura IV.27** se muestran imágenes representativas de la tinción H&E de pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón. Como se puede apreciar, los resultados revelan la ausencia de cambios aparentes entre administrar o no el nanomotor. Por consiguiente, se puede inferir que los órganos permanecen inalterados tras el tratamiento con NM<sub>F</sub> después de 2 semanas.



**Figura IV.27. Análisis histopatológico.** Imágenes representativas de la tinción H&E de los principales órganos (pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón) tras el tratamiento con vehículo y  $\text{NM}_F$  ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), ( $n = 5$  animales por grupo). Barra de escala:  $200 \mu\text{m}$ .

En conclusión, los resultados de los ensayos *in vivo* llevados a cabo no apoyan la toxicidad observada en cultivo de monocitos THP-1. Por el contrario, evidencian la biocompatibilidad de la plataforma NM recubierta con la puerta molecular disruptiva de la ECM (BNZ-F- $\beta$ CD) a la dosis y ruta de administración empleadas. Sin embargo, aún se desconocen las posibles reacciones adversas a largo plazo. Además, considerando que la futura aplicación del nanomotor es el ámbito odontológico, sería de gran interés evaluar su efecto sobre líneas celulares derivada de la boca, como, por ejemplo, células madre de la pulpa dentaria o fibroblastos gingivales. También sería pertinente determinar la tasa de absorción de  $\text{NM}_F$  al ser aplicado en la cavidad bucal y, sucesivamente, su posible bioacumulación.

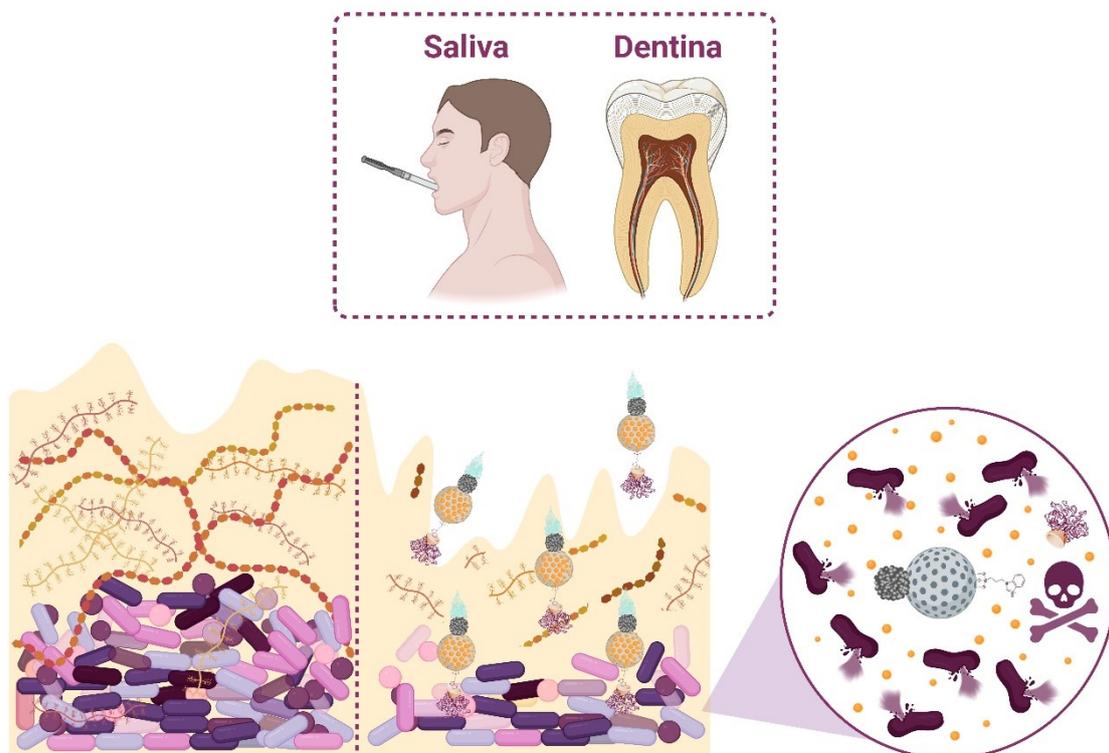
#### IV.6.5 Caracterización de las habilidades antimicrobianas del nanomotor

Las habilidades antimicrobianas de la plataforma  $\text{NM}_F$  ya fueron previamente validadas por nuestro grupo en un modelo *in vitro* representativo de infecciones comunes formado por biopelículas de *Staphylococcus aureus*. Para ello, los poros del soporte se cargaron con el antibiótico vancomicina. El nanomotor activado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  consiguió erradicar hasta un 82 % de la biomasa de las biopelículas y eliminar hasta un 96 % de las bacterias localizadas en su interior. Por lo que sabemos, nunca se había conseguido una reducción tan drástica en la biomasa con ninguna terapia convencional contra *S. aureus*.<sup>345</sup> Adicionalmente, se demostró que suprimir o desensamblar los componentes fundamentales del nanomotor, así como no adicionar el combustible que induce su propulsión conlleva la pérdida de su capacidad antimicrobiana. Se eliminaron los 2 elementos que provocan la degradación de la ECM: movimiento (quitando la nanopartícula de Pt o no añadiendo  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y actividad proteasa (sin ficina); así como el fármaco (nanodispositivo no cargado). Además, también se testaron todos los elementos que conforman el nanomotor final pero desensamblados (Pt, MSN, vancomicina y ficina). Ninguno de estos nanodispositivos incompletos o no móviles mostró propiedades antimicrobianas comparables a las exhibidas por el nanomotor completo propulsado con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por tanto, estos resultados confirmaron la triple funcionalidad diseñada: autopro pulsión, ruptura de la ECM y liberación

controlada de antimicrobianos. Los resultados se publicaron en el artículo titulado «*Ficin-Cyclodextrin Based Docking Nanoarchitectonics of Self-Propelled Nanomotors for Bacterial Biofilm Eradication*» publicado en la revista *Chemistry of Materials* en 2023.<sup>346</sup>

En base a estos hallazgos, decidimos aplicar el nanomotor como herramienta para la desinfección en un entorno microbiológico más relevante. Elegimos las infecciones endodónticas ya que la colonización de los intrincados conductos radiculares con comunidades complejas de microorganismos dificulta su tratamiento con los agentes terapéuticos tradicionales. El funcionamiento del nanomotor se evaluó en biopelículas orales polimicrobianas derivadas de saliva y en biopelículas de *S. mutans* crecidas sobre bloques de dentina. En estos experimentos se testó el efecto antimicrobiano del tratamiento con  $NM_{CHX-F}$  en presencia de combustible. Éste se comparó con añadir solo  $H_2O_2$  (0.15 %, una concentración a la que el nanomotor exhibe una difusión incrementada), CHX en estado libre (a una concentración equivalente a la encapsulada en  $NM_{CHX-F}$ ) y el control formado por todos los elementos de  $NM_{CHX-F}$  pero no ensamblados (NE, a concentraciones equivalentes a  $NM_{CHX-F}$  en presencia de combustible). El resto de las nanopartículas control incompletas ( $NM_F$ ,  $MSN_{CHX-F}$  y  $NM_{CHX-\beta CD}$ ) y el nanomotor final en ausencia de combustible no se incluyeron puesto que ya se había determinado su ineficacia en el modelo de *S. aureus*.

El mecanismo antimicrobiano ideado llevado a cabo por el nanomotor activado con el combustible se ilustra en la **Figura IV.28**. Seguidamente, se describen los principales ensayos realizados y los resultados obtenidos en ambos modelos.

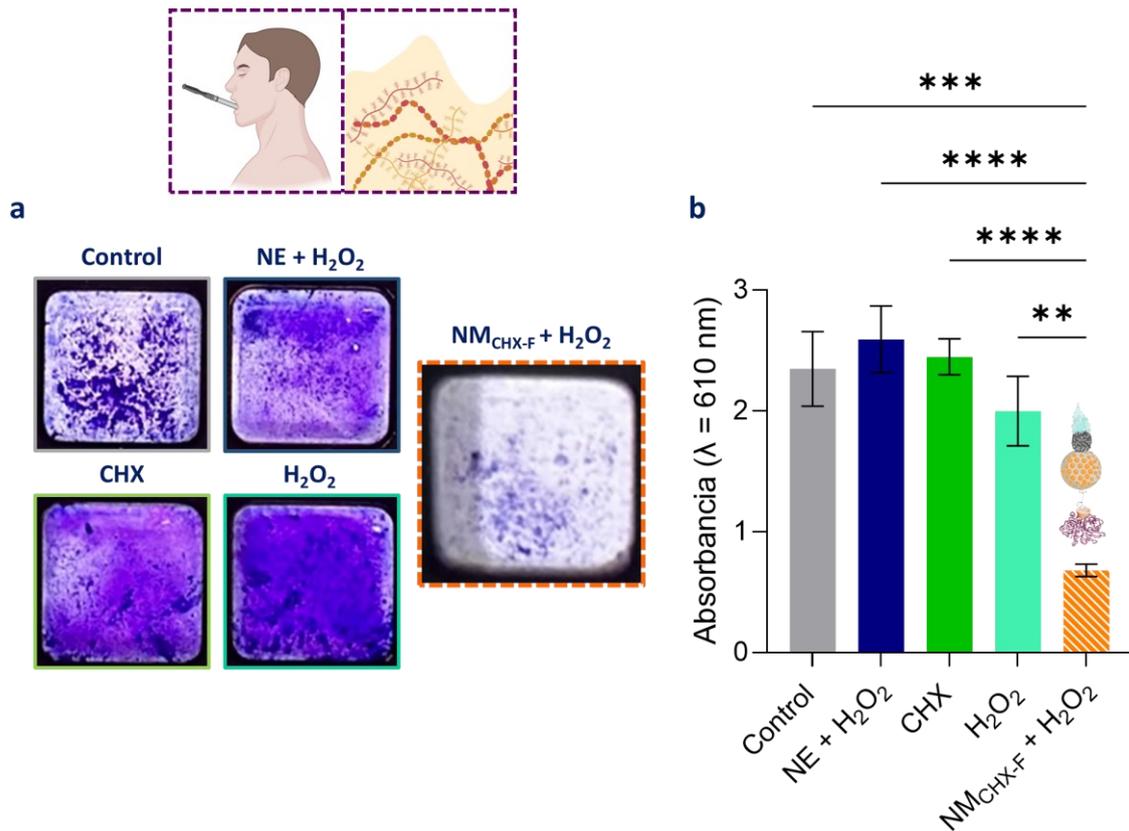


**Figura IV.28.** Representación de las habilidades antimicrobianas del nanomotor diseñado.

#### IV.6.5.1 NM<sub>CHX-F</sub> elimina biopelículas orales derivadas de saliva

La validación funcional del nanomotor en un entorno microbiológico relevante se inició en un modelo oral proveniente de muestras de saliva. Las biopelículas derivadas de saliva contienen una comunidad microbiana compleja formada por decenas de bacterias causantes de patologías orales como caries y periodontitis. Para investigar el efecto del nanomotor sobre ellas se siguió el procedimiento descrito en la **Sección IV.5.8.1**. Brevemente, las biopelículas orales se trataron durante 24 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CHX, NE + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o NM<sub>CHX-F</sub> (activado con el combustible). Después, se evaluaron los niveles de biomasa total adherida (mediante tinción CV, **Figura IV.29**) y la viabilidad de las células bacterianas (mediante medidas de ATP, **Figura IV.30**).

Como indica la **Figura IV.29**, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.15 % (**azul turquesa**, una concentración a la que el nanomotor presenta movimiento, **Figura IV.15**) no induce un descenso en la biomasa de la biopelícula en comparación con el control no tratado (**gris**). Por tanto, estos resultados prueban la idoneidad de emplear H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como combustible en este modelo. La adición de CHX en estado libre a una concentración equivalente a la encapsulada en el nanomotor (**verde**) tampoco consigue eliminar la ECM de las biopelículas, probablemente debido a su pobre penetración en ellas. Igualmente, este experimento también prueba la necesidad de que todos los elementos del nanomotor se administren ensamblados en un solo nanodispositivo, pues NE en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es capaz de disgregar las biopelículas orales (**azul oscuro**). Por el contrario, cuando se administra NM<sub>CHX-F</sub> en combinación con su combustible (**naranja rayado**) se observa un importante efecto terapéutico. La biomasa de la biopelícula se reduce hasta un 33 %, lo que supone un descenso del 67 % con respecto a no administrar ningún tratamiento (**gris**). Estos resultados confirman que la encapsulación de los agentes antimicrobianos en nanomateriales «*inteligentes*» incrementa su actividad. No obstante, en NM<sub>CHX-F</sub>, la puerta molecular no sólo induce la entrega controlada del antiséptico, sino que también participa en la hidrólisis de los componentes proteicos de la ECM, lo cual es un valor añadido de utilidad para penetrar en las biopelículas. Además, este estudio revela que el movimiento del nanomotor potencia sus habilidades antimicrobianas, así como la importancia de su diseño estructural para desempeñar la multifuncionalidad ideada.

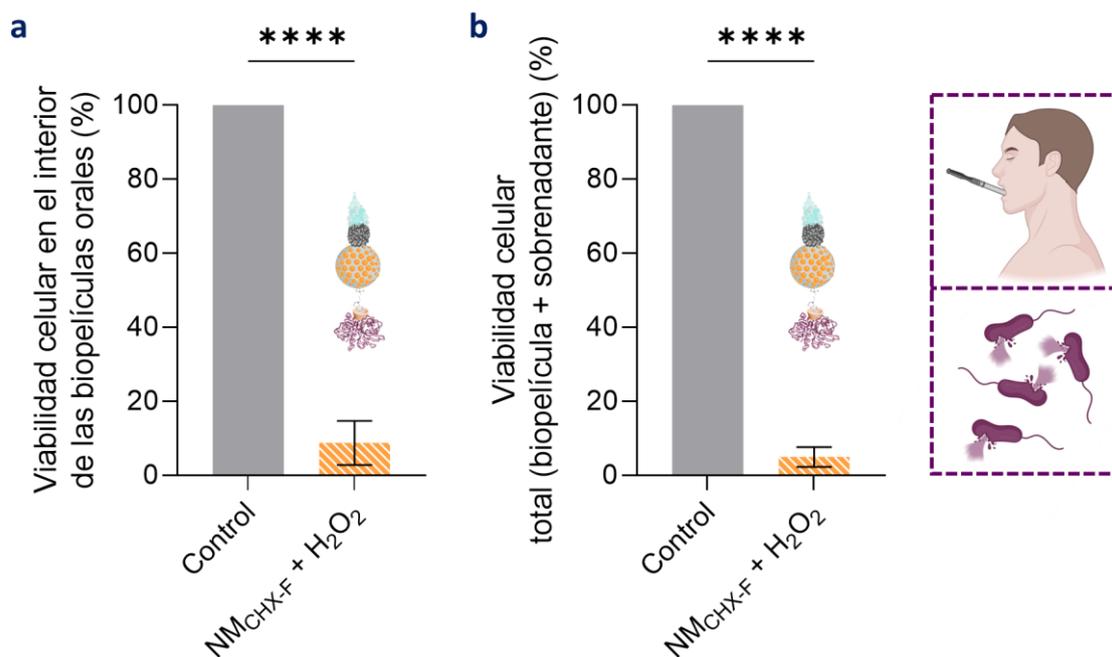


**Figura IV.29. Capacidad antimicrobiana de NM<sub>CHX-F</sub> en biopelículas orales derivadas de saliva: reducción en la biomasa de la biopelícula, determinada mediante tinción CV. a** Imagen representativa. **b** Cuantificación de la intensidad de absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}} = 610 \text{ nm}$ ). Control no tratado: gris, NE (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): azul oscuro, CHX (0.02 %): verde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): azul turquesa, NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): naranja rayado. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados de 5 donantes. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

En conjunto, estos resultados demuestran que sólo el nanomotor ensamblado y activado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de disgregar eficazmente la ECM de las biopelículas orales derivadas de saliva. Por tanto, seguidamente se pasó a dilucidar si esa penetración incrementada se traducía en una mayor eliminación de las bacterias de las biopelículas. Como muestra la **Figura IV.30**, tras el tratamiento con NM<sub>CHX-F</sub> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**naranja rayado**) sólo un 9 % de las células alojadas en el interior de la biopelícula (**a**) permanecen en estado viable. Atendiendo a la población total del *biofilm* (**b**, células localizadas en el núcleo de la estructura y distribuidas en el sobrenadante) sólo un 5 % de las bacterias son viables, lo cual supone la erradicación casi completa de la comunidad microbiana tras 24 h de incubación con el nanorobot propulsado.

Las biopelículas orales derivadas de saliva son una de las comunidades microbianas más diversas que existen y su estructura tridimensional está compuesta por una mezcla heterogénea de agregados bacterianos de diferente tamaño, estructura y naturaleza filogenética.<sup>347</sup> Por todo ello, la eliminación efectiva de estas comunidades patogénicas es muy difícil y aun así el nanomotor desarrollado es capaz de llevarla a cabo con éxito en 24 h. Sin embargo, considerando la futura aplicación de esta nanotecnología en la desinfección endodóntica en

clínica, sería más adecuado que el tiempo de incubación requerido para mostrar acción antimicrobiana fuera menor.



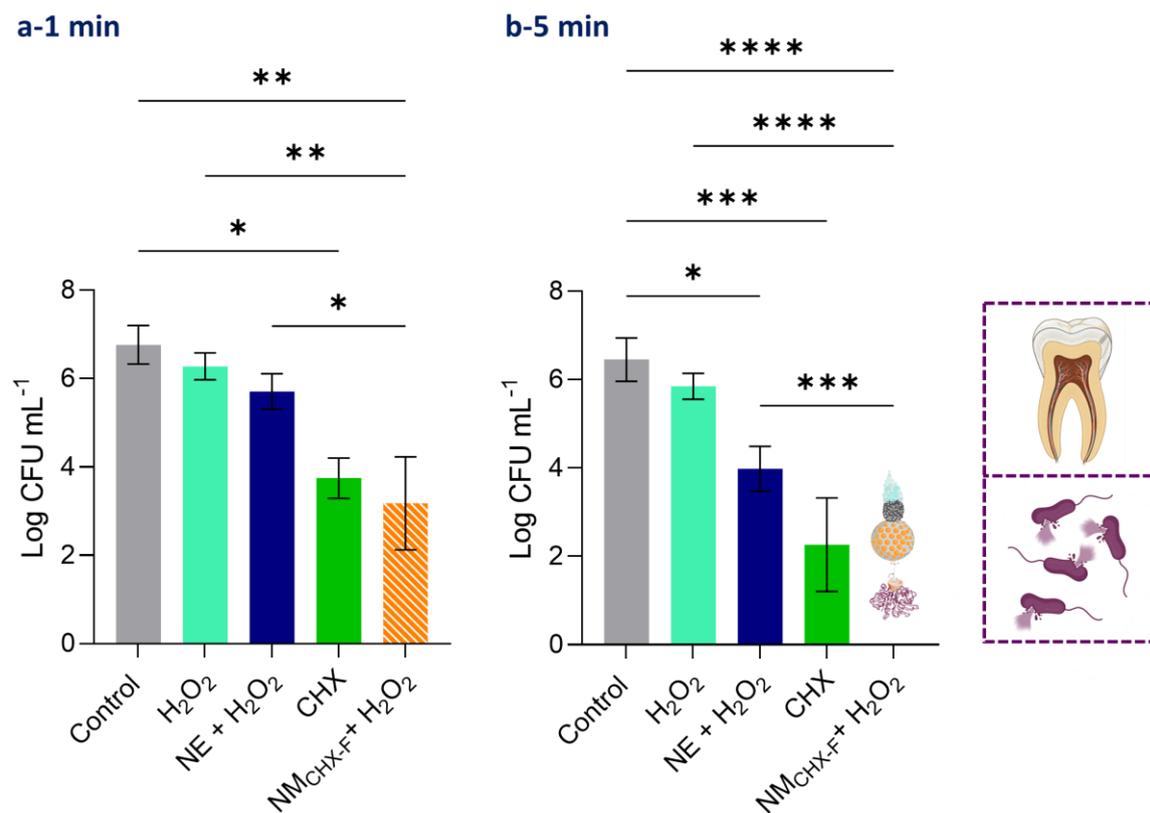
**Figura IV.30. Capacidad antimicrobiana de NM<sub>CHX-F</sub> en biopelículas orales derivadas de saliva: reducción en la viabilidad de las células bacterianas, determinada mediante medidas de ATP. a** En el interior de la biopelícula. **b** Total (biopelícula + sobrenadante). Control no tratado: gris, NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): naranja rayado. Los datos representan la media ± SEM de los resultados de 5 donantes. \*\*\*\* p < 0.0001.

#### IV.6.5.2 NM<sub>CHX-F</sub> elimina biopelículas endodónticas crecidas sobre dentina

El siguiente nivel de complejidad microbiológica en el que se validaron las propiedades del nanomotor fue un modelo de biopelículas endodónticas. Consiste en cultivar la bacteria cariogénica *S. mutans* sobre bloques de dentina. Si bien estas biopelículas sólo están conformadas por un tipo de microorganismo, su complejidad radica en el soporte sobre el que se disponen. Los bloques de dentina presentan multitud de conductos radiculares con una intrincada morfología que propicia el establecimiento de biopelículas intrarradiculares de difícil tratamiento. Para averiguar si el nanomotor era capaz de acceder hasta ellas y eliminarlas, se plantearon los experimentos detallados en la **Sección IV.5.8.2**. De forma resumida, los bloques de dentina infectados con *S. mutans* (biopelículas maduras de 7 días) se sumergieron en soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CHX, NM<sub>CHX-F</sub> (activado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o NE (concentraciones equivalentes a NM<sub>CHX-F</sub> en presencia del combustible). La capacidad antimicrobiana de los tratamientos se cuantificó mediante recuento de CFUs (**Figura IV.31**) y medidas de la cantidad de ATP en el cultivo (**Figura IV.32**). Con ambos ensayos es posible determinar la viabilidad de las células bacterianas de la biopelícula.

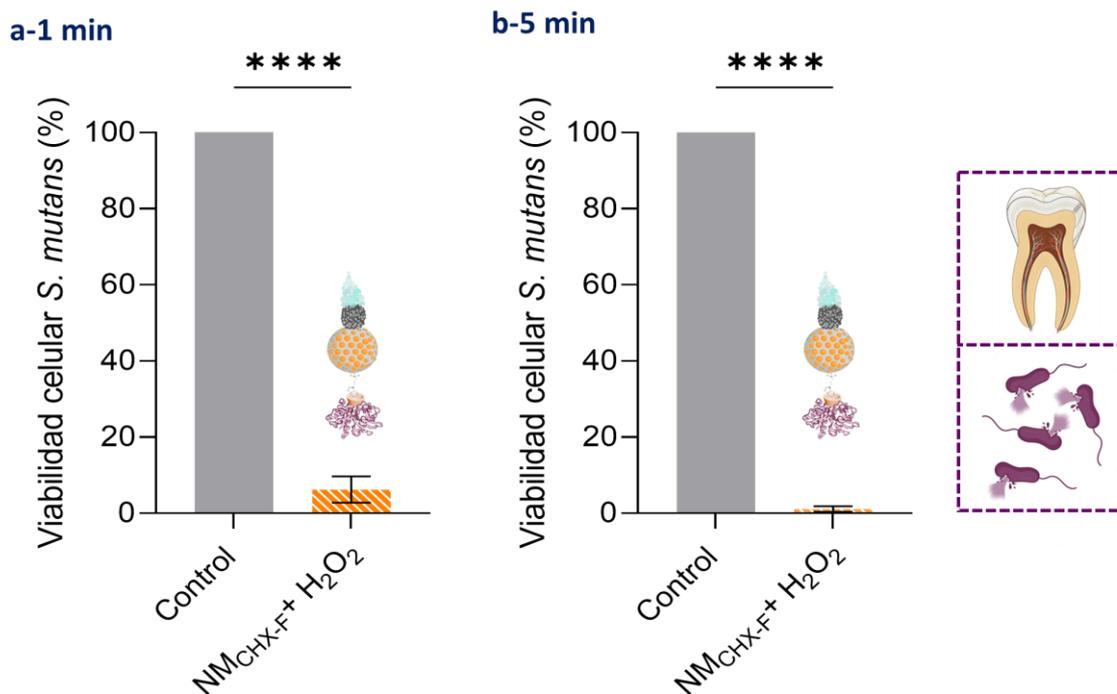
Atendiendo al recuento de CFUs, mostrado en la **Figura IV.31**, sólo el nanomotor activado con el combustible (**naranja rayado**) consigue reducir eficazmente la población de células patógenas tras tiempos de incubación muy cortos (1 y 5 min). Las CFUs disminuyen aproximadamente 3 logs en comparación con el control no tratado (**gris**) en tan solo 1 min. Tras

5 min, se produce la eliminación completa de las colonias bacterianas. En cambio, la administración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul turquesa), NE en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul oscuro) o CHX (verde) no logra conseguir el mismo efecto en un lapso temporal tan reducido. En 1 min, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o NE solo llega a disminuir el número de CFUs en 1 log aproximadamente comparado con no administrar ninguna terapia (gris). Pasados 5 min, esos tratamientos reducen el número de CFUs en 1 y 2 logs, respectivamente. Por otro lado, la adición del antiséptico no encapsulado lleva a una disminución de aproximadamente 3 logs en 1 min y de 4 logs en 5 min, mientras que la CHX encapsulada en el nanomotor es capaz de conseguir la eliminación completa de las CFUs en 5 min.



**Figura IV.31. Toxicidad de NM<sub>CHX-F</sub> en biopelículas de *S. mutans* dispuestas en bloques de dentina, determinada mediante recuento de CFUs (log CFU mL<sup>-1</sup>). a En 1 min. b En 5 min. Control no tratado: gris, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): azul turquesa, NE (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): azul oscuro, CHX (0.02 %): verde, NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): naranja rayado. Los datos representan la media ± SEM de 2 experimentos independientes. \* p < 0.1, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 y \*\*\*\* p < 0.001.**

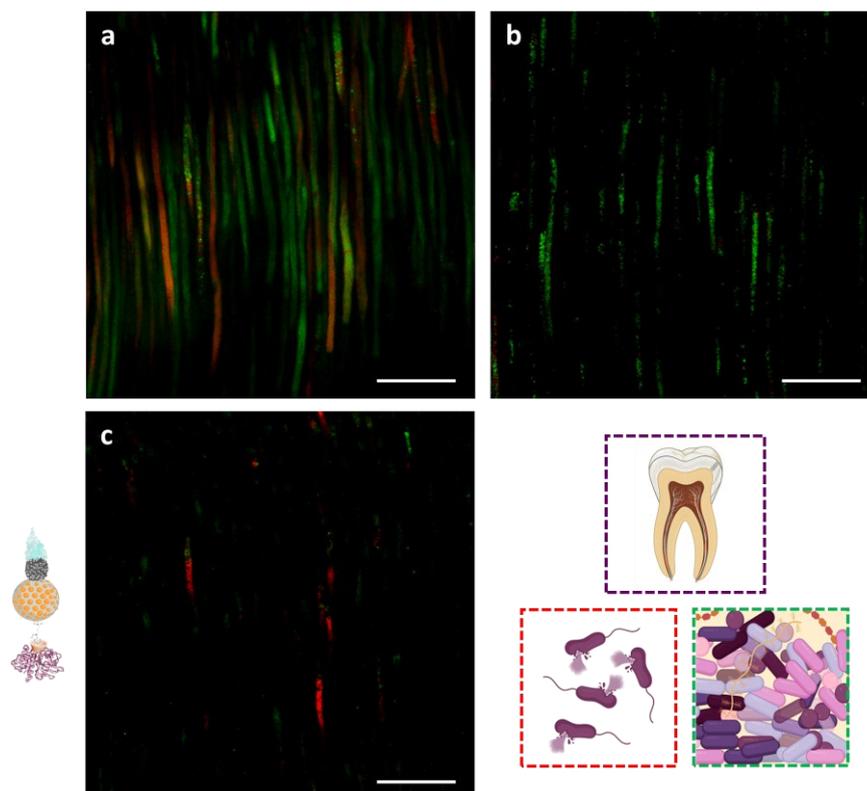
Esta actividad antimicrobiana incrementada del nanomotor final activado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también fue confirmada por las medidas de ATP. Como se observa en la **Figura IV.32**, el porcentaje de viabilidad celular de *S. mutans* se reduce hasta el 6 % en solo 1 min y llega a disminuir hasta el 1 % tras permanecer 5 min en contacto con el nanodispositivo desarrollado.



**Figura IV.32. Toxicidad de NM<sub>CHX-F</sub> en biopelículas de *S. mutans* dispuestas en bloques de dentina, determinada mediante medidas de ATP. a) En 1 min. b) En 5 min. Control no tratado: gris, NM<sub>CHX-F</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %): naranja rayado. Los datos representan la media ± SEM de 2 experimentos independientes. \*\*\*\* p < 0.001.**

Estos hallazgos parecen indicar que, gracias a sus reducidas dimensiones y autopropulsión, el nanomotor logra introducirse de forma adecuada y en corto tiempo en el sistema de canales radiculares de la dentina. Una vez alcanzado su destino, degrada la ECM de las biopelículas y elimina a las bacterias, como se ha podido demostrar mediante los ensayos de viabilidad (Figuras IV.31 y IV.32). Todo el proceso se desencadena en un tiempo extremadamente reducido, lo cual incrementa la idoneidad del nanosistema en vista a su posible implementación en la desinfección de endodancias.

Para demostrar visualmente este proceso se llevó a cabo un análisis cualitativo por CLSM mediante tinción «LIVE/DEAD». En este ensayo las bacterias en estado viable se tiñen de color verde y las bacterias no viables de color rojo. En la Figura IV.33 se muestran imágenes representativas de los canales radiculares de los bloques de dentina tras su incubación con 2 tratamientos (NE + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NM<sub>CHX-F</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 5 min. Como se puede observar, en el control no tratado (a), se detecta la presencia de una alta proporción de células vivas (verde), mientras que las células muertas representan una baja proporción. En el caso de los conductos tratados con NE + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) el resultado es similar. En cambio, en los bloques de dentina incubados con el nanomotor final propulsado (c), se aprecia una importante reducción en la población bacteriana localizada en los conductos radiculares. Además, la mayor parte de las bacterias presentes se encuentran en estado no viable (rojo), lo cual coincide con los datos obtenidos previamente mediante las diferentes técnicas complementarias empleadas. En conjunto, todos los resultados apuntan a que el nanomotor logra penetrar en el complejo sistema de canales dentinarios erradicando las biopelículas intrarradiculares.



**Figura IV.33. Penetración de  $NM_{CHX-F}$  en canales radiculares colonizados con biopelículas de *S. mutans*.**  
**a** Control no tratado. **b** NE +  $H_2O_2$  (0.15 %). **c**  $NM_{CHX-F}$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) +  $H_2O_2$  (0.15 %). Tiempo de incubación: 5 min. Imágenes representativas obtenidas por CLSM. Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$ . Rojo: células muertas, verde: células vivas.

En conclusión, los experimentos llevados a cabo en biopelículas orales polimicrobianas derivadas de saliva demuestran que  $NM_{CHX-F}$  es capaz de reducir la cantidad de biomasa (tinción CV) y de eliminar diversas poblaciones bacterianas (medidas de viabilidad por ATP). Del mismo modo, los experimentos llevados a cabo en biopelículas endodónticas dispuestas sobre bloques de dentina demuestran que el nanomotor erradica las células de *S. mutans* (medidas de viabilidad: CFUs y ATP), gracias a su introducción eficaz en el sistema de canales radiculares de la dentina (imágenes de CLSM). También se ha confirmado que ni la administración del combustible, CHX en suspensión o NE activado con  $H_2O_2$  consigue resultados comparables en ambos modelos. En este punto, es importante mencionar que la dosis de CHX utilizada en clínica suele ser del 0.2 %, es decir 10 veces superior a la encapsulada en el nanomotor. Además, se logra una eliminación completa de la infección en tan solo 5 min, lo que representa una ventaja frente a las técnicas de desinfección por irrigación aplicadas en los tratamientos endodónticos en clínica, cuyo tiempo medio puede dilatarse mucho más según el grado de dificultad del procedimiento. Así pues, con nuestra aproximación logramos un efecto terapéutico a una dosis de CHX casi 10 veces menor y un tiempo muy reducido.

Hipotetizamos que la notable capacidad antimicrobiana del nanomotor se debe a la sinergia entre el aumento de difusividad por la catálisis de  $H_2O_2$ , la hidrólisis de las proteínas estructurales de la ECM y la liberación contrada de CHX a pH ácido. No obstante, estamos ante resultados preliminares que han de ser corroborados en sucesivos experimentos que permitan

reducir la variabilidad e incluir más condiciones. Además, sería muy interesante determinar la eficacia del nanomotor en modelo todavía más parecido al entorno odontológico real. Por ejemplo, en biopelículas polimicrobianas derivadas de muestras de los canales radiculares de pacientes sometidos a procedimientos endodónticos.

## IV.7 CONCLUSIONES

En este capítulo experimental se ha expuesto el proceso de diseño, síntesis, caracterización y validación de un nanomotor multifuncional tipo Janus Pt-MSN que es capaz de mejorar el tratamiento de las biopelículas bacterianas. Acto seguido, se describen las principales conclusiones alcanzadas:

- ✓ Se ha sintetizado el **nanomotor NM<sub>CHX-F</sub>** a partir de la plataforma inorgánica NM. Para ello, la cara de MSN se ha cargado con el antiséptico CHX y su superficie externa se ha funcionalizado con la enzima proteolítica ficina modificada con  $\beta$ CD (F- $\beta$ CD). Además, se han fabricado **nanopartículas control privadas de sus características fundamentales**.
- ✓ La estructura y composición de las nanopartículas sintetizadas se ha corroborado mediante los métodos estándar de caracterización de nanomateriales.
- ✓ Se ha validado *in vitro* la triple funcionalidad del nanomotor. Éste cuenta con la habilidad de **hidrolizar proteínas**, debido a la presencia de ficina en la cara de MSN. Al mismo tiempo, también es capaz de **propulsarse de forma autónoma**, como consecuencia de la **descomposición catalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>** en la cara de Pt siguiendo, probablemente, el mecanismo de propulsión por burbujas. Por último, el nanomotor puede **controlar la entrega de CHX en función del pH** del medio. Esta funcionalidad se atribuye a que la nanoválvula BNZ-F- $\beta$ CD actúa como puerta molecular sensible a protones.
- ✓ Se han encontrado indicios de la biocompatibilidad del nanomotor *in vitro* e *in vivo*, aunque es necesario ampliar el estudio para confirmarla.
- ✓ Se ha demostrado la capacidad antimicrobiana de NM<sub>CHX-F</sub> mediante ensayos biológicos en biopelículas orales polimicrobianas derivadas de saliva y biopelículas endodónticas de *S. mutans* crecidas sobre dentina. En ambos casos, el nanomotor da lugar a una **eliminación más eficiente de las células bacterianas** que el resto de los tratamientos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CHX en estado libre y NE).

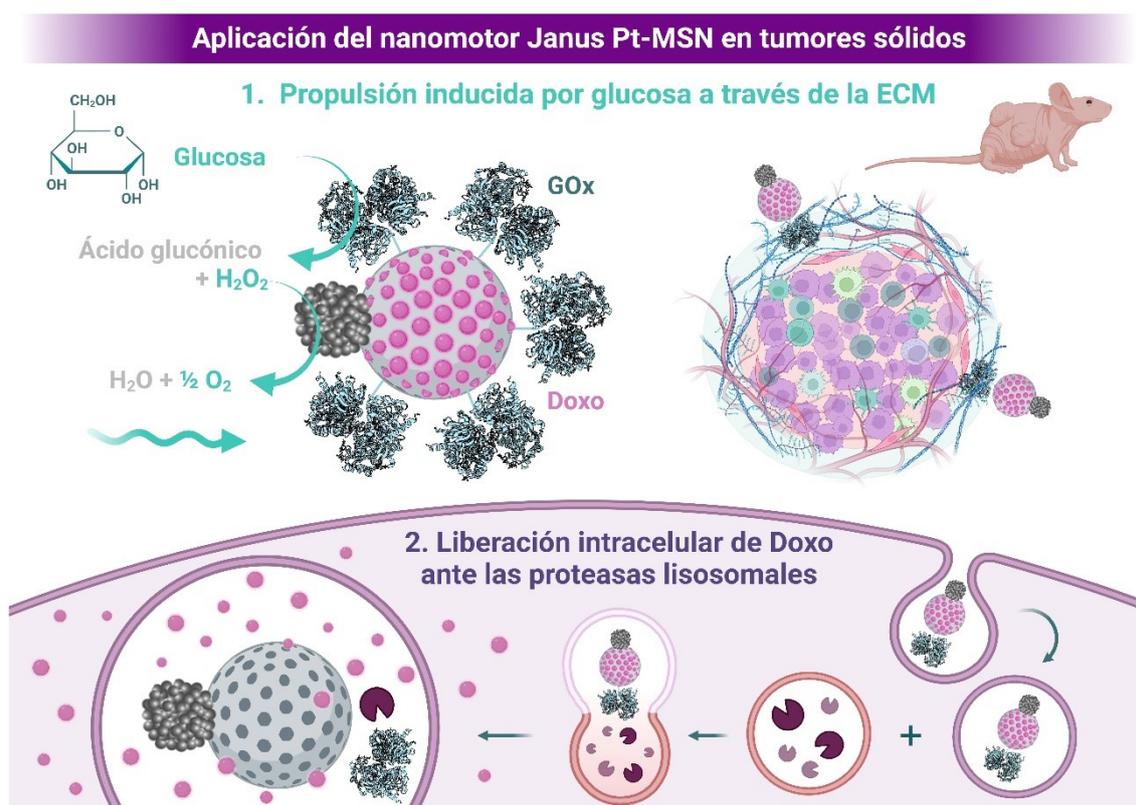
Planteamos que el gran efecto antimicrobiano de los nanomotores está causado por la sinergia entre sus propiedades. Los resultados obtenidos parecen indicar que la combinación de movimiento y degradación de la parte proteica de la ECM lleva a su **penetración profunda en las biopelículas bacterianas**. Una vez alcanzado el núcleo, los nanodispositivos liberan localizada- y específicamente la droga transportada. Finalmente, su acción lleva a la muerte de las células patógenas. Debido a este mecanismo, los nanomotores diseñados tienen un gran potencial como vehículo «*inteligente*» para la entrega de sustancias en áreas de complicado alcance. Ello puede suponer un atisbo de solución para el enorme reto de cómo abordar el tratamiento de las enfermedades infecciosas mediadas por biopelículas.



**CAPÍTULO V:**  
**NANOMOTORES**  
**JANUS PT-MSN PARA EL**  
**TRATAMIENTO DE**  
**TUMORES SÓLIDOS**



## V.1 RESUMEN GRÁFICO



## V.2 RESUMEN

Uno de los mayores desafíos en el área de los nanomotores destinados a aplicaciones biomédicas es la búsqueda de combustibles biocompatibles y biodisponibles capaces de inducir una propulsión eficaz en entornos biológicos. Esto es de especial relevancia en patologías como el cáncer, ya que los tumores sólidos presentan una compleja ECM que obstaculiza el acceso de los nanodispositivos hasta sus dianas. En este escenario, proponemos la implementación de nanomotores Janus Pt-MSN propulsados por la descomposición secuencial de glucosa. En este caso, la cara de MSNs está cargada con Doxo y funcionalizada con GOx (unida mediante enlaces amida). La puerta molecular cumple una doble tarea. Por un lado, responde a la presencia de proteasas intracelulares, induciendo la liberación intracelular del fármaco y, por otro lado, constituye el primer elemento de la cascada que induce el movimiento. La GOx transforma enzimáticamente glucosa en  $H_2O_2$ , que es catalizado posteriormente por la cara de Pt impulsando al nanomotor. Los experimentos llevados a cabo en 3 modelos de cáncer de cérvix (células HeLa): cultivo 2D, esferoides tumorales 3D y un modelo *in vivo* de xenoinjerto, confirman el potente efecto anticancerígeno de los nanomotores desarrollados. Éste se atribuye a la combinación sinérgica de sus habilidades (autopropulsión y liberación controlada de Doxo). En conclusión, nuestros resultados apoyan la idoneidad de la estrategia propuesta para entregar fármacos a través de una BB como la ECM de los tumores sólidos, causando la muerte de las células cancerosas. Además, la nanoarquitectura y el modo de propulsión de nuestro diseño resuelve la dependencia de combustibles exógenos y no biocompatibles.



### V.3 INTRODUCCIÓN

Siguiendo el hilo conductor de todo este trabajo, en este capítulo nos enfocamos en utilizar la **fuerza motriz** de los nanomotores Janus Pt-MSN desarrollados para incrementar la **penetración de los fármacos anticancerígenos en la ECM de tumores sólidos**. Asimismo, aprovecharemos su posibilidad de ser funcionalizados con puertas moleculares para **entregar las drogas en las células cancerosas diana** tras el reconocimiento de estímulos específicos. En las siguientes líneas se expone la problemática epidemiológica del cáncer y se describen otros nanomotores destinados al tratamiento oncológico. Además, se hace hincapié en la exigencia de emplear un **combustible inocuo y disponible en las áreas patológicas** para lograr su propulsión *in situ*.

#### V.3.1 Tumores sólidos: importancia de penetrar en su ECM

El **cáncer** es un conjunto heterogéneo de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular rápido e incontrolado que altera la funcionalidad y estructura del tejido afectado. A su vez, las células anómalas pueden ir más allá de sus límites, invadiendo y colonizando otros tejidos y órganos. Este proceso se denomina metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer. El proceso de formación y progresión tumoral se debe a que las células cancerosas adquieren nuevas capacidades, a las que Hanahan y Weinberg denominaron «*hallmarks*» (Figura V.1). Esencialmente, los «*hallmarks*» del cáncer están modulados por 2 condiciones: inestabilidad genómica y alteración del SI.<sup>348,349</sup>

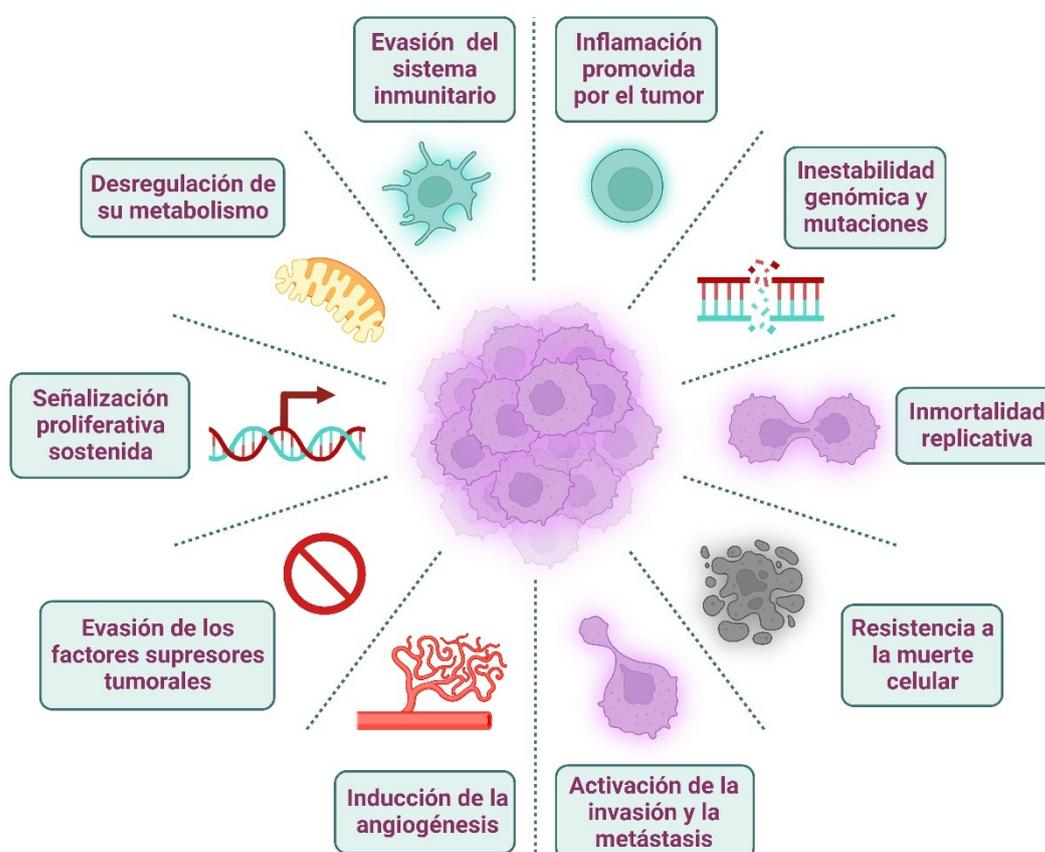
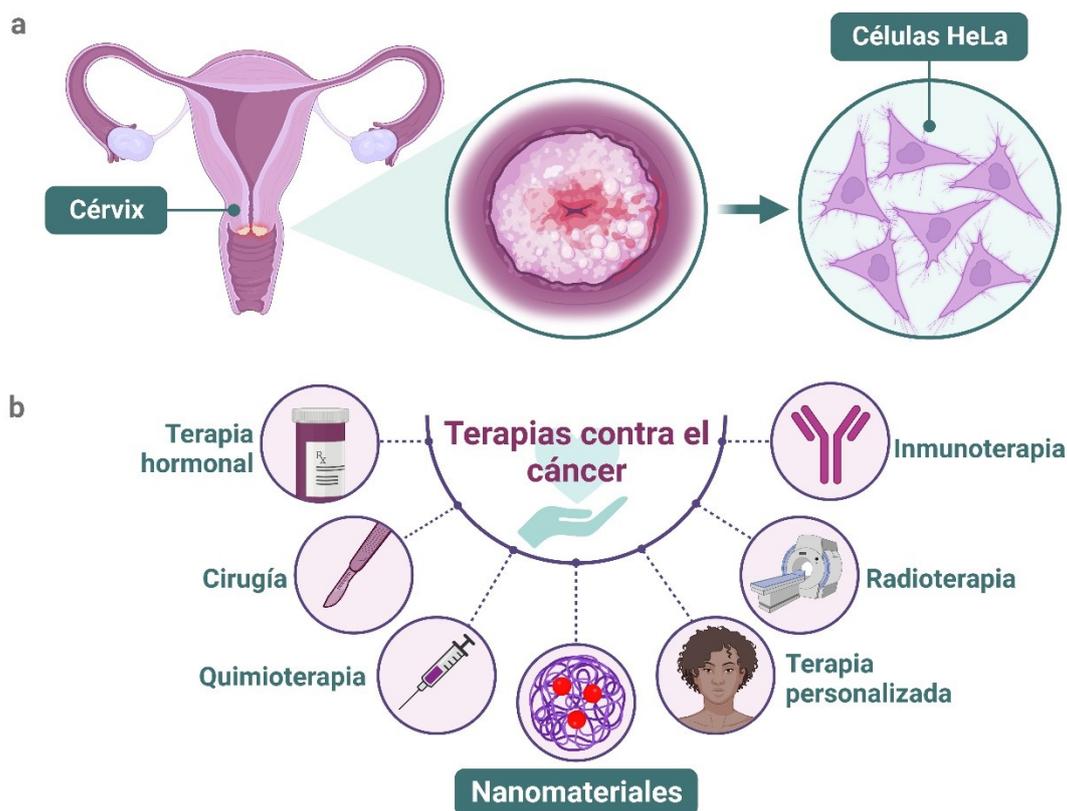


Figura V.1. «Hallmarks» del cáncer.

El cáncer es una de las **principales causas de morbilidad y mortalidad** en los países desarrollados, solo superada por las enfermedades cardiovasculares. A nivel global, cada año se diagnostican más de 18 millones de nuevos casos y se producen aproximadamente 9.9 millones de muertes. Desgraciadamente, se estima que ambos parámetros se incrementarán en los próximos años. En concreto, en el año 2022 en España, se han diagnosticado 290.294 nuevos casos y han fallecido 111.044 personas. Se prevé que en 2040 estas cifras aumenten hasta los 340.000 y 160.000 casos, respectivamente. El tipo de cáncer más común es el de mama (12.5 %), seguido por el de pulmón (12.2 %) y el de colon y recto (10.7 %). Sin embargo, el responsable de mayor mortalidad es el pulmonar (18 %), seguido por el colorrectal (9.4 %) y el hepático (8.3 %).<sup>350</sup>

El **cáncer de cérvix** ocupa el quinto puesto en la incidencia del cáncer en personas con aparato reproductor femenino (3.3 %) y causa el 3.4 % de las defunciones.<sup>350</sup> Este tipo de tumor sólido se origina en las células escamosas o en las células glandulares del cuello uterino (la porción inferior del útero que lo conecta con la vagina) y está asociado a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), **Figura V.2a**. Por ello, el cribado mediante citología y la vacunación frente al VPH son fundamentales para su detección precoz. No obstante, en los países subdesarrollados, la falta de prevención y la inaccesibilidad de las terapias incrementa la incidencia y mortalidad prematura de esta enfermedad neoplásica. De hecho, en esas áreas se detecta el 85 % de todos los casos reportados.<sup>351</sup>

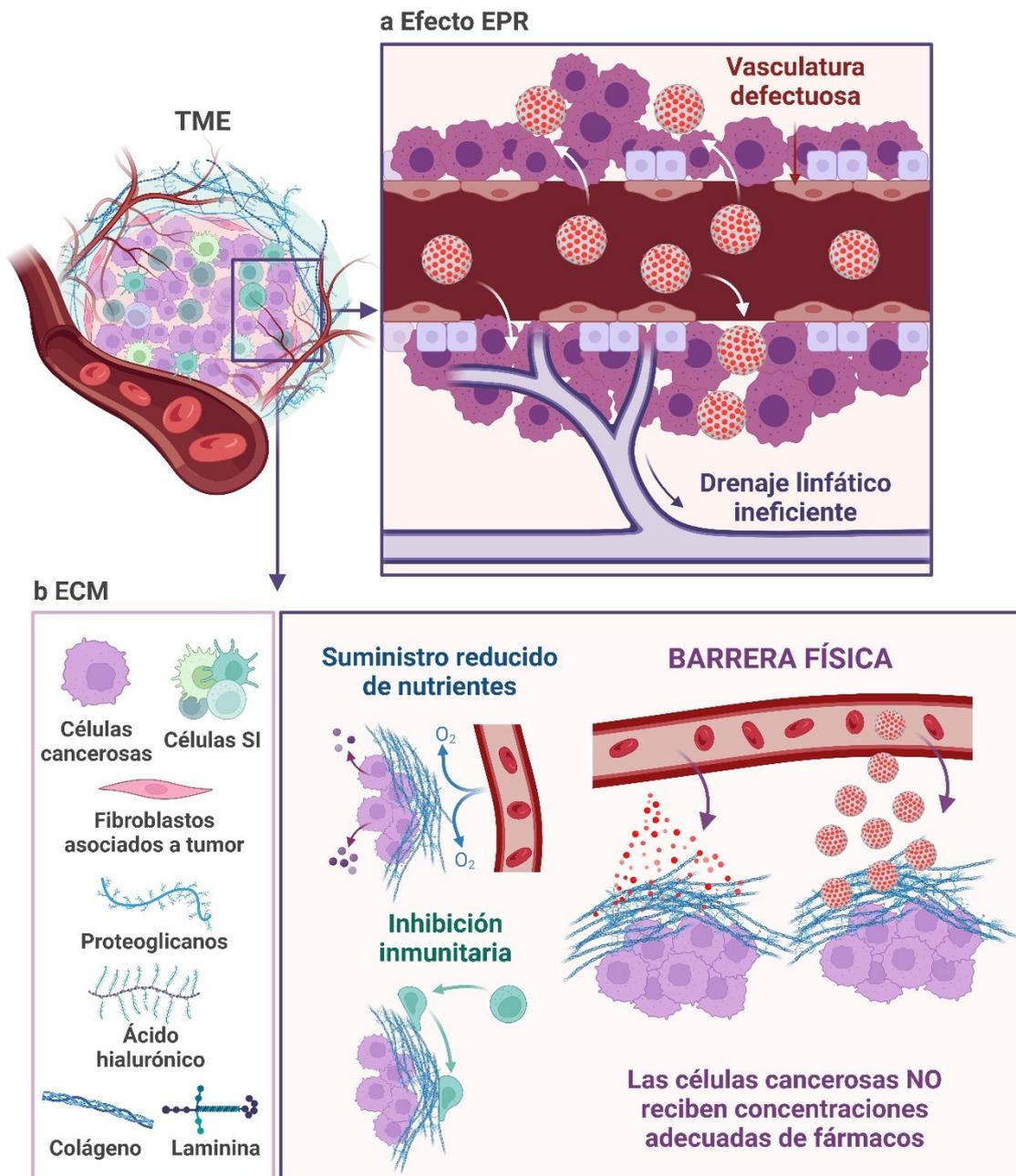
En general, el tratamiento contra el cáncer consiste en inhibir la capacidad proliferativa de las células malignas y en eliminarlas mediante radioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia, cirugía y/o quimioterapia. Uno de los agentes quimioterapéuticos más empleados es la **doxorrubicina**. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima topoisomerasa II, y, por tanto, de la replicación celular por medio de su intercalación en el ADN. Como efectos indeseados, esta droga causa cardiotoxicidad y neutropenia, y puede dar lugar a la aparición de resistencias.<sup>352</sup> En general, muchas de las terapias basadas en la administración de fármacos libres fracasan, provocando recidivas y graves perjuicios en la calidad de vida de los pacientes. Por estos motivos, se avanza cada vez más hacia el diseño de terapias personalizadas, como la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T)<sup>353</sup> y terapias basadas en nanomateriales,<sup>354,355</sup> **Figura V.2b**.



**Figura V.2.** a Cáncer de cérvix: descripción de su anatomía y localización. b Terapias anticancerígenas aplicadas en clínica.

Numerosos estudios demuestran que la encapsulación de los agentes quimioterapéuticos convencionales en nanopartículas mejora su perfil farmacocinético y su especificidad. Como consecuencia, se incrementa su índice terapéutico y se reducen los efectos adversos en tejidos sanos. Esas ventajas se deben en gran medida al **efecto EPR**, por el cual los nanodispositivos acceden al interior de los tumores debido a sus vasos sanguíneos hiper permeables y se acumulan en ellos debido su drenaje linfático disfuncional (**Figura V.3a**). Aunque el efecto EPR facilita la acción de las nanomedicinas, muchas de ellas no tienen éxito cuando se trasladan de estudios preclínicos en roedores a estudios clínicos en humanos.<sup>356</sup>

Una de las posibles causas es la **incapacidad de las nanopartículas pasivas para penetrar en la ECM de los tumores sólidos** tras su extravasación. Como se ha hecho mención en la introducción general (**Sección I.4.2**), la ECM es una barrera mecánica muy densa y rígida compuesta por polímeros extracelulares (principalmente colágeno, ácido hialurónico y otros proteoglicanos de elevado peso molecular) y líquido intersticial que obstaculiza la infiltración de drogas libres y encapsuladas en nanopartículas, de moléculas endógenas como el  $O_2$  y de células inmunitarias hasta las células malignas (**Figura V.3b**). Además de este efecto, la ECM de los tumores también retiene las señales proliferativas, evade las señales supresoras de crecimiento, favorece la resistencia a la apoptosis y la inmortalidad replicativa, promueve la angiogénesis y activa la invasión de otros tejidos. En conclusión, la ECM disfuncional contribuye a prácticamente todos los «*hallmarks*» del cáncer.<sup>357</sup> Por tanto, el desarrollo de estrategias que modulen el TME y, especialmente la ECM es de gran interés terapéutico.



**Figura V.3. Tumores sólidos. a** Efecto EPR, las nanopartículas se dirigen preferentemente a las masas tumorales. **b** La ECM impide el acceso al interior tumoral, reduciendo la eficacia de las terapias.

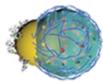
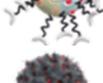
### V.3.2 Nanomotores para terapia oncológica: necesidad de emplear combustibles biocompatibles y biodisponibles

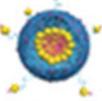
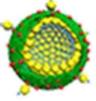
En este contexto, el diseño de nanopartículas avanzadas capaces de moverse de forma autónoma y de administrar fármacos a demanda tiene un potencial muy elevado para mejorar los tratamientos clásicos frente al cáncer. En comparación con la difusión pasiva dependiente del gradiente de concentración, el movimiento autopropulsado podría proporcionar la fuerza adicional requerida para que una vez nanodispositivos se han extravasado desde los vasos sanguíneos, se infiltren en el tejido tumoral alcanzando a las células cancerosas localizadas en las áreas más profundas.

Como se ha explicado en la introducción general (**Sección 1.5.3**), entre los nanomotores catalíticos, los basados en Pt y catalasa son los más comunes. Aunque la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y burbujas de O<sub>2</sub> es una estrategia de probada eficacia para inducir el movimiento de partículas, **el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un combustible tóxico que no se encuentra fácilmente disponible en la mayoría de los entornos biológicos**. Estos motores suelen requerir un suministro de altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno que pueden provocar daños en las estructuras celulares y estrés oxidativo, lo que dificulta su implementación práctica. No obstante, recientemente se han reportado algunos ejemplos de nanomotores accionados por los niveles tumorales endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (~100 μM).<sup>358</sup>

Aun así, encontrar otros **combustibles biocompatibles y biodisponibles**, es decir, no dañinos para las células y presentes de forma natural en el organismo en concentraciones relevantes, es una necesidad urgente. Los últimos avances incluyen el diseño de motores accionados por agua, ácido gástrico, aminoácidos, urea o **glucosa**. El uso de glucosa es de especial interés al ser la fuente esencial de energía metabólica en los seres vivos. Además, es abundante en la mayoría de los tejidos y actúa como indicador patológico, precursor biosintético y molécula de señalización. Sin embargo, a pesar de los progresos realizados, la mayoría de estos sistemas todavía presenta limitaciones. La principal sigue siendo la necesidad de suministrar externamente altas concentraciones de combustible. Otros inconvenientes son la carencia de control en la entrega de la carga, que se produce por simple difusión y la falta de demostración de su aplicabilidad en organismos vivos. En ese sentido, la **Tabla V.1** resume los ejemplos de nanomotores accionados químicamente aplicados para el tratamiento del cáncer *in vivo* publicados hasta la fecha. En ninguno de ellos se produce una liberación controlada y específica de los agentes terapéuticos.

**Tabla V.1. Lista de nanomotores catalíticos para terapia oncológica validados en modelos *in vivo*.**

DESCRIPCIÓN	COMBUSTIBLE	NANOARQUITECTURA Y COMPOSICIÓN	ESTRATEGIA ANTITUMORAL	REFERENCIA
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Dímero Janus (MnO <sub>2</sub> -Au)	Terapia gaseosa	359
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Dímero Janus (Ag-polímero)	Entrega de cisplatino	360
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Esfera Janus (SiO <sub>2</sub> -Pt)	Reversión de la hipoxia, depleción de Cu, PTT y PDT	361
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Esférica (Pt)	Entrega de Doxo	175
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nanovarilla Janus (Au-Pt)	Genotoxicidad	362
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y US	Esférica (MnO <sub>x</sub> -hidrogel)	Generación de ROS y activación del SI	363
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NIR	Esfera Janus (SiO <sub>2</sub> -Au-catalasa)	PDT	358

	Glucosa	Esférica (Nanoclústeres de Au-GOx-catalasa)	Reversión de la hipoxia	226
	Urea	Nanovarilla Janus (SiO <sub>2</sub> -hidroxiapatita-ureasa)	Digestión de la ECM y administración de Doxo	256
	NO	Forma de caja (heparina-ácido fólico)	Penetración en la ECM y administración de Doxo	364
	NO	Esférica (heparina-ácido fólico)	Digestión de la ECM e infiltración de células del SI	365
	NO	Esférica (polimérica)	Activación del SI	366
	H <sub>2</sub> O y H <sup>+</sup>	Tubular (CaO <sub>2</sub> -catalasa)	Reducción de la IFP y entrega de Doxo	367

## V.4 OBJETIVOS

El objetivo del presente capítulo es la aplicación del nanomotor **Janus Pt-MSN** desarrollado en el capítulo III para **penetrar en la ECM de los tumores sólidos**, gracias a su autopropulsión, y **eliminar las células cancerosas**, gracias a la entrega específica y localizada de una droga anticancerígena. Para ello, la cara de MSN va a actuar como nanocontenedor de Doxo y va a estar modificada externamente con la enzima GOx, unida covalentemente mediante enlaces amida. La GOx va a desempeñar una doble función. Por un lado, va a actuar como puerta molecular sensible a las proteasas celulares para controlar la liberación de la carga a demanda en el interior de las células malignas, mientras que, por otro lado, va a actuar como primer elemento de la **reacción híbrida en cascada que induce la autopropulsión del nanomotor**. La GOx realizará la transformación enzimática de glucosa en ácido glucónico y  $H_2O_2$  en la superficie de la sílice y, posteriormente, el Pt, segundo elemento, catalizará la descomposición del  $H_2O_2$  generado localmente por la enzima en  $H_2O$  y  $O_2$ .

El mecanismo de movimiento ideado se debe a la necesidad de emplear **combustibles biocompatibles y biodisponibles** para propulsar a nanomotores destinados a aplicaciones biomédicas, con el objetivo de no depender de la adición exógena de sustancias potencialmente dañinas para el organismo como el  $H_2O_2$ . Esperamos que el nanomotor diseñado muestre un comportamiento difusivo mejorado en respuesta a la **glucosa endógena** presente en el TME, dando lugar a una administración más profunda del fármaco en el tumor e induciendo, como consecuencia, la muerte de las células cancerosas.

Los subobjetivos específicos que se plantean en este capítulo son:

- La síntesis del nanomotor Janus Pt-MSN-(Doxo)-GOx ( $NM_{Doxo-GOx}$ ), así como de nanopartículas control privadas de alguna de sus propiedades fundamentales, *i.e.*, entrega de fármacos ( $NM_{GOx}$ ) y movimiento ( $NM_{Doxo-BSA}$  y  $NM_{Doxo-GOx-IN}$ ).
- La confirmación de la estructura y composición de  $NM_{Doxo-GOx}$  mediante las técnicas habituales de caracterización de nanopartículas.
- El estudio del comportamiento motor de  $NM_{Doxo-GOx}$  en respuesta a la adición de glucosa como combustible mediante NTA.
- El estudio de la capacidad de  $NM_{Doxo-GOx}$  para liberar Doxo al medio en respuesta a la presencia de enzimas proteolíticas mediante espectroscopía de fluorescencia.
- La evaluación de la capacidad antitumoral de  $NM_{Doxo-GOx}$  en 2 modelos *in vitro*: (i) cultivo 2D de células cancerosas HeLa y (ii) esferoides 3D del mismo tipo celular.
- La evaluación de la capacidad antitumoral de  $NM_{Doxo-GOx}$  *in vivo* en un modelo murino de xenoinjerto con células cancerosas HeLa.

## V.5 MATERIAL Y MÉTODOS

### V.5.1 Reactivos

Para la fabricación y evaluación de los nanomateriales se emplearon los siguientes reactivos químicos: CTAB, TEOS,  $H_2PtCl_6$ , PVP, ácido ascórbico, citrato sódico tribásico dihidratado, parafina, MPTMS, (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES), GOx de *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4), albúmina de suero bovino (BSA), EDC, NHS, proteasa de *Streptomyces griseus*, ABTS, HRP, ácido 6-aminohexanoico, diimida del ácido perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico, imidazol, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), TEA,  $NaHCO_3$ ,  $MgSO_4$ , Kit de aislamiento de lisosomas (LYSISO1), Hoechst 33342, reactivo de viabilidad celular WST-1, isoflurano, kit de detección de muerte celular y Mowiol/DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) adquiridos de Sigma Aldrich. Hidrocloruro de doxorrubicina ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ) adquirida de Carbosynth. Kit del ensayo del ácido bicinónico (BCA),  $H_2O_2$  (30 % v/v), PBS, GA, PFA y Matrigel, proporcionados por Thermo Fisher. DMEM, FBS y tripsina, proporcionados por Gibco-Invitrogen. Hidróxido de sodio, etanol, tolueno, diclorometano, cloroformo, DMSO, ACN y glucosa suministrados por Scharlau. Kit detección celular de ROS DCFDA-H2DCFDA (diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína) proporcionado por Abcam. OCT obtenido de VWR.

### V.5.2 Síntesis de nanopartículas

Para la preparación de **MSN**, **Pt** y **NM** se siguieron las indicaciones descritas en el capítulo III (Secciones III.5.2.1, III.5.2.2 y III.5.2.3).

#### V.5.2.1 Síntesis de $NM_{Doxo-GOx}$

La síntesis de  $NM_{Doxo-GOx}$  incluyó las siguientes etapas:

##### - *Funcionalización de NM con APTES ( $NM_{APTES}$ )*

El primer paso fue la funcionalización de la superficie de la parte mesoporosa de NM con grupos amino. Para ese fin, se preparó una suspensión de 25 mg de NM en 3 mL de ACN y se añadieron 25  $\mu$ L de APTES a la mezcla. La reacción se agitó magnéticamente durante 5.5 h. Después, el sólido resultante,  $NM_{APTES}$ , se lavó varias veces (centrifugaciones a 13.500 rpm, 3 min) con ACN, etanol y PBS (100 mM, pH 7.5).

##### - *Cargado de $NM_{APTES}$ con Doxo ( $NM_{Doxo}$ )*

Para el proceso de cargado de  $NM_{APTES}$ , se preparó una disolución de 12.5 mg de Doxo en 3 mL de PBS y se añadió sobre el sólido. La reacción se mantuvo en oscuridad y agitación magnética durante 24 h. Tras ello, el sólido resultante,  $NM_{Doxo}$ , se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min).

##### - *Funcionalización de $NM_{Doxo}$ con GOx*

Para finalizar la construcción de la puerta molecular, en primer lugar, se activaron los grupos ácido de la enzima GOx para poder reaccionar con los grupos amino presentes en la superficie de  $NM_{Doxo}$ . Para ello, se disolvieron 6.25 mg de GOx en 3 mL de PBS (100 mM, pH 6) y se añadió la misma cantidad de EDC y NHS a la mezcla. La reacción se mantuvo bajo agitación

magnética durante 30 min a 4 °C. Después, la enzima activada se dializó en unidades de filtración para centrífuga Amicon Ultra-05 de 3kDa (13.500 rpm, 5 min) y se lavó 3 veces con PBS frío (100 mM, pH 7.5). A continuación, ésta se combinó con 25 mg de  $\text{NM}_{\text{Doxo}}$  en 3 mL de PBS (100 mM, pH 7.5). En este punto, se añadió una punta de espátula de Doxo para evitar la salida de la carga. La reacción se agitó magnéticamente en oscuridad durante 24 h a 4 °C. Por último, el nanomotor final,  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ , se aisló por centrifugación (13.500 rpm, 3 min) y se lavó con PBS por el mismo método, hasta la desaparición del color rojo característico de la Doxo libre.

#### V.5.2.2 Síntesis de $\text{NM}_{\text{GOx}}$

El procedimiento seguido para sintetizar el nanomotor control sin el efecto anticancerígeno de la Doxo,  $\text{NM}_{\text{GOx}}$ , fue similar al de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ , pero se omitió el paso de cargado con el fármaco. 25 mg de  $\text{NM}_{\text{APTES}}$  reaccionaron con 6.25 mg de GOx activada en 3 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) durante una noche a 4 °C.

#### V.5.2.3 Síntesis de $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$

Para sintetizar una de las nanopartículas control sin movimiento,  $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$ , se empleó BSA en lugar de GOx. Una proteína que actúa como puerta molecular, pero no como elemento motor al no presentar actividad catalítica. 25 mg de  $\text{NM}_{\text{Doxo}}$  reaccionaron con 6.25 mg de BSA activada en 3 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) durante una noche a 4 °C.

#### V.5.2.4 Síntesis de $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$

Otra de las nanopartículas control sin movimiento,  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$ , se preparó inactivando la actividad catalítica de la GOx mediante calor. Para ello, se incubó el nanomotor final  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  a 70 °C durante 1 h.

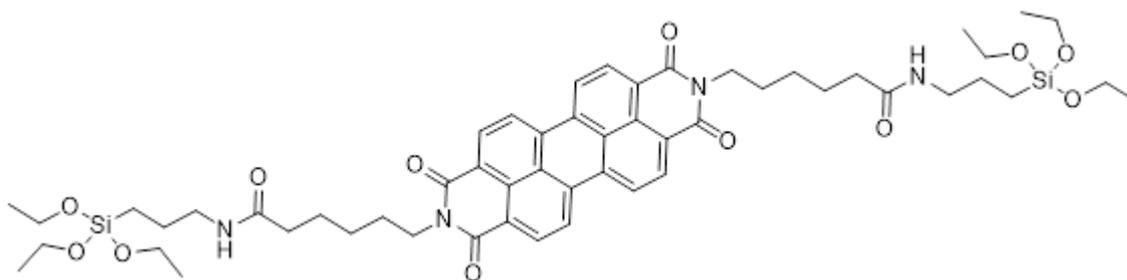
#### V.5.2.5 Síntesis de $\text{NM}_{\text{PA-GOx}}$ y $\text{NM}_{\text{PA-GOx-IN}}$

Los nanomotores,  $\text{NM}_{\text{PA-GOx}}$ , están modificados con un fluoróforo resistente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  para posibilitar su visualización por CLSM.

##### - *Síntesis del fluoróforo (PA)*

En primer lugar, se realizó la síntesis del fluoróforo, que consistía en un derivado diimida de dianhídrido 3,4,9,10-perileno-tetracarboxílico (PTDA) modificado con APTES (PA). En un primer paso de reacción, se mezclaron 2.81 g de ácido 6-aminohexanoico (21 mmol) con 4.04 g de PTDA (10 mmol) y 28 g de imidazol, y la mezcla se calentó a 120 °C durante 1 h bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a 90 °C y se diluyó con DI. La solución de color rojo oscuro resultante se filtró y se acidificó con HCl 2 M hasta pH 3-4. El sólido resultante se aisló por filtración y se secó a vacío, obteniendo la diimida PTDA.<sup>368</sup> En un segundo paso de reacción, el sólido se mezcló con 85.57  $\mu\text{L}$  de APTES (0.362 mmol), 8.12 mg de DMAP (0.066 mmol), 77.27 mg de EDC (0.392 mmol) y 55.61  $\mu\text{L}$  de TEA (0.395 mmol) en 10 mL de diclorometano. La reacción se agitó magnéticamente durante 4 días a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadieron 10 mL de cloroformo y se realizaron lavados con 20 mL de  $\text{NaHCO}_3$  (5 %) y 20 mL de DI.<sup>369</sup> A continuación, la fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y, finalmente, se eliminó el

disolvente en un evaporador rotativo, obteniendo el compuesto final de color naranja ( $\lambda_{exc} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ ), **Figura V.4**.



**Figura V.4. Estructura molecular del fluoróforo PA.**

#### - Funcionalización de NM con PA

Para el anclaje de PA a la superficie de los nanomotores, se suspendieron 5 mg de  $\text{NM}_{\text{APTES}}$  en 2 mL de cloroformo y se añadieron 5 mg del producto (1 mmol). La reacción se mantuvo en agitación magnética durante 5.5 h. Después, los nanomotores se lavaron por centrifugación (13.500 rpm, 3 min) con cloroformo, etanol y PBS (100 mM, pH 7.5) varias veces. Por último, el anclaje de la enzima se realizó en las mismas condiciones descritas para  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ . También se prepararon nanopartículas control no móviles,  $\text{NM}_{\text{PA-GOx-IN}}$ . En ese caso, se siguió el mismo protocolo sintético, pero en último lugar la actividad enzimática fue inactivada por calor.

Todas las nanopartículas sintetizadas se conservaron a 4 °C suspendidas en 1 mL de PBS estéril (100 mM, pH 7.5) hasta su uso.

### V.5.3 Técnicas de caracterización de nanomateriales

Para caracterizar las nanopartículas sintetizadas en este capítulo se utilizaron las siguientes técnicas: HR-TEM, STEM-EDX, PXRD, adsorción-desorción de  $\text{N}_2$ , FTIR, TGA, DLS, espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia. Las muestras fueron preparadas en las mismas condiciones que en los capítulos III y IV, y se emplearon los mismos equipos y métodos de análisis.

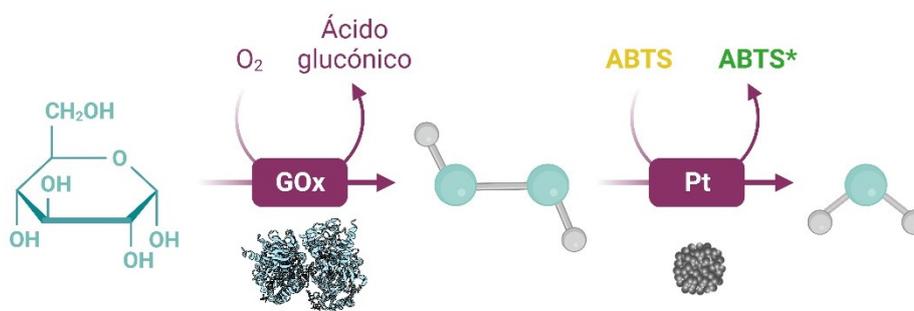
#### V.5.3.1 Determinación de la cantidad de enzima

Para determinar la cantidad de enzima unida a las nanopartículas se realizó el ensayo BCA.<sup>370</sup> Se basa en que las proteínas reaccionan con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino formando un quelato. En un segundo paso, el  $\text{Cu}^{1+}$  generado reacciona con BCA formando un complejo de color morado detectable por espectroscopía de absorción UV-visible. En este ensayo se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución proporcionada por el kit (B/A, relación 1:50) con 10  $\mu\text{L}$  de las nanopartículas (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) y se incubaron durante 10 min a 60 °C. De forma paralela, se preparó una curva de calibrado con concentraciones conocidas de proteína (de 1 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS 100 mM, pH 7.5) y se sometió al mismo procedimiento. Por último, se midió la absorbancia ( $\lambda_{abs} = 570 \text{ nm}$ ) y se calculó la cantidad de GOx o BSA unida a los nanodispositivos mediante interpolación en la curva de calibrado.

## V.5.4 Caracterización del movimiento inducido por glucosa

### V.5.4.1 Ensayo de actividad enzimática GOx

Antes de estudiar el movimiento inducido por glucosa, se confirmó que la GOx inmovilizada en los nanomotores mantenía su capacidad de producir  $H_2O_2$  a partir de glucosa. Para ello, se realizó un ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática basado en la capacidad del  $H_2O_2$  para oxidar ABTS a  $ABTS^*$  ( $\lambda_{abs} = 405 \text{ nm}$ ) en presencia de Pt (**Reacción V.1**).<sup>371</sup> Se prepararon soluciones de glucosa ( $180 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y ABTS ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en DI. A continuación, se mezclaron  $250 \mu\text{L}$  de cada una de ellas en una cubeta de cuarzo y se añadieron  $10 \mu\text{L}$  de PBS o de una suspensión de nanopartículas ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en PBS  $100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ). Tras agitar las muestras, se registró la absorbancia ( $\lambda_{abs} = 405 \text{ nm}$ ) en función del tiempo ( $2 \text{ min a } 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Para calcular la actividad enzimática se aplicó la **Ecuación V.1**. Adicionalmente, se confirmó la actividad peroxidasa de  $NM_{Doxo-GOx}$  mediante el procedimiento descrito en el capítulo III (**Reacción III.1**, **Ecuación III.12**).



**Reacción V.1. Ensayo enzimático de actividad GOx.**

$$\text{Actividad GOx (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{(\Delta_M - \Delta_C) \cdot V_T \cdot FD}{\epsilon_{ABTS} \cdot l \cdot V_M \cdot C_M}$$

**Ecuación V.1. Actividad GOx.** Donde  $\Delta_M$  es la pendiente del gráfico ( $\text{min}^{-1}$ ),  $\Delta_C$  es la pendiente del gráfico en ausencia de nanopartículas,  $V_T$  es el volumen total,  $FD$  es el factor de dilución,  $\epsilon_{ABTS}$  es el coeficiente de extinción molar del ABTS a  $405 \text{ nm}$  ( $36.87 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $l$  es el paso óptico de la cubeta ( $1 \text{ cm}$ ),  $V_M$  es el volumen de muestra añadido ( $\text{mL}$ ) y  $C_M$  es la concentración de la muestra ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### V.5.4.2 Cálculo del MSD y el $D_0/D_{eff}$

Para caracterizar el movimiento derivado de la descomposición de glucosa se empleó el dispositivo Nanosight NS300. En este caso se estudió la autopropulsión de  $NM_{Doxo-GOx}$  y de las diferentes nanopartículas control pasivas ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en presencia de concentraciones crecientes de glucosa ( $0, 2.5, 5, 10, 15$  y  $25 \text{ mM}$ ). Para cada una de ellas, se grabaron 5 vídeos de  $30 \text{ s}$  a una velocidad de  $30 \text{ fps}$ , de los que extrajeron las coordenadas espaciales de cada nanopartícula de forma individual. Basándose en esta información, el software NTA 3.0 calculó su MSD (**Ecuación III.2**) asumiendo que el movimiento era bidimensional. También se utilizó nuestro código R para obtener el  $D_{eff}$  de los nanomotores y el  $D_0$  de las nanopartículas control y de los nanomotores sin combustible, representando linealmente el MSD frente al  $\Delta t$  ( $1 \text{ s}$ ) y aplicando la **Ecuación III.5**. Este análisis se aplicó a 50 nanodispositivos con dimensiones similares a las obtenidas por DLS (entre  $250$  y  $350 \text{ nm}$ ). Siguiendo el mismo método se representaron las trayectorias espaciales de los nanodispositivos. Además, también se estudiaron las habilidades

motoras de  $NM_{Doxo-GOx}$  en respuesta a la combinación de glucosa y  $H_2O_2$  (5 mM y 100  $\mu M$ , respectivamente).

#### V.5.4.3 Estudio del movimiento en un entorno similar a la ECM

Para demostrar la capacidad de los nanomotores para autopropulsarse en un entorno complejo, se realizó un análisis por CLSM en un medio que simula el microentorno de la ECM. Se empleó un dispositivo microfluídico ( *$\mu$ -Slide VI 0.5 Glass Bottom*, adquirido en Ibidi), cuyos canales se incubaron con Matrigel (diluido 1:3 en DMEM sin glucosa). Posteriormente se añadieron los nanodispositivos  $NM_{PA-GOx}/NM_{PA-GOx-IN}$  (0.25 mg mL<sup>-1</sup> en PBS 100 mM, pH 7.5) y glucosa (5 o 15 mM) o PBS en el pocillo situado en el extremo del canal. Tras 10 min, se adquirieron imágenes del todo el canal (magnificación de 10 x). Los análisis de imagen se realizaron con el software ImageJ.

#### V.5.5 Ensayos de liberación

Para los ensayos de liberación controlada de la carga *in vitro*, se preparó una suspensión de 1 mg de  $NM_{Doxo}/NM_{Doxo-GOx}$  en 2 mL de PBS (100 mM, pH 7.5) y se separó en 2 fracciones. Las suspensiones se dispusieron en un agitador (Thermo-shaker HC24N Grant Instruments, 14.000 rpm) a 37 °C durante 30 min. Pasado ese tiempo, en uno de los tubos se añadió 1 mg de proteasa de *Streptomyces griseus*. A diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 min) las mezclas se centrifugaron para eliminar los nanomotores (13.500 rpm, 3 min) y se midió la absorbancia ( $\lambda_{abs} = 495$  nm) o la señal fluorescente ( $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 555$  nm) de la Doxo liberada al medio.

Además, este ensayo también se realizó en un medio que simula el microambiente del compartimento endocítico celular (donde se localizan las proteasas que inducirán la apertura de la puerta molecular). Para ello, se empleó extracto lisosomal purificado extraído de hígado fresco de conejo usando el kit LYSIS01 (diluido en proporción 1:4 en PBS 100 mM, pH 7.5). El procedimiento seguido fue similar al explicado previamente, pero las medidas se registraron a tiempos mayores (5, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 min).

En este caso no se realizaron ensayos de liberación en condiciones estáticas porque el estímulo que induce la apertura de la puerta molecular (proteasa) también provocaría la degradación del primer elemento motor (GOx).

##### V.5.5.1 Determinación de la carga

Para cuantificar la cantidad de Doxo encapsulada en las diferentes nanopartículas se realizaron ensayos de liberación forzada. En cada caso, se prepararon suspensiones de 0.5 mg de nanopartículas en 1 mL de DMSO. Éstas, se mantuvieron bajo agitación magnética durante 24 h en oscuridad y se centrifugaron para eliminar las nanopartículas (13.500 rpm, 3 min). Por último, se midió la absorbancia del sobrenadante ( $\lambda_{abs} = 495$  nm). La concentración de Doxo se obtuvo aplicando la Ley de Lambert-Beer (**Ecuación V.2**).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

**Ecuación V.2. Ley de Lambert-Beer.** Donde A es la absorbancia a 495 nm,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la Doxo (9.25 mM cm<sup>-1</sup>), c es la concentración de Doxo y l es el paso óptico de la cubeta (cm).

## V.5.6 Ensayos *in vitro*

### V.5.6.1 Cultivo de células cancerosas 2D

#### - *Línea celular y condiciones de cultivo*

Para los experimentos *in vitro* se empleó la línea celular HeLa, derivada de cáncer de cérvix de origen humano y adquirida en la DSMZ. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS, se incubaron en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C y se sometieron a pases 2 veces por semana.

#### - *Evaluación de la internalización celular*

Para confirmar la internalización celular de los nanomotores se empleó TEM. Las células HeLa se sembraron en un portaobjetos a una densidad de 350.000 células mL<sup>-1</sup> y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h para adherirse a la placa. A continuación, se trataron con NM<sub>60x</sub> a una concentración de 50 µg mL<sup>-1</sup> durante 30 min y posteriormente se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.5). Tras una incubación de 24 h en las condiciones habituales, las células se fijaron. Para ello, se añadió una solución de GA al 3 % durante 2 h a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con PB (100 mM) y se deshidrataron en etanol. Para finalizar, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 1 % y tetraóxido de osmio al 1 %, se incluyeron en resina epoxi (Araldite) y se seccionaron en cortes de 50-70 nm. Las imágenes de TEM de células y tejidos se obtuvieron con un microscopio FEI Tecnai Spirit G2 que funcionaba a 80 kV con una cámara digital (*Soft Image System*, Morada).

#### - *Ensayos de toxicidad*

Para evaluar la toxicidad de las nanopartículas sobre las células cancerosas, se realizaron ensayos WST-1. Además, para estudiar el efecto indirecto del movimiento sobre la viabilidad celular, éstos se llevaron a cabo en medio celular estándar DMEM (concentración de glucosa estipulada: 25 mM) y en medio sin glucosa. Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 35.000 células mL<sup>-1</sup> en DMEM (glucosa 25 mM) y se incubaron durante 24 h según los parámetros habituales para adherirse a la placa. Pasado ese tiempo, se añadieron los nanomotores y las distintas nanopartículas control a concentraciones de 0 a 15 µg mL<sup>-1</sup> en el medio pertinente en cada caso (DMEM con glucosa 25 mM o DMEM sin glucosa). Los tratamientos se incubaron durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, las nanopartículas no internalizadas se eliminaron mediante un paso de lavado con PBS (100 mM, pH 7.5) y las células se incubaron en las condiciones habituales 24 h. Finalmente, se añadió WST-1, se incubó durante 1 h y se midió la señal de absorbancia a 440 nm en un lector Perkin Elmer Life Sciences Wallac Victor2<sup>TM</sup>. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo mediante la **Ecuación III.13**.

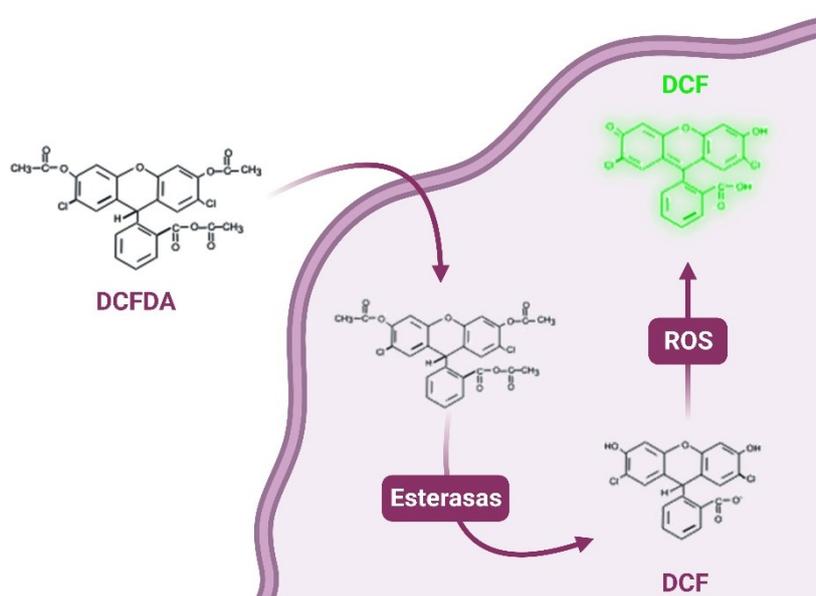
#### - *Ensayo de detección de ROS*

La generación de ROS inducida por el tratamiento con los nanomotores se evaluó utilizando la sonda fluorescente de detección de ROS, DCFDA-H<sub>2</sub>DCFDA. Su funcionamiento se basa en la capacidad del DCFDA para difundir hasta el interior de las células. Una vez en el citosol, se desacetila por la acción de las esterasas celulares y se oxida por las ROS generando 2',7'-

diclorofluoresceína (DCF), un compuesto altamente fluorescente ( $\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 529 \text{ nm}$ ),

**Reacción V.2.**

Se sembraron células HeLa en una placa de 6 pocillos a una densidad de  $170.000 \text{ células mL}^{-1}$  en DMEM con glucosa y se incubaron 24 h a  $37 \text{ °C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Después de adherirse a la placa, el medio de la mitad de los pocillos se sustituyó por DMEM sin glucosa. Las células se trataron con  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  ( $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 30 min. A continuación, se lavaron con PBS (100 mM, pH 7.5) y se incubaron durante 30 min o 1 h. En ese momento, se añadió DCFDA ( $5 \text{ } \mu\text{M}$  en PBS 100 mM, pH 7.5) y se incubó durante 30 min. Tras ese tiempo, se retiró la sonda de detección de ROS, se añadió el medio apropiado a los pocillos y se incubaron a  $37 \text{ °C}$  durante otros 30 min para estabilizar la señal de fluorescencia. Por último, se añadió Hoechst ( $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se obtuvieron las imágenes por CLSM (magnificación de 63 x) en un microscopio invertido Leica TCS SP8 AOBS.



**Reacción V.2. Ensayo DCFDA-H2DCFDA para la detección de ROS.**

### V.5.6.2 Esferoides tumorales 3D

#### - Formación de los esferoides tumorales 3D

Para preparar esferoides multicelulares HeLa, seguimos las directrices de la bibliografía con algunas modificaciones.<sup>372</sup> En primer lugar, se recubrió cada pocillo de una placa de 96 pocillos con  $50 \text{ } \mu\text{L}$  de agarosa al 1.5 % en PBS (100 mM, pH 7.5) para formar una superficie cóncava. Sobre la cavidad generada se sembraron  $200 \text{ } \mu\text{L}$  de células HeLa a una densidad de  $10.000 \text{ células mL}^{-1}$  y se incubaron a  $37 \text{ °C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 4 días. Por último, la formación satisfactoria de los esferoides tumorales 3D se confirmó por microscopía óptica.

#### - Evaluación de la penetración de los nanomotores en esferoides tumorales 3D

Por un lado, la penetración de los nanomotores en esferoides tumorales se evaluó por TEM. Para esto, se siguió el mismo protocolo que en cultivo celular 2D, pero se comparó el tratamiento con NM y  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  (concentración de  $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Además, la fijación se llevó a cabo

con una mezcla de GA al 2.5 % y PFA al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente y, posteriormente, durante 24 h a 4 °C. Para estimar el número de nanopartículas por célula, se empleó el contador de ImageJ cuantificando al menos 5 imágenes por grupo experimental.

Por otro lado, la penetración de los nanomotores también se estudió por CLSM. En este caso, los esferoides se trataron con  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  o  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$  ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 24 h. Después, se añadió Hoechst ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , incubación durante 3 h) y se obtuvieron las imágenes por CLSM en un microscopio multi fotónico Leica TCS SP8 MP. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ. Obsérvese que, debido a la alta densidad y compacidad de los esferoides, con esta técnica sólo se pudo visualizar aproximadamente un tercio de la estructura total.

#### - *Ensayo de toxicidad*

Para estudiar el efecto citotóxico de los nanomotores en este modelo, los esferoides tumorales se incubaron con las distintas nanopartículas (concentraciones de 0 a  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en DMEM alto en glucosa suplementado con 10 % FBS a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 24 h. Al día siguiente, se incubaron con WST-1 durante 3 h y se registró la absorbancia a 440 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó aplicando la **Ecuación III.13**

### V.5.7 Ensayos *in vivo*

#### V.5.7.1 Modelo animal

En estos ensayos se emplearon ratones hembra Balb/c inmunodeprimidos de 6 semanas (cepa Balb/c nude OlaHsd-Foxn1). Los animales fueron adquiridos en *Charles River Laboratories* y permanecieron en las instalaciones del CIPF en una sala a temperatura controlada dentro de jaulas de polietileno ventiladas. Se les administró comida y agua *ad libitum*, y se les sometió a ciclos alternos de luz/oscuridad de 12 h de duración. Los ratones fueron tratados de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal del CIPF (2021\_06) y por el Comité Ético de Investigación y Bienestar Animal de la Generalitat Valenciana, Conselleria d'Àgricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural (2021/VSC/PEA/0070).

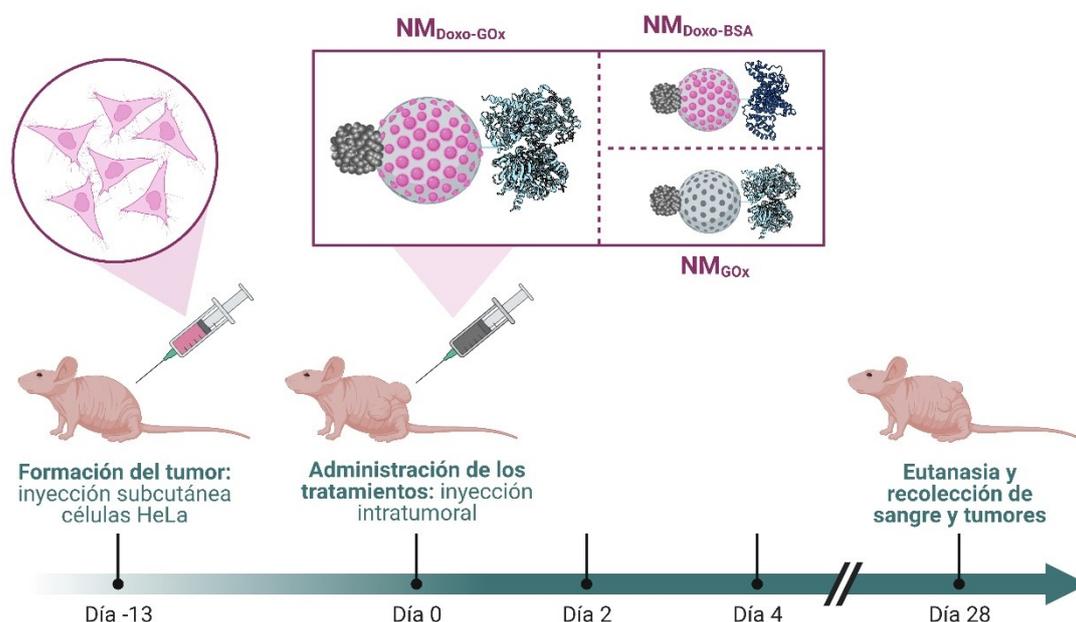
#### V.5.7.2 Formación de los tumores y administración de los tratamientos

Para establecer el modelo murino de xenoinjerto, se inyectó 1 millón de células cancerosas HeLa en ambos flancos de cada ratón. Para la intervención quirúrgica, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y las células se inyectaron por vía subcutánea (suspendidas en DMEM y Matrigel relación 1:1, volumen de inyección  $100 \mu\text{L}$ ). A continuación, los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos formados por 3 individuos con 2 tumores cada uno ( $n = 6$ ). El tamaño tumoral se monitorizó con un calibre electrónico cada 2 días. El volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) se estimó mediante la **Ecuación V.3**.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{(\text{longitud} \cdot (\text{anchura}^2))}{2}$$

**Ecuación V.3. Volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ).**

Cuando los tumores fueron visibles (volumen de 25 mm<sup>3</sup> aproximadamente, día 13 tras la inoculación de las células HeLa, en adelante día 0) comenzaron los tratamientos. Los grupos experimentales fueron: nanomotor final, NM<sub>Doxo-GOx</sub>; nanomotor control sin Doxo, NM<sub>GOx</sub>; nanopartícula control pasiva, NM<sub>Doxo-BSA</sub>; y control no tratado (PBS 100 mM, pH 7.5), vehículo. Hay que destacar que sólo se seleccionó una nanopartícula control no móvil representativa entre las diversas sintetizadas para reducir el número de animales necesario. Los distintos nanodispositivos se administraron mediante inyección en el tumor a una dosis de 15 µg ratón<sup>-1</sup> (volumen de inyección 25 µL tumor<sup>-1</sup>, en PBS 100 mM, pH 7.5) dos veces por semana. La dosis de NM<sub>Doxo-BSA</sub> se ajustó en función de la cantidad de Doxo encapsulada. El día 28, los animales fueron sacrificados mediante atmósfera de CO<sub>2</sub> y se recogieron sangre y tumores para los posteriores análisis (Figura V.5). El peso y el bienestar de los animales se evaluaron durante todo el procedimiento experimental según los criterios de la escala de Morton y Griffiths.



**Figura V.5. Representación gráfica de la terapia antitumoral con NM<sub>Doxo-GOx</sub> y las diferentes nanopartículas control (NM<sub>GOx</sub> y NM<sub>Doxo-BSA</sub>) en un modelo murino de xenoinjerto constituido por ratones Balb/c inmunodeprimidos a los que se le implantaron células HeLa.**

### V.5.7.3 Evaluación de la penetración de los nanomotores en tumores

La penetración de NM<sub>Doxo-GOx</sub> y NM<sub>Doxo-BSA</sub> en tumores se evaluó por TEM. El protocolo seguido fue el mismo que en esferoides, pero los tumores recogidos se dividieron previamente en secciones rectangulares de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> (n = 4). Para estimar el número de nanopartículas por célula en los cortes tumorales, se empleó el programa ImageJ cuantificando al menos 5 imágenes por grupo experimental.

### V.5.7.4 Evaluación de la liberación de Doxo en tumores

La capacidad de NM<sub>Doxo-GOx</sub> y NM<sub>Doxo-BSA</sub> para entregar Doxo *in vivo* se evaluó por CLSM. Para ello, los tumores extirpados se lavaron con PBS (100 mM, pH7.5) y se fijaron con PFA al 4 % durante 24 h a 4 °C. Después, se lavaron con PBS y se embebieron en una solución de «*optimal cutting temperature*» (OCT) en criomoldes. A continuación, se congelaron completamente a

- 20 °C y se cortaron en criosecciones de 10  $\mu\text{m}$ . Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando Mowiol/DAPI (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en oscuridad y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio un microscopio invertido Leica TCS SP8 AOBS ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$ , aumentos de 20 x y 63 x). La intensidad media de fluorescencia se determinó escaneando las secciones tumorales en un equipo Aperio Versa 200 (aumento de 10 x) y cuantificando 3 regiones aleatorias con el software Aperio Image Scope, (n = 4).

#### V.5.7.5 Evaluación de la muerte celular en tumores

La capacidad de las distintas nanopartículas para inducir apoptosis en tumores, se evaluó mediante un ensayo TUNEL por CLSM. Para ello, los tumores se sometieron al procedimiento explicado previamente. Las secciones tumorales, se fijaron, permeabilizaron y marcaron fluorescentemente de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el fabricante del kit de detección de muerte celular. Para el montaje y tinción nuclear se empleó Mowiol/DAPI (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en oscuridad. Las imágenes se tomaron en un microscopio invertido Leica TCS SP8 AOBS ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$ , aumentos de 20 x y 63 x). Finalmente, las secciones tumorales se escanearon con el equipo Leica Aperio Versa 200 (aumento de 10 x). Para determinar los niveles de células apoptóticas se usó el programa Aperio Image Scope seleccionando aleatoriamente 3 zonas de cada muestra, (al menos 3 de secciones de n = 4 tumores).

#### V.5.7.6 Evaluación de la generación de ROS en tumores

Para detectar la generación de ROS *in vivo* se empleó el mismo ensayo que en cultivo celular (**Reacción V.2**). Las muestras tumorales se pesaron, se disgregaron mecánicamente en PBS y se incubaron con la sonda DCFDA (5  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min a 37 °C. La señal fluorescente se monitorizó en un lector Perkin Elmer Life Sciences Wallac Victor2<sup>TM</sup>. Los resultados se normalizaron de acuerdo con el porcentaje de células vivas obtenido por TUNEL, (n = 4).

#### V.5.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 9.0.2. La comparación entre los distintos grupos se realizó mediante la prueba ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Turkey o la comparación múltiple de Dunnett. Los valores p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos y se indicaron con asteriscos (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001). Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM o SD de al menos 3 experimentos. Excepto en el ensayo *in vivo*, en el que se realizó un único experimento representativo en el que se asignaron aleatoriamente 3 animales con 2 tumores cada uno en cada grupo (n = 6).

## V.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.6.1 Diseño y síntesis del nanomotor

Para abordar el objetivo de este capítulo, superar la ECM de los tumores sólidos para facilitar la entrega de fármacos anticancerígenos en las células diana, se decidió partir de NM como plataforma inorgánica por sus idóneas habilidades ya discutidas a lo largo del documento (movimiento y control de la liberación). No obstante, para superar la mayor limitación de NM: esto es, la dependencia de la adición exógena de  $H_2O_2$  (un compuesto tóxico a altas concentraciones) para autopropulsarse, se ha diseñado un nanomotor híbrido metálico-enzimático. Está basado en la funcionalización de la cara de MSN de NM con la enzima GOx (unida covalentemente mediante enlaces amida). El mecanismo de propulsión propuesto consiste en la combinación de la actividad de la GOx<sup>216</sup> con la actividad peroxidasa de NM. Así, la enzima transforma glucosa en  $H_2O_2$  y éste es descompuesto sucesivamente por la cara de Pt en  $H_2O$  y  $O_2$ . Además, la GOx también actúa como puerta molecular sensible a enzimas induciendo la liberación de la carga encapsulada en los mesoporos de NM en respuesta a la actividad de las proteasas lisosomales. La droga anticancerígena seleccionada es Doxo por su amplio uso clínico en el tratamiento distintos tipos de cáncer.<sup>352</sup>

Confiamos en que la autopropulsión a consecuencia de la catálisis secuencial de la glucosa endógena presente en el TME resulte en una mayor penetración de NM en la ECM de los tumores sólidos, y que la liberación específica de Doxo en el citosol celular induzca la muerte de las células cancerosas alojadas en ellos, con el objetivo de reducir la progresión del cáncer.

En la **Figura V.6** se representan las etapas de síntesis de  $NM_{Doxo-GOx}$ :

- i. Primero, se sintetizó la plataforma inorgánica NM a partir de Pt y MSNs, siguiendo el método de emulsión de Pickering (**Figuras III.4, III.5 y III.6**).
- ii. La cara de MSN se funcionalizó con APTES.
- iii. Los mesoporos de la cara de MSN se cargaron con Doxo.
- iv. Para finalizar, se ancló la enzima GOx a la cara de MSN mediante enlaces amida entre los grupos carboxilo de la enzima y los grupos amino aportados por el APTES, constituyendo la puerta molecular sensible a actividad proteolítica y el primer elemento de la cascada motil.

Todas las nanopartículas empleadas en este capítulo se ilustran en la **Tabla V.2**.

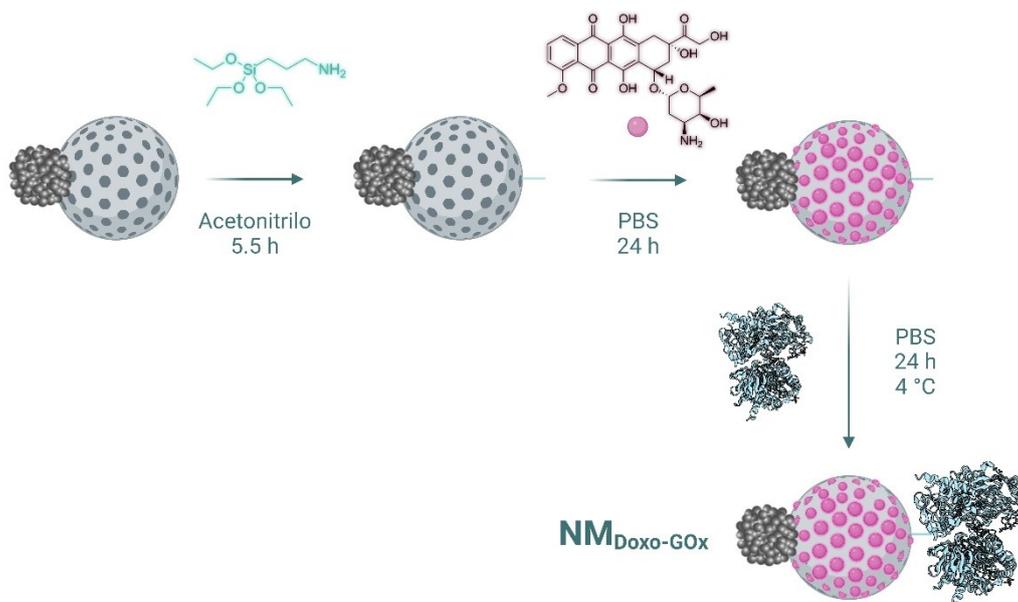
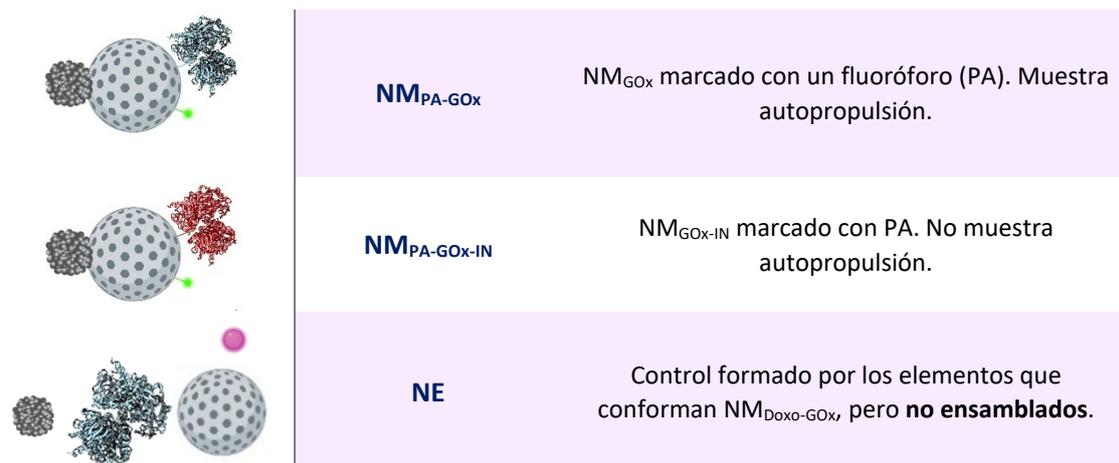


Figura V.6. Representación esquemática de la síntesis de NM<sub>Doxo-GOx</sub>.

Tabla V.2. Resumen de las nanopartículas empleadas en el capítulo V.

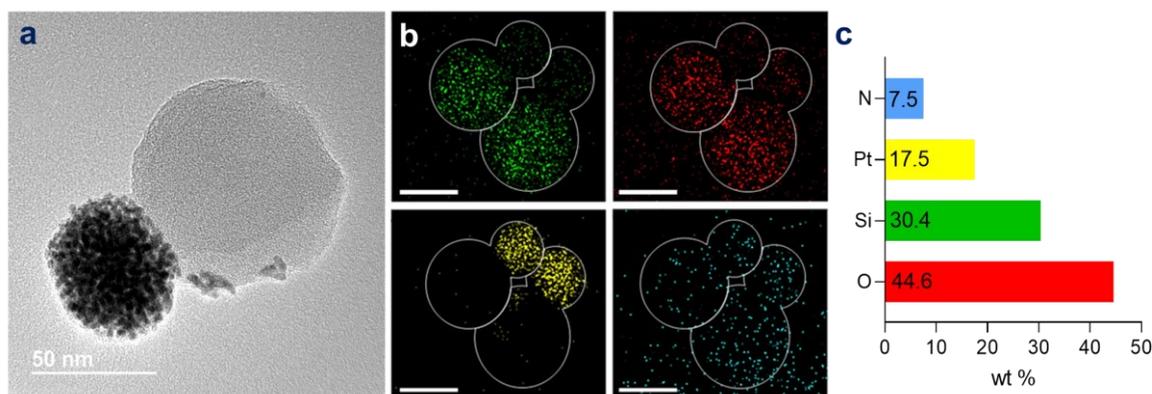
NANOPARTÍCULA	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
	<b>NM</b>	Nanomotor Janus Pt-MSN formado por la conjunción anisotrópica de Pt y MSN. Muestra propulsión por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pero no por glucosa.
	<b>NM<sub>Doxo-GOx</sub></b>	<b>Nanomotor final:</b> NM cargado con Doxo y funcionalizado con GOx. Muestra autopropulsión por la catálisis de glucosa y liberación controlada del fármaco en respuesta proteasas.
	<b>NM<sub>Doxo</sub></b>	NM cargado con Doxo y funcionalizado con APTES. <b>Sin GOx.</b> Muestra liberación incontrolada de Doxo.
	<b>NM<sub>GOx</sub></b>	Nanomotor control: NM funcionalizado con GOx. <b>No cargado con Doxo.</b> Muestra autopropulsión, pero no liberación del fármaco.
	<b>NM<sub>Doxo-BSA</sub></b>	Nanopartícula control: NM cargado con Doxo y funcionalizado con BSA. <b>Sin el primer elemento de la cascada que genera la propulsión, GOx.</b> Muestra liberación del fármaco, pero no catálisis de glucosa.
	<b>NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub></b>	Nanopartícula control: NM cargado con Doxo y funcionalizado con GOx, incubado a 70 °C durante 1 h. <b>Con el primer elemento de la cascada que genera la propulsión, GOx, inactivado.</b> Muestra liberación del fármaco, pero no autopropulsión.



### V.6.2 Caracterización estructural del nanomotor

Después de sintetizar las diferentes nanopartículas, se comprobó su adecuada estructura mediante los métodos habituales de caracterización de nanomateriales. Las nanopartículas cargadas con Doxo se estudiaron sólo con algunas técnicas con el fin de reducir su manipulación debido a la toxicidad de la droga encapsulada.

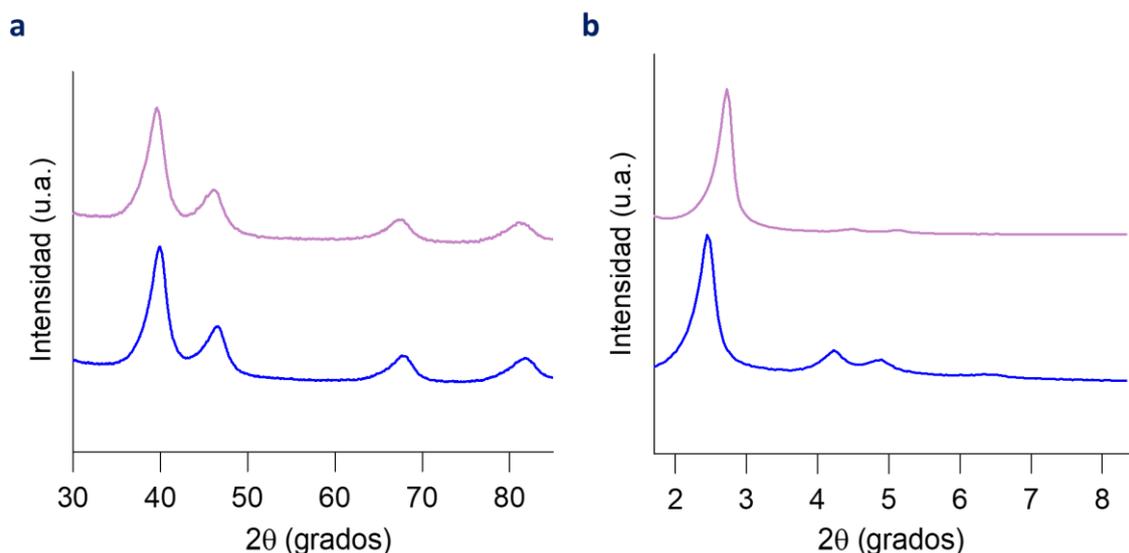
Para comenzar, se analizó la estructura y composición de NM<sub>Doxo-GOx</sub> por medio de técnicas de microscopía (**Figura V.7**). Por HR-TEM (**a**) se confirmó la nanoarquitectura esperada: un único nanodispositivo con 2 partes enfrentadas. Por un lado, una nanopartícula de Pt con estructura cristalina formada por la agrupación de nanodendritas y, por otro lado, una MSN con estructura mesoporosa. Por STEM-EDX (**b-c**) se confirmó la presencia de los elementos que conforman NM (Pt, **amarillo**, 17.5 wt %; Si, **verde**, 30.4 wt %; y O, **rojo**, 44.6 wt %). Además, también se detectaron átomos de N (**azul**, 7.5 wt %), asignados a la inmovilización de la enzima en el andamio inorgánico.



**Figura V.7. Caracterización de NM<sub>Doxo-GOx</sub> por microscopía.** **a** Imagen de HR-TEM. **b-c** Análisis por STEM-EDX. **b** Mapa atómico (Pt: amarillo, Si: verde, O: rojo, N: azul, barra escala = 50  $\mu$ m). **c** Cuantificación de la composición en wt %.

La estructura observada por HR-TEM también fue confirmada por PXRD (**Figura V.8**). El difractograma de NM<sub>GOx</sub> a ángulos altos (**a**, **lila**) presenta picos de Bragg, indexados como planos (111), (200), (220) y (311), que reflejan la estructura cúbica de las nanopartículas de Pt. En cambio, el difractograma a ángulos bajos (**b**, **lila**) presenta un pico mayoritario en torno a 2.6 °,

indexado como plano (100), así como 2 picos menos intensos a aproximadamente 4.1 y 4.7 °, correspondientes a los planos (110) y (200). Todos son característicos de los materiales mesoporosos con estructura MCM-41. Estos resultados también indican que la funcionalización de NM (azul) con GOx no influye en su estructura.



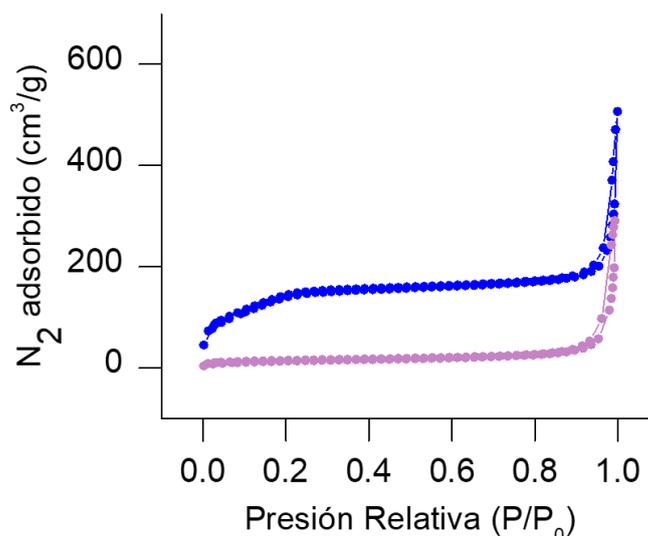
**Figura V.8. Patrones de PXRD de NM<sub>GOx</sub>. a** Ángulos altos. **b** Ángulos bajos. NM: azul, NM<sub>GOx</sub>: lila.

Tras determinar que la disposición estructural de NM se mantiene tras su funcionalización, se procedió a evaluar mediante varios estudios si ésta tuvo lugar correctamente (Figuras V.9-12). En primer lugar, se llevó a cabo un análisis por porosimetría (Figura V.9, Tabla V.3). La isoterma de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de NM<sub>GOx</sub> (lila) muestra una reducción significativa en el proceso de absorción con respecto a NM (azul). NM presenta un salto agudo en valores de P/P<sub>0</sub> de 0.1-0.3 (correspondiente a la condensación del gas en el interior de los poros) que está ausente en el nanomotor final. Esto demuestra el bloqueo de los poros con la enzima GOx. La aplicación del modelo BJH permitió determinar los valores de diámetro y volumen de poro, y la aplicación del modelo BET permitió calcular la superficie específica total del nanodispositivo. El volumen de poro disminuyó de 0.14 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> en NM hasta un valor cercano a 0 en NM<sub>GOx</sub> y el área superficial de 551 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> hasta 49 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

**Tabla V.3. Diámetro de poro, volumen de poro y superficie específica de MSN, NM y NM<sub>GOx</sub>.**

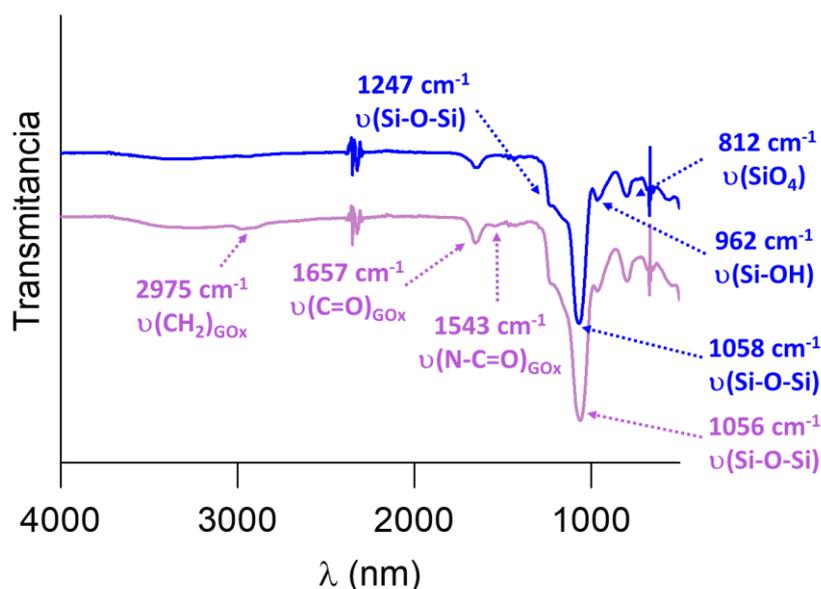
Calculados aplicando los modelos BJH y BET a las isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>.

NANOPARTÍCULA	DIÁMETRO PORO (BJH, nm)	VOLUMEN PORO (BJH, cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	SUPERFICIE ESPECÍFICA (S <sub>g</sub> ) (BET, m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
MSN	2.69	0.82	998
NM	2.30	0.14	551
NM <sub>GOx</sub>	-	0.028	49



**Figura V.9. Análisis de  $NM_{GOx}$  por porosimetría.** Isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$ . NM: azul,  $NM_{GOx}$ : lila.

La funcionalización de la cara mesoporosa del nanomotor con la puerta molecular también se vio respaldada por FTIR (**Figura V.10**). Además de mostrar las vibraciones de enlace propias de los materiales silíceos presentes en el espectro FTIR de NM (**azul**) (bandas a:  $812\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuyen a los tetraedros  $SiO_4$ ;  $962\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a los enlaces Si-OH; y  $1058\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen a los enlaces Si-O-Si),  $NM_{GOx}$  (**lila**) también muestra bandas a:  $1657\text{ cm}^{-1}$ , típica del enlace amida tipo I;  $1543\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-N; y  $2975\text{ cm}^{-1}$ , asignada a grupos  $CH_2$ . En conjunto, estos datos indican la unión de la enzima a la superficie de NM. Para su cuantificación se empleó el análisis TGA (**Figura V.11**). La descomposición térmica del contenido orgánico de  $NM_{GOx}$  (**lila**) dio como resultado  $121.5\text{ }\mu\text{g}$  por mg de  $NM_{GOx}$ . Los ensayos BCA corroboraron estos resultados (**Tabla V.4**).



**Figura V.10. Espectros FTIR de  $NM_{GOx}$ .** NM: azul,  $NM_{GOx}$ : lila.

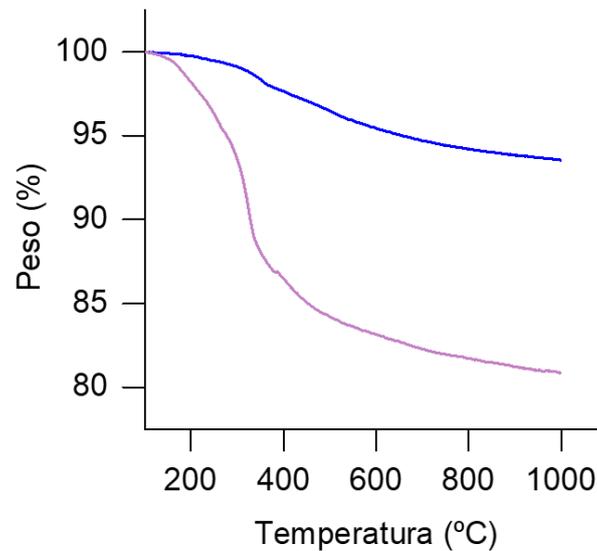
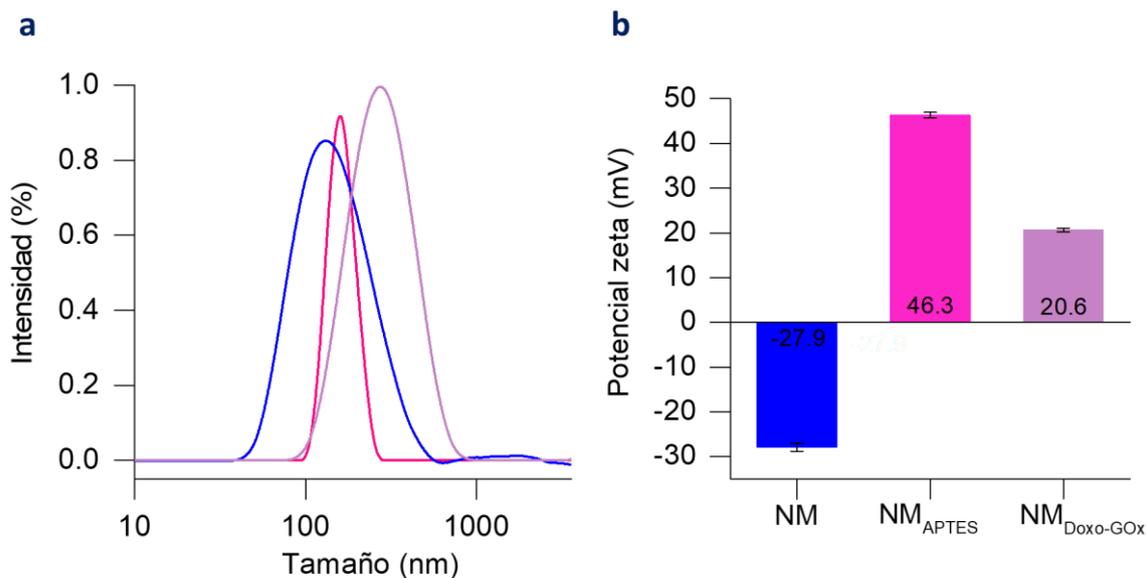


Figura V.11. Análisis TGA NM<sub>GOx</sub>. NM: azul, NM<sub>GOx</sub>: lila.

Tabla V.4. Cantidad de puerta molecular en las nanopartículas sintetizadas. Calculada a partir de ensayos BCA.

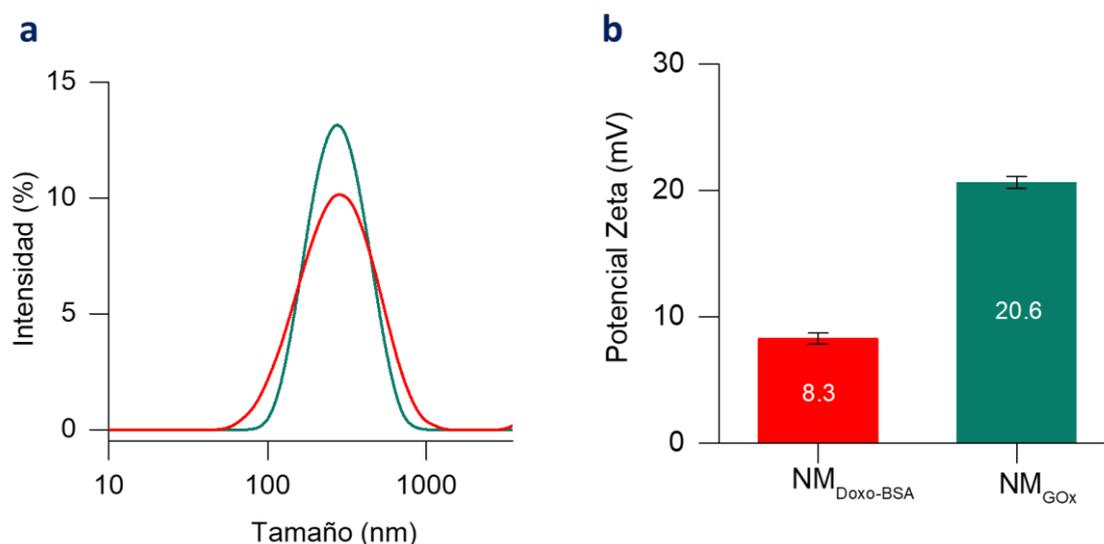
NANOPARTÍCULA	PUERTA MOLECULAR ( $\mu\text{g mg sólido}^{-1}$ )
NM <sub>Doxo-GOx</sub>	108
NM <sub>GOx</sub>	100.7
NM <sub>Doxo-BSA</sub>	90.4

La caracterización estructural del nanomotor se completó por DLS (Figura V.12), una técnica que permite monitorizar los cambios de tamaño y carga superficial durante el procedimiento sintético. El diámetro hidrodinámico (a) aumentó de 132 nm en NM (azul) a 270.5 nm en NM<sub>Doxo-GOx</sub> (lila), debido a la inmovilización del sistema de recubrimiento. En cuanto al potencial zeta (b), se observó que el valor negativo típico de NM (azul), -25.5 mV (por la presencia de grupos silanol) aumentó hasta 46.3 mV en NM<sub>APTES</sub> (rosa), lo cual se debe a la protonación de los grupos amino aportados por el APTES a pH neutro ( $pK_a = 8-10$ ). Sin embargo, el valor del potencial zeta disminuyó de nuevo hasta 20.6 mV en NM<sub>Doxo-GOx</sub> (lila). Este descenso se atribuye a la unión de la GOx, que presenta carga negativa a pH neutro ( $PI = 4.2$ ). Así, estos datos confirman la correcta construcción del nanomotor final.



**Figura V.12. Análisis de NM<sub>Doxo-GOx</sub> por DLS. a** Diámetro hidrodinámico (nm). **b** Potencial zeta (mV). NM: azul, NM<sub>APTES</sub>: rosa y NM<sub>Doxo-GOx</sub>: lila.

Además, el resto de las nanopartículas control también fueron caracterizadas por DLS (Figura V.13). En este caso, los diámetros hidrodinámicos obtenidos fueron comparables al mostrado por el nanomotor completo (a), pero se encontraron diferencias en la carga superficial (b). NM<sub>Doxo-BSA</sub> (rojo) presenta un potencial zeta menor que el resto de nanodispositivos (8.3 mV). Esto puede deberse a la cantidad de aminoácidos cargados negativamente (aspartato y glutamato) a pH neutro, calculada en un 16 % para la BSA (PI = 4.7) y solo en un 11 % para la GOx (PI = 4.2).



**Figura V.13. Caracterización de las nanopartículas control por DLS. a** Diámetro hidrodinámico (nm). **b** Potencial zeta (mV). NM<sub>GOx</sub>: verde, NM<sub>Doxo-BSA</sub>: rojo.

A modo de resumen, a partir de los datos obtenidos mediante las técnicas de caracterización se puede concluir que: (i) NM se sintetizó adecuadamente; (ii) los procesos de cargado de sus mesoporos con Doxo y funcionalización de su superficie externa con GOx no afectaron a su estructura; (iii) el nanomotor final NM<sub>Doxo-GOx</sub> presentó la morfología, estructura

y composición ideadas en el nanodiseño inicial; y (iv) las diferentes nanopartículas control despojadas de alguno de los elementos clave se sintetizaron correctamente.

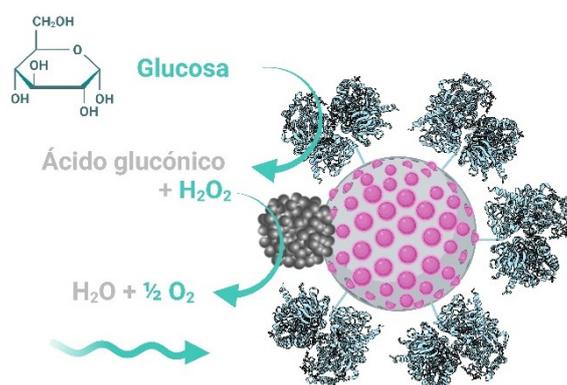
### V.6.3 Caracterización funcional del nanomotor

Una vez demostrada la nanoarquitectura y funcionalización de los nanomotores, se pasó a evaluar si eran capaces de exhibir las funcionalidades esperadas: autopropulsión en respuesta a un combustible biocompatible y liberación controlada de la droga transportada.

#### V.6.3.1 $NM_{Doxo-GOx}$ se autopropulsa por la transformación enzimática de glucosa

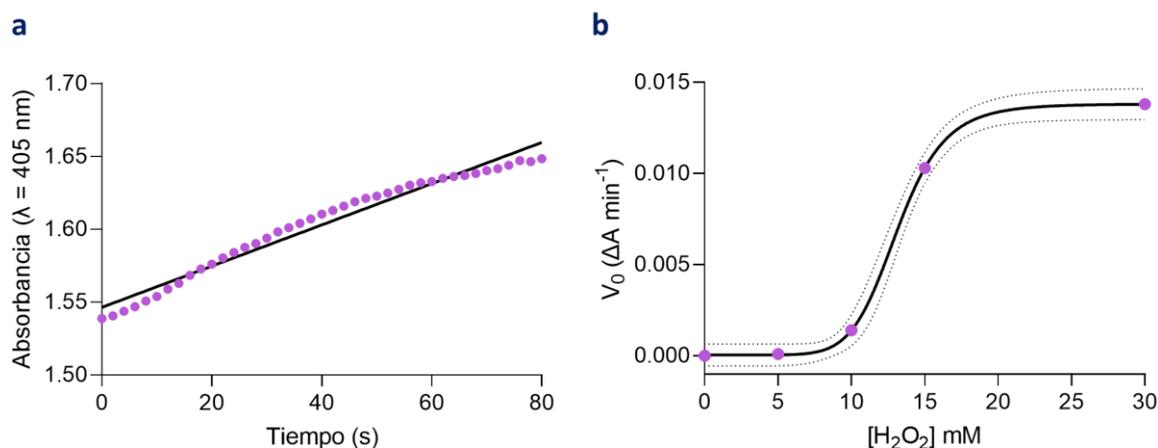
Con respecto al movimiento de  $NM_{Doxo-GOx}$ , se espera que muestre un comportamiento difusivo activo en respuesta al reconocimiento de la glucosa presente en el medio mediante la siguiente reacción híbrida en cascada (**Figura V.14**):

- La **GOx** realiza la transformación enzimática del **biocombustible glucosa** en ácido glucónico y  $H_2O_2$  en la superficie de la cara de MSN.
- La **cara de Pt** cataliza la descomposición catalítica del  $H_2O_2$  generado *in situ* por la enzima en  $H_2O$  y  $O_2$ , que se acumulan localmente en un lado del nanomotor induciendo su propulsión (en el sentido indicado por la flecha azul).



**Figura V.14. Mecanismo de propulsión de  $NM_{Doxo-GOx}$ .**

Para la caracterización del mecanismo de propulsión secuencial propuesto se emplearon los procedimientos descritos en la **Sección V.5.4**. En primer lugar, se procedió a evaluar las actividades catalíticas del nanomotor (**Figura V.15**). En cuanto a la capacidad para descomponer glucosa, se determinó la actividad de la GOx inmovilizada mediante un ensayo espectrofotométrico (**a**, **Reacción V.1**). El resultado fue de 32 U por g de  $NM_{Doxo-GOx}$  (**Ecuación V.1**). Los niveles de actividad GOx también se calcularon en los distintos nanodispositivos control (**Tabla V.5**). En cuanto a la actividad peroxidasa de la cara de Pt, se obtuvo lo esperado (**b**).  $NM_{Doxo-GOx}$  presenta una cinética «enzimática» tipo Michaelis-Menten con una  $K_M$  de 13 mM para el  $H_2O_2$  (**Ecuación III.12**). Así, se puede concluir que el nanomotor desarrollado es capaz de catalizar las 2 reacciones químicas que inducirán su autopropulsión.



**Figura V.15. Actividades catalíticas de  $NM_{Doxo-GOx}$ .** **a** Determinación de la actividad GOx: monitorización de la formación de ABTS\* (absorbancia a  $\lambda = 405$  nm) en función del tiempo. **b** Determinación de la actividad peroxidasa: efecto de variar la concentración de  $H_2O_2$  sobre la velocidad de reacción ( $[ABTS] = 9$  mM).

**Tabla V.5. Actividad GOx en las distintas nanopartículas sintetizadas.** Determinada mediante un ensayo espectrofotométrico (Ecuación V.1).

NANOPARTÍCULA	ACTIVIDAD GOX ( $U\ g^{-1}$ sólido)
$NM_{Doxo-GOx}$	32
$NM_{GOx}$	32
$NM_{Doxo-GOx-IN}$	0
$NM_{Doxo-BSA}$	0

Seguidamente, se pasó a evaluar la autopropulsión del nanomotor en función de la concentración de glucosa. En este punto es importante recalcar que el rango de concentraciones de glucosa testado (0-25 mM) fue seleccionado en función de los niveles endógenos en sangre y tejidos (4-7 mM)<sup>215</sup> y del nivel del medio celular en el que se llevan a cabo los ensayos *in vitro* (la concentración estándar de glucosa requerida para que los cultivos celulares de HeLa sean viables es de 25 mM).<sup>373,374</sup> Además, este rango está en concordancia con los datos bibliográficos, los cuales apuntan a que, específicamente en tumor, los niveles de este metabolito son prominentes.<sup>375</sup> Este fenómeno se atribuye a que su transporte desde el sistema circulatorio se ve incrementado al ser un nutriente esencial que proporciona energía (efecto Warburg)<sup>376</sup> y precursores para los procesos biosintéticos a las células cancerosas.<sup>377</sup> Por tanto, la retirada de los altos niveles de glucosa del medio tumoral por la acción de la GOx no sólo induciría la autopropulsión del nanomotor, sino que también podría contribuir a obstaculizar la progresión de la enfermedad («*starving therapy*»)<sup>378-382</sup>.

Mediante análisis NTA (Figura V.16) descubrimos que  $NM_{Doxo-GOx}$  es incapaz de autopropulsarse en ausencia de glucosa, ya que presenta una  $D_0$  de  $1.6 \pm 0.1\ \mu m^2\ s^{-1}$  (b), un valor en concordancia con lo esperado ( $1.6\ \mu m^2\ s^{-1}$ ) para nanopartículas con unas dimensiones de 270 nm (Ecuación I.2). Asimismo, sus trayectorias muestran un alcance típico del comportamiento browniano (c). Por el contrario,  $NM_{Doxo-GOx}$  en presencia de glucosa muestra

una correlación lineal entre MSD e  $\Delta t$  (a, Ecuación III.2), que se traduce en una difusividad mejorada en todas las condiciones evaluadas (b, Ecuación III.5). El  $D_{\text{eff}}$  se incrementa desde  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 2.5 mM hasta alcanzar un valor máximo de  $4.0 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  a 15 mM de glucosa. No obstante, a 25 mM de glucosa se observa un descenso en el  $D_{\text{eff}}$  ( $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) hasta valores similares a los alcanzados a 5 mM de combustible ( $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Esto puede estar debido a la saturación de la actividad de la enzima por la alta concentración de sustrato. Así, según los resultados obtenidos mediante análisis NTA, la concentración de glucosa con la que se alcanza la difusividad máxima en este entorno es 15 mM. Por ello, los estudios motiles de las nanopartículas privadas de actividad GOx se realizan a dicha concentración.

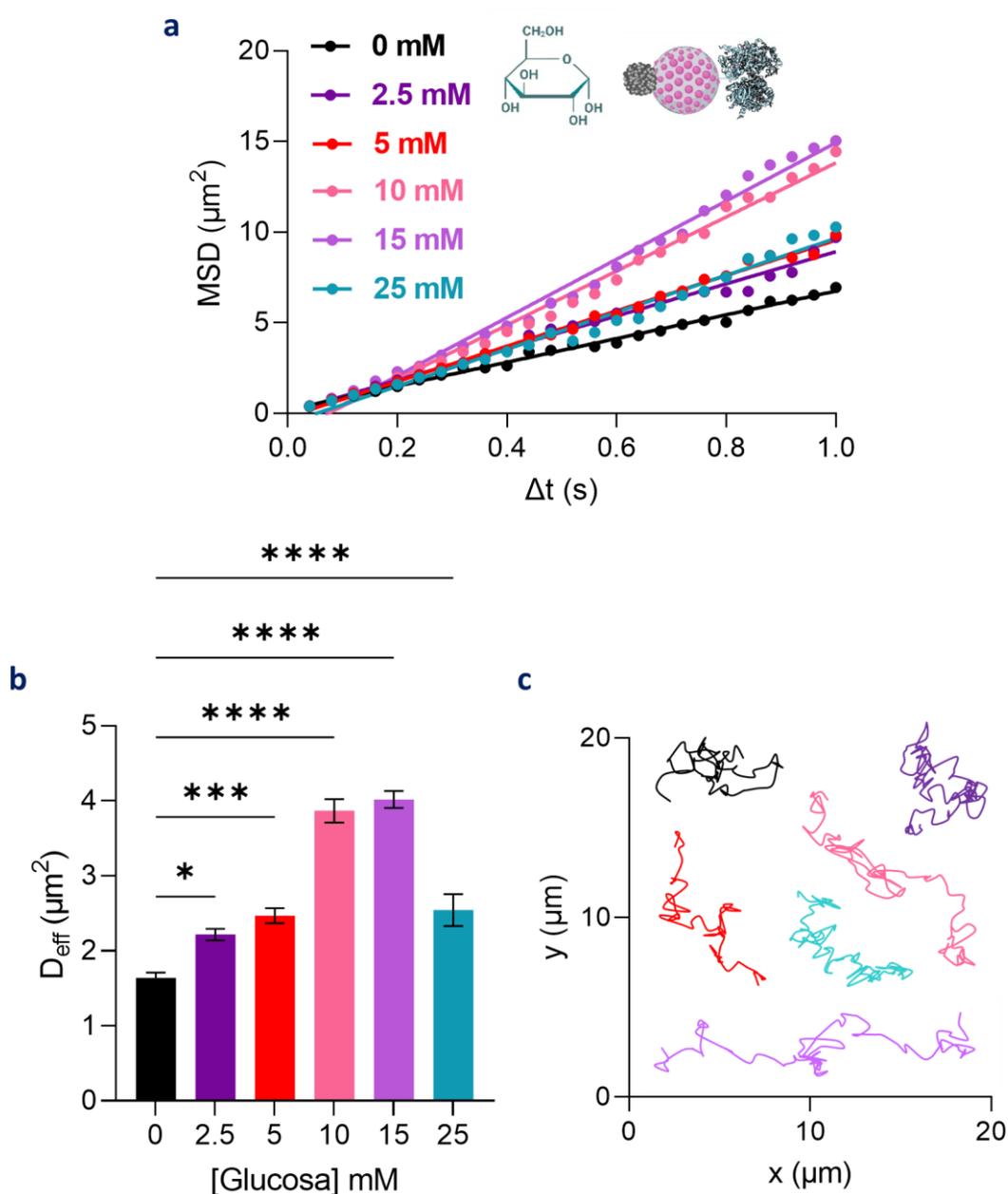
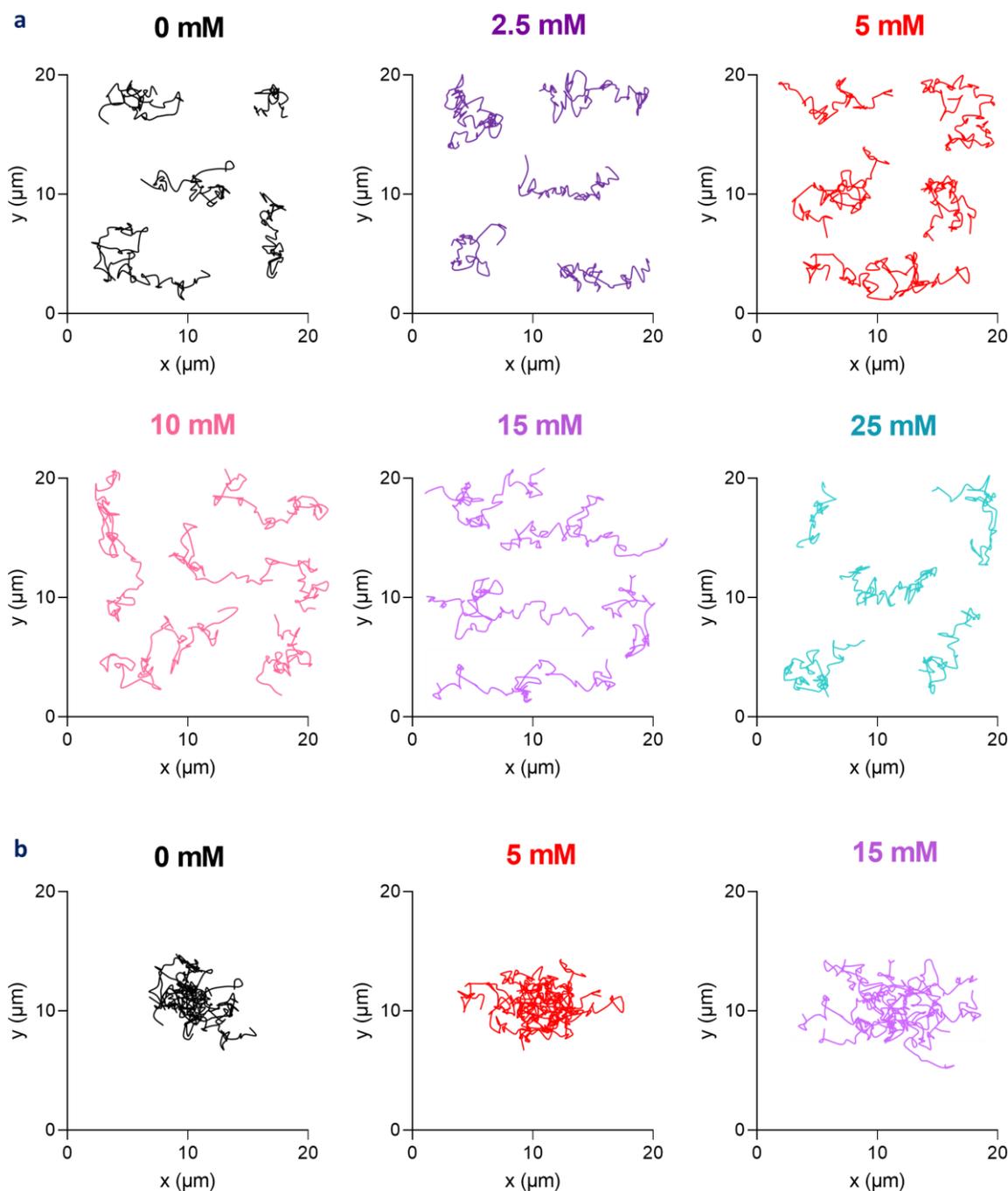


Figura V.16. Caracterización del movimiento de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  inducido por glucosa por NTA. a MSD vs  $\Delta t$ .

b  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$ , calculados a partir de la Ecuación III.5. c Trayectorias representativas en todas las concentraciones de combustible analizadas. [Glucosa] = 0, negro; 2.5, morado; 5, rojo; 10, rosa; 15, lila;

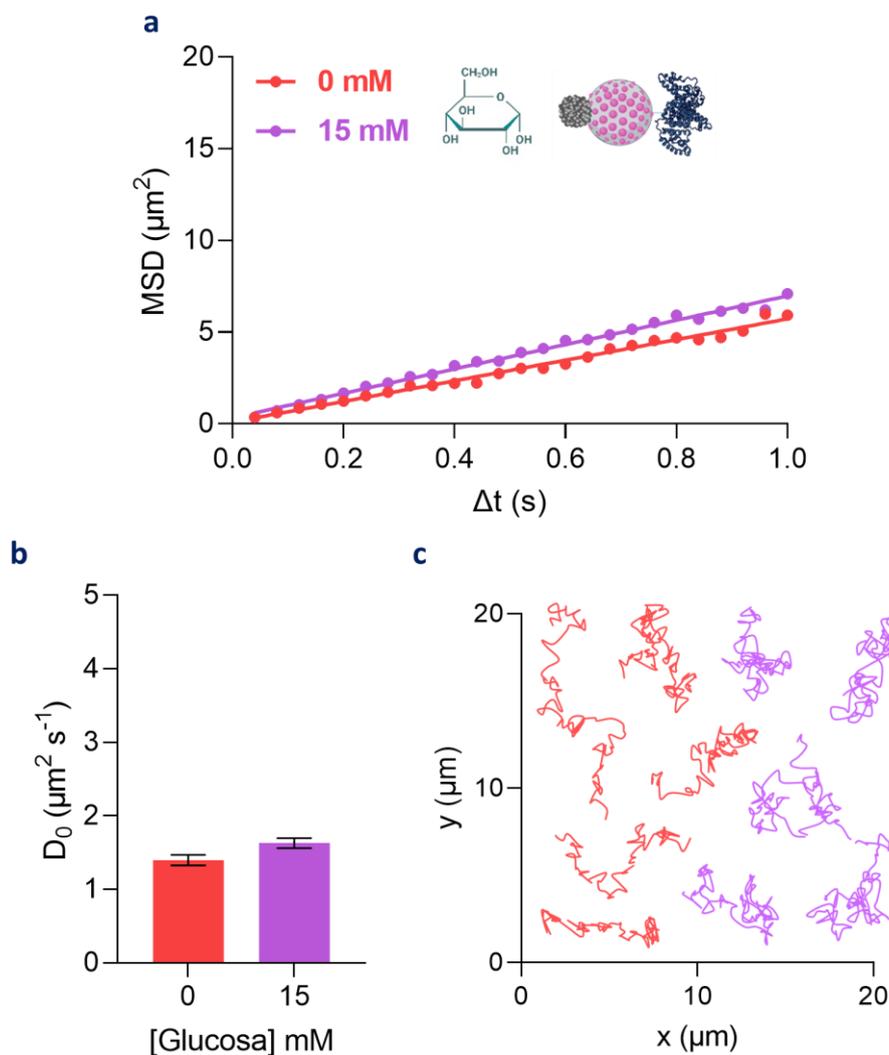
y 25 mM, azul. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanodispositivos con un tamaño entre 250 y 350 nm. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Además, las trayectorias espaciales de los nanomotores apoyan estos resultados (**Figura V.16c** y **Figura V.17**). Conforme se incrementa la concentración del biocombustible, el alcance de éstas es mayor.



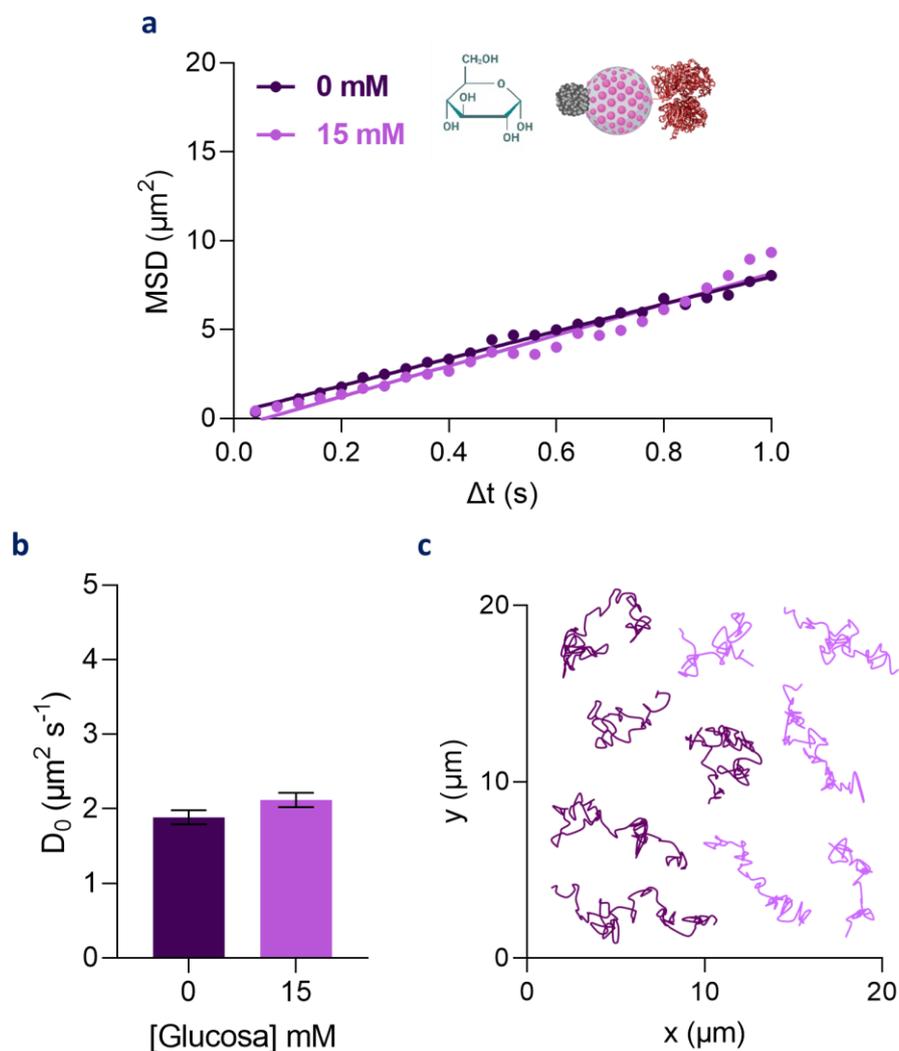
**Figura IV.17. Trayectorias de  $NM_{Doxo-GOx}$ .** **a** En presencia de diferentes concentraciones de glucosa: 0, negro; 2.5, morado; 5, rojo; 10, rosa; 15, lila; y 25 mM, azul. **b** Comparación del alcance de las trayectorias a 0, 5 y 15 mM de glucosa.  $n = 5$  nanomotores representativos.

Para verificar el mecanismo de movimiento propuesto, investigamos si reemplazar o eliminar el elemento que dota de autopropulsión inducida por glucosa al nanomotor (es decir, GOx) conduciría a la pérdida de la capacidad motora. Para ello, se analizó la difusión de las nanopartículas  $NM_{Doxo-BSA}$  y  $NM_{Doxo-GOx-IN}$  en respuesta a glucosa 15 mM por NTA. Tal y como indican los resultados expuestos en las Figuras V.18 y V.19, estos nanodispositivos muestran un comportamiento muy similar en presencia y ausencia de glucosa.



**Figura V.18. Caracterización del movimiento de las nanopartículas control pasivas  $NM_{Doxo-BSA}$  por NTA.**

**a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$ , calculado a partir de la Ecuación III.5. **c** Trayectorias representativas seguidas por 5 nanopartículas. [Glucosa] = 0, rojo; 15 mM, lila. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanodispositivos con un tamaño entre 250 y 350 nm. La diferencia entre 0 y 15 mM no es significativa y, por tanto, no se indica.

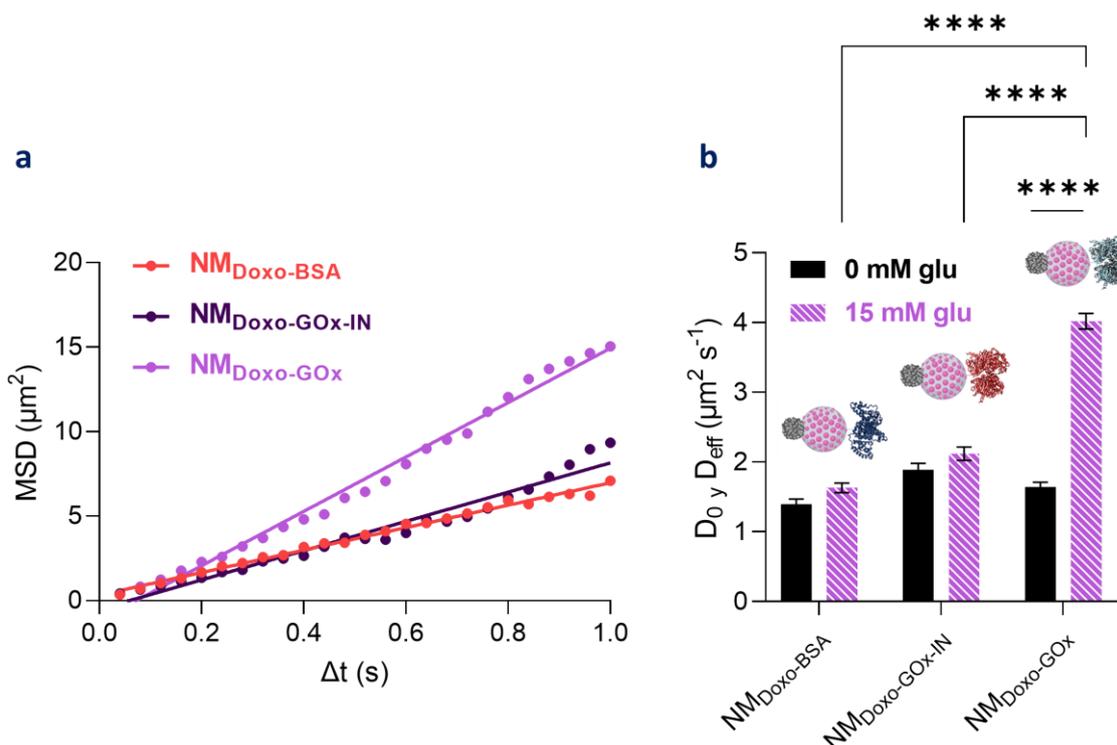


**Figura V.19. Caracterización del movimiento de las nanopartículas control pasivas  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$  por NTA. a** MSD vs  $\Delta t$ . **b**  $D_0$ , calculado a partir de la Ecuación III.5. **c** Trayectorias representativas de 5 nanopartículas. [Glucosa] = 0, morado; 15 mM, lila. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanodispositivos con dimensiones comprendidas entre 250 y 350 nm. La diferencia entre 0 y 15 mM no es significativa y, por tanto, no se indica.

A modo de resumen, la **Tabla V.6** y la **Figura V.20** recogen los valores de  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$  de todas las nanopartículas analizadas ( $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ ,  $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$  y  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$ ) a 0 y 15 mM de glucosa. Como se puede observar, sólo el nanomotor completo (lila) experimenta un incremento significativo en su difusión (2.4 unidades) a consecuencia de la adición del biocombustible, mientras que no se observa un aumento significativo en el  $D_0$  de los nanodispositivos control (rojo y morado). De este modo, se confirma el papel clave de los componentes catalíticos, GOx y Pt, para lograr el movimiento autónomo inducido por glucosa.

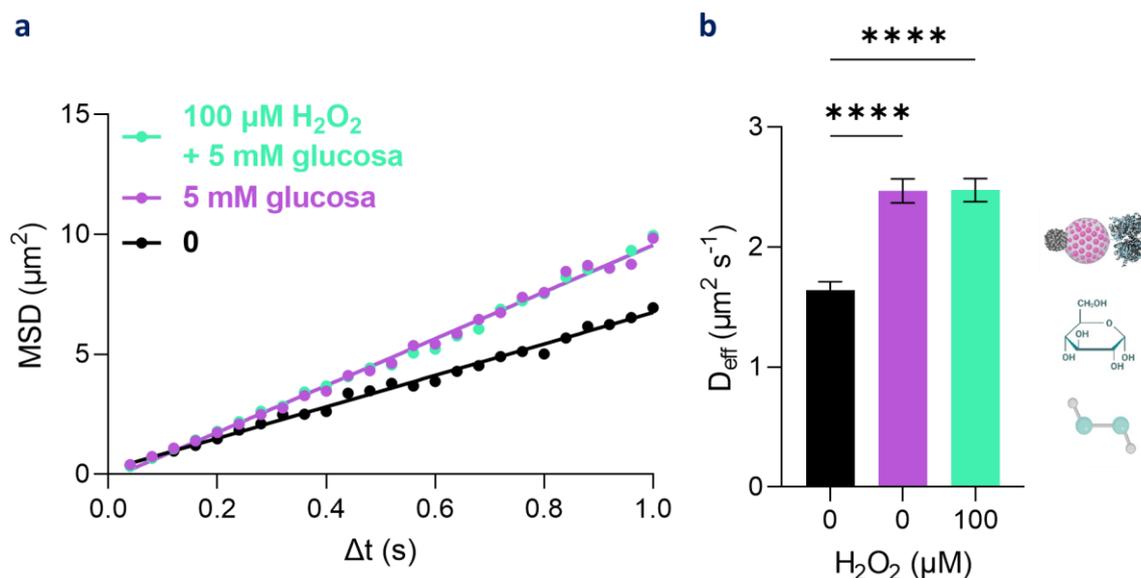
**Tabla V.6. Resumen de los coeficientes de difusión de  $NM_{Doxo-GOx}$ ,  $NM_{Doxo-BSA}$  y  $NM_{Doxo-GOx-IN}$  en ausencia y presencia de combustible. Calculados a partir del análisis NTA.**

NANOPARTÍCULA	$D_0$ EN AUSENCIA DE GLUCOSA ( $\mu m^2 s^{-1}$ )	$D_0/D_{eff}$ EN PRESENCIA DE GLUCOSA (15 mM) ( $\mu m^2 s^{-1}$ )
$NM_{Doxo-GOx}$	$1.6 \pm 0.1$	$4.0 \pm 0.1$
$NM_{Doxo-BSA}$	$1.4 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$
$NM_{Doxo-GOx-IN}$	$1.9 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$



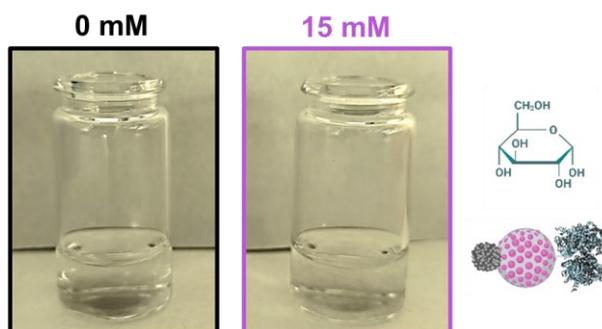
**Figura V.20. Comparación de la difusión de las nanopartículas  $NM_{Doxo-BSA}$ ,  $NM_{Doxo-GOx-IN}$  y  $NM_{Doxo-GOx}$ . a** MSD vs  $\Delta t$  a 15 mM de glucosa ( $NM_{Doxo-BSA}$ : rojo,  $NM_{Doxo-GOx-IN}$ : morado,  $NM_{Doxo-GOx}$ : lila). **b**  $D_0$  y  $D_{eff}$  a 0 (negro) y 15 mM (lila rayado) de glucosa. Datos extraídos del análisis NTA (n = 50). \*\*\*\* p < 0.0001.

Por otro lado, dado que la cara de Pt de NM presenta una alta actividad catalítica para la descomposición de  $H_2O_2$  debido a su nanoestructura dendrítica y que en algunos tumores esa sustancia está presente debido a la sobreproducción de ROS (su concentración se encuentra alrededor de  $100 \mu M$ ),<sup>358</sup> se decidió evaluar si la adición de  $H_2O_2$  al medio se traducía en un aumento en la difusión inducida por glucosa del nanomotor. Para llevar a cabo este ensayo, se empleó como combustible la suma de glucosa (5 mM) y  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ). Esta combinación de concentraciones se seleccionó puesto que podría ser cercana a la situación real en el organismo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura V.21**. Aparentemente, en presencia del biocombustible glucosa, no se observan diferencias entre añadir (azul turquesa) o no (lila)  $H_2O_2$ . El  $D_{eff}$  se mantiene en valores similares, cercanos a  $2.5 \mu m^2 s^{-1}$ . Por tanto, estos resultados parecen apuntar a que la propulsión de  $NM_{Doxo-GOx}$  está debida a la catálisis del biocombustible glucosa.



**Figura V.21. Análisis del efecto de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el movimiento de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  inducido por glucosa. a MSD vs  $\Delta t$ . b  $D_0$  y  $D_{\text{eff}}$ , determinados aplicando la Ecuación III.5. PBS: negro, glucosa 5 mM: lila,  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  + glucosa 5 mM: azul turquesa. Los datos han sido obtenidos mediante análisis NTA y representan la media  $\pm$  SEM de 50 nanodispositivos (tamaño 250-350 nm). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .**

Para completar la caracterización de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  en medio acuoso, se llevó a cabo un estudio del movimiento a nivel macroscópico. Para ello, se dispuso una gota de una solución que contenía el nanomotor (1 mg mL<sup>-1</sup>) en diferentes viales que contenían o no glucosa (15 mM) y se grabó un video. Como se observa en las capturas registradas 1 min después de la adición de los nanomotores (**Figura V.22**), en presencia de glucosa los nanomotores nadan y se dispersan rápidamente por todo el frasco. En cambio, en ausencia de combustible, permanecen en el fondo del vial. Asimismo, es importante recalcar que en ningún caso se aprecia la generación de burbujas, lo cual nos lleva a concluir que, probablemente, el movimiento de este nanomotor siga el mecanismo de propulsión por difusioforesis. Igual que en los anteriores análisis macroscópicos, hay que destacar que estamos observando el comportamiento de multitud de nanodispositivos.



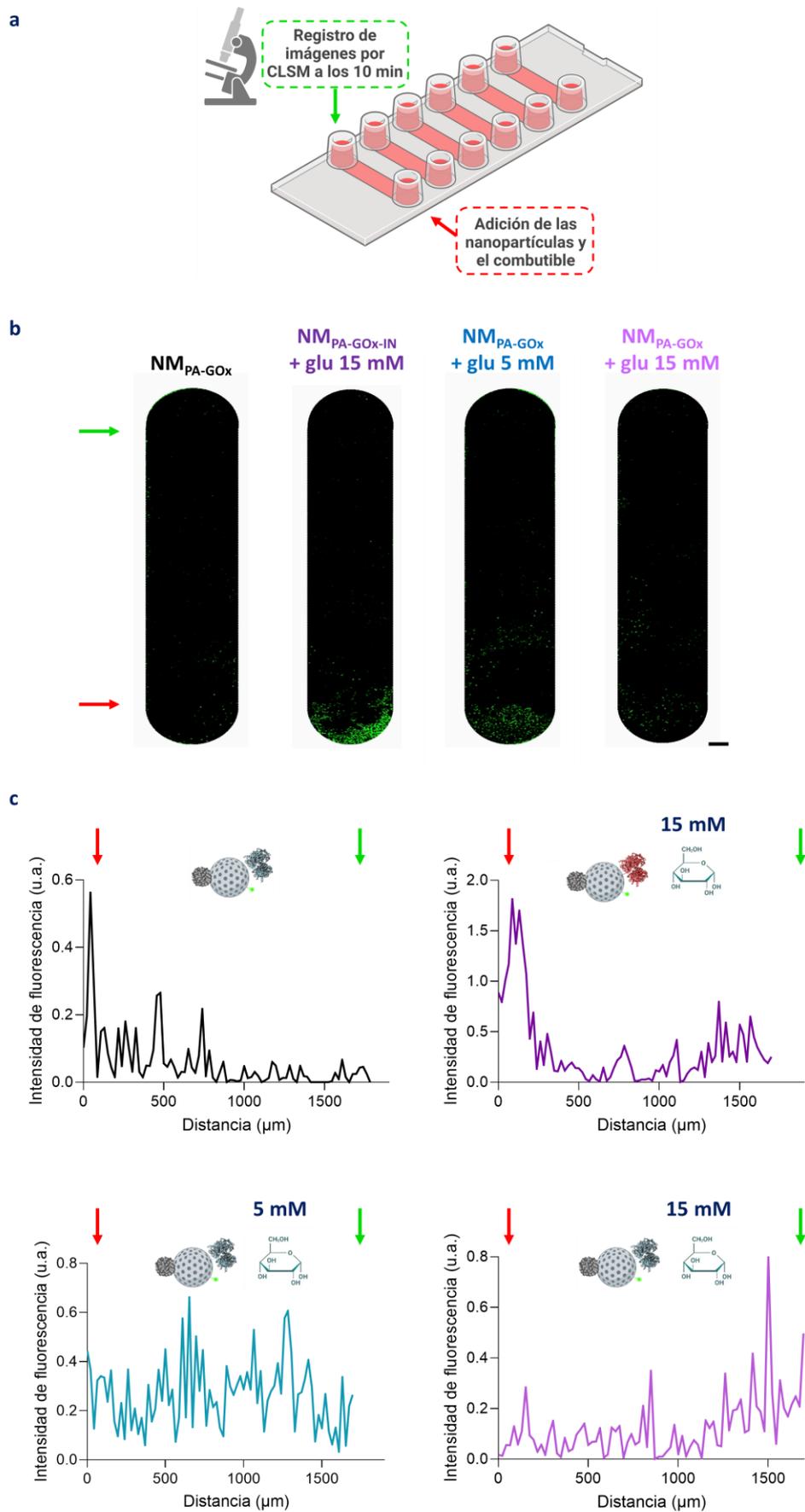
**Figura V.22. Caracterización del movimiento de los nanomotores a nivel macroscópico. Concentraciones de glucosa 0 y 15 mM.**

Por último, se decidió estudiar si la difusión incrementada podría traducirse en una penetración superior del nanomotor en la ECM tumoral, lo cual es uno de los principales

objetivos de este trabajo. Para demostrarlo, se diseñó un experimento en una plataforma de microfluídica formada por 2 compartimentos unidos por un canal (longitud de 17 mm). Éste se recubrió con Matrigel (matriz de membrana basal extraída de ratón compuesta por laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicano de heparán sulfato) con el fin de imitar la viscosidad y la composición de la ECM de los tumores. Además, los nanomotores se marcaron covalentemente con el fluoróforo PA para su visualización ( $NM_{PA-GOX}/NM_{PA-GOX-IN}$ ). Las nanopartículas se colocaron al principio del canal y, seguidamente, se añadió el combustible (glucosa 5 o 15 mM) o PBS. Después de 10 min, se monitorizó la fluorescencia a lo largo del canal mediante CLSM (**Sección V.5.4.3**).

Los datos, representados en la **Figura V.23**, indican que  $NM_{PA-GOX}$  activado con glucosa muestra un alcance mayor en el canal que los controles pasivos,  $NM_{PA-GOX-IN}$  en presencia del combustible (**morado**) y  $NM_{PA-GOX}$  no activado (**negro**), los cuales se distribuyen principalmente en zonas cercanas al pocillo donde se adicionan (indicado con una flecha roja). Asimismo, se observan diferencias entre propulsar al nanomotor  $NM_{PA-GOX}$  con distintas cantidades de biocombustible. Al añadir glucosa 5 mM (**azul**), la señal fluorescente se distribuye de forma homogénea prácticamente por todo el canal. En cambio, al añadir glucosa 15 mM (**lila**), la intensidad máxima se localiza mayoritariamente al final del canal (indicado con una flecha verde). Por tanto, estos resultados confirman que la descomposición de glucosa y  $H_2O_2$  en la superficie anisotrópica de los nanomotores genera una fuerza impulsora que da lugar a una penetración mejorada en un microentorno similar a la ECM tumoral.

En conclusión, los resultados experimentales obtenidos en esta sección llevan a inferir que el nanomotor desarrollado muestra: (i) capacidad de descomponer enzimáticamente glucosa; (ii) actividad peroxidasa; (iii) difusión mejorada a consecuencia de dichas actividades siguiendo, probablemente, un mecanismo de propulsión por difusioforesis; y (iv) mayor penetración en un microambiente comparable a la ECM debido a su habilidad motora. Asimismo, la caracterización motil de distintas nanopartículas control carentes de actividad GOx, prueban la necesidad de que estén presentes todos los elementos de  $NM_{Doxo-GOX}$  para superar el movimiento Browniano y exhibir autopropulsión en respuesta a glucosa.

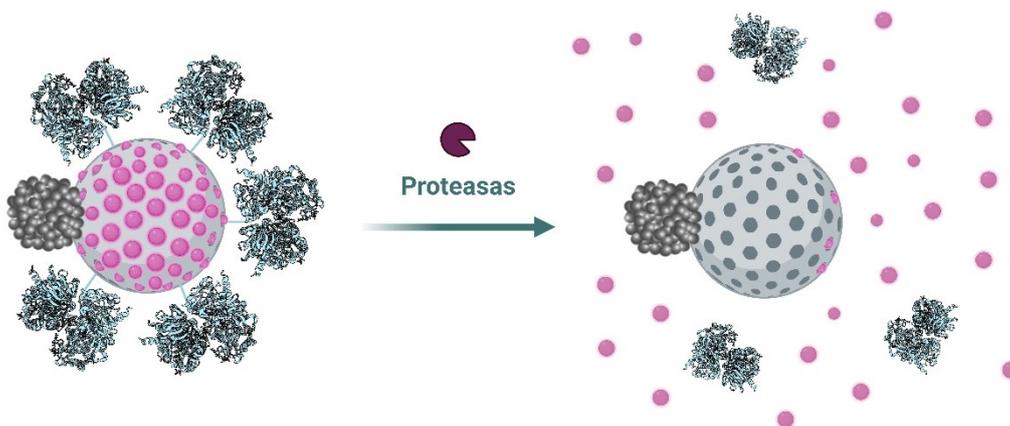


**Figura V.23. Penetración del nanomotor en un microentorno similar a la ECM tumoral. a** Esquema del diseño del experimento. **b** Imagen de CLSM mostrando el alcance de los nanodispositivos (verde) en el

canal. Barra de escala = 1 mm. **c** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del canal empleando el programa ImageJ.  $NM_{PA-GOx}$  + PBS: negro,  $NM_{PA-GOx-IN}$  + glucosa 15 mM: morado,  $NM_{PA-GOx}$  + glucosa 5 mM: azul,  $NM_{PA-GOx}$  + glucosa 15 mM: lila. La flecha roja indica el punto donde se adicionaron las nanopartículas y la flecha verde indica el punto opuesto al final del canal.

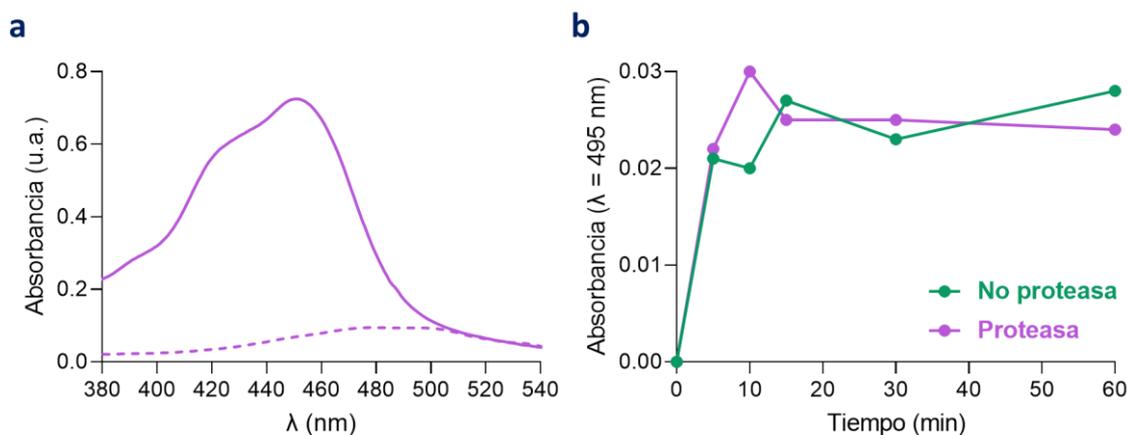
### V.6.3.2 $NM_{Doxo-GOx}$ libera Doxo en respuesta a actividad proteolítica

Tras demostrar la autopropulsión del nanodispositivo, se pasó a evaluar uno de los principales objetivos del trabajo: la habilidad de controlar la entrega de su carga. Como se ha comentado antes, los mesoporos de NM se cargaron con el fármaco Doxo y su salida prematura se inhibió mediante la unión de GOx. Para provocar la liberación a demanda de la droga se utiliza el mecanismo representado en la **Figura V.24**. La presencia de proteasas, que simulan la acción de las enzimas lisosomales de las células, provoca la hidrólisis de los enlaces peptídicos de la estructura de la GOx, así como de las conexiones (de la misma naturaleza) que la unen a NM. Esto induce el desbloqueo de los mesoporos y la consecuente salida de la Doxo al medio por el gradiente favorable de concentración.



**Figura V.24.** Liberación de la carga de  $NM_{Doxo-GOx}$  a consecuencia de actividad proteolítica.

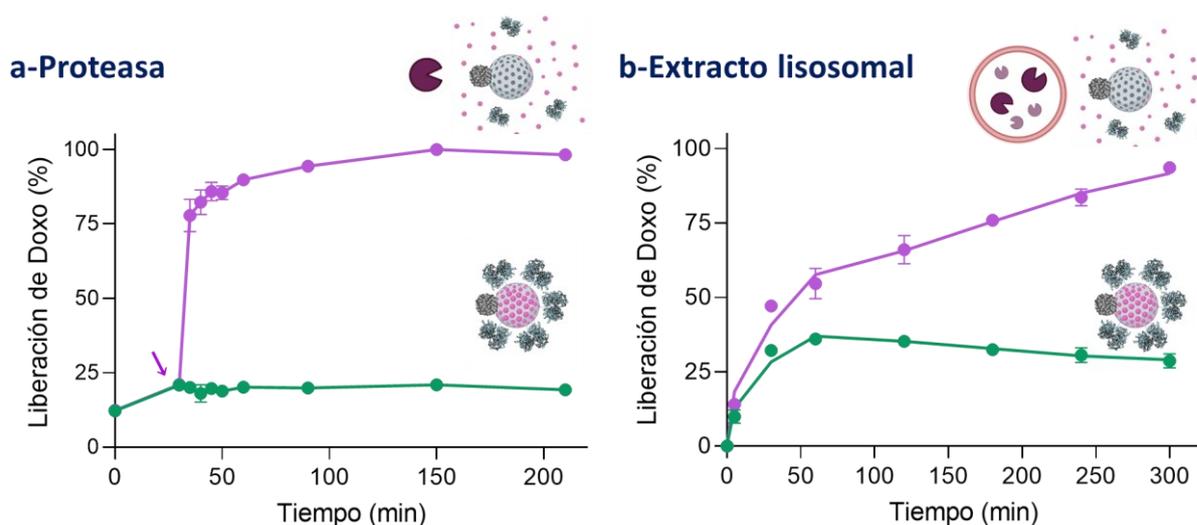
Los ensayos de liberación se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la **Sección V.5.5**. El primer paso fue caracterizar  $NM_{Doxo}$ . En la **Figura V.25a** se muestra el resultado de incubar  $NM_{APTES}$  con una solución saturada de Doxo (**curva lila**). Tras 24 h, se observa una reducción en la intensidad de la señal (**curva lila punteada**), que se atribuye a la encapsulación de la droga en los poros de  $NM_{APTES}$  para formar  $NM_{Doxo}$ . En la **Figura V.25b** se muestra el resultado de suspender  $NM_{Doxo}$  en una solución acuosa. El contenido se libera inmediatamente, sin diferencias entre añadir (**curva lila**) o no (**curva verde**) proteasas. Estos resultados indican que la Doxo es capaz de salir de los poros de NM y que se requiere una puerta molecular para controlar el proceso.



**Figura V.25. Caracterización de  $NM_{Doxo}$ .** **a** Encapsulación de Doxo en  $NM_{APTES}$  tras 24 h de reacción. Tiempo 0: lila, tiempo 24 h de incubación con  $NM_{APTES}$ : lila punteado. **b** Liberación incontrolada de Doxo. Ausencia de proteasa: verde, presencia de proteasa  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ : lila. Medio: PBS 100 mM, pH 7.5.  $\lambda_{abs} = 495 \text{ nm}$ .

Los resultados de los ensayos de liberación controlada de  $NM_{Doxo-GOx}$  se ilustran en la **Figura V.26**. En los estudios empleando proteasa de *S. griseus* (**a**) se observa que, en ausencia del estímulo (**curva verde**), la carga queda retenida en el interior de la estructura mesoporosa de NM. Este resultado revela que la puerta molecular GOx bloquea adecuadamente los poros evitando la salida incontrolada de la carga. El pequeño porcentaje de liberación obtenido (en torno al 20 %) puede estar causado por restos de Doxo adsorbidos en la superficie de la enzima debido a deficiencias en los procesos de lavado. En cambio, en presencia del estímulo (**curva lila**), la carga se libera al medio alcanzando su nivel máximo a los 150 min aproximadamente. La notable entrega de la carga se atribuye a la hidrólisis de la GOx por las proteasas, un proceso que imita a las enzimas lisosomales presentes en la vía endocítica de las células. Adicionalmente, para ahondar en la caracterización de  $NM_{Doxo-GOx}$ , se procedió a realizar los ensayos de liberación en un entorno más complejo y parecido al de aplicación. Para ello, se empleó extracto lisosomal purificado (**b**). Cuando el nanomotor se pone en contacto con los componentes lisosomales, la carga sale preferentemente al medio (**curva lila**). Por tanto, se puede concluir que  $NM_{Doxo-GOx}$  es capaz de liberar su carga en respuesta a un estímulo proteolítico intracelular.

En este caso, no es posible investigar si el movimiento mejora la liberación ya que, para que el proceso comience es imprescindible que la GOx se degrade y eso también causa la inactivación del motor. No obstante, esto no es una desventaja necesariamente pues, según nuestra hipótesis, la autopropulsión ha de tener lugar en el TME y la entrega de la carga ha de producirse en el interior celular.



**Figura V.26. Ensayos de liberación controlada de  $NM_{Doxo-GOx}$ .** a Estímulo: proteasa de *S. griseus*. b Estímulo: extracto lisosomal de hígado fresco de conejo. PBS: verde, presencia de proteasa o extracto lisosomal: lila. La flecha indica el momento en el que se añadió el estímulo. Medio: PBS 100 mM, pH 7.5.  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 555$  nm. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, mediante los ensayos de liberación forzada (Sección V.5.5.1, Ecuación V.2), se determinó la carga de los nanodispositivos sintetizados (Tabla V.7).

**Tabla V.7. Cantidad de Doxo encapsulada en las distintas nanopartículas sintetizadas.** Calculada a partir de los ensayos de liberación forzada (Ecuación V.2).

NANOPARTÍCULA	CANTIDAD DE DOXO ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ sólido)
$NM_{Doxo-GOx}$	67
$NM_{Doxo-BSA}$	34
$NM_{GOx}$	0

En resumen, los datos expuestos en este apartado demuestran que el nanomotor construido presenta la capacidad de modular la entrega de Doxo en función de actividad proteolítica, tanto de enzimas añadidas exógenamente como de las presentes en los lisosomas celulares. De este modo, se confirma *in vitro* la doble funcionalidad esperada: difusividad mejorada en respuesta a glucosa y liberación controlada de la droga transportada, permitiendo pasar a valorar si se éstas se traducen en la eliminación de las células cancerosas.

#### V.6.4 Caracterización de las habilidades antitumorales del nanomotor

Las habilidades antitumorales del nanomotor final y de las nanopartículas control se evaluaron en 3 modelos: cultivo celular 2D, esferoides tumorales 3D y en un modelo murino de xenoinjerto. En todos los casos, se emplearon células derivadas de cáncer de cérvix humano (línea celular HeLa). El mecanismo antitumoral propuesto se representa en la Figura V.27. En adelante, se describen los experimentos realizados y las principales conclusiones alcanzadas.

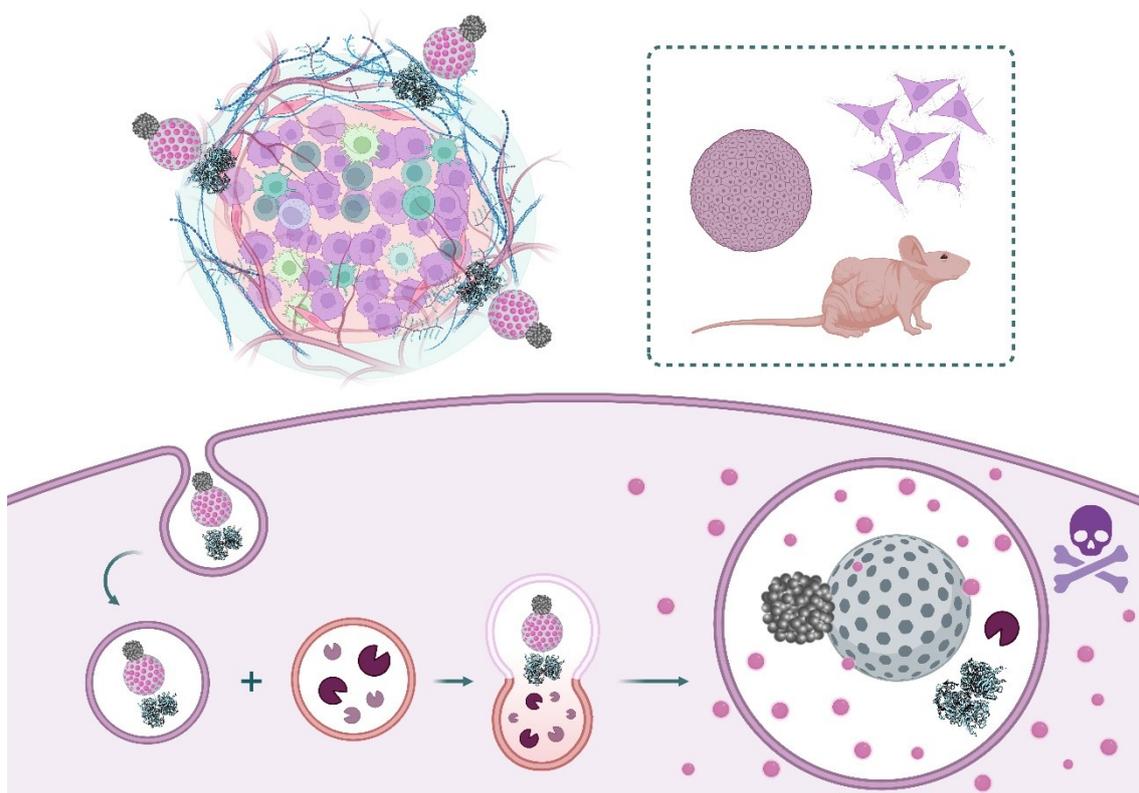


Figura V.27. Representación de las habilidades antitumorales de  $NM_{Doxo-GOx}$ .

#### V.6.4.1 $NM_{Doxo-GOx}$ reduce la población de células cancerosas

Tras confirmar la correcta internalización celular del nanomotor (Figura V.28), se investigó si  $NM_{Doxo-GOx}$  es adecuado para mejorar la terapia contra el cáncer mediante estudios de citotoxicidad en cultivos 2D y 3D (Sección V.5.6).

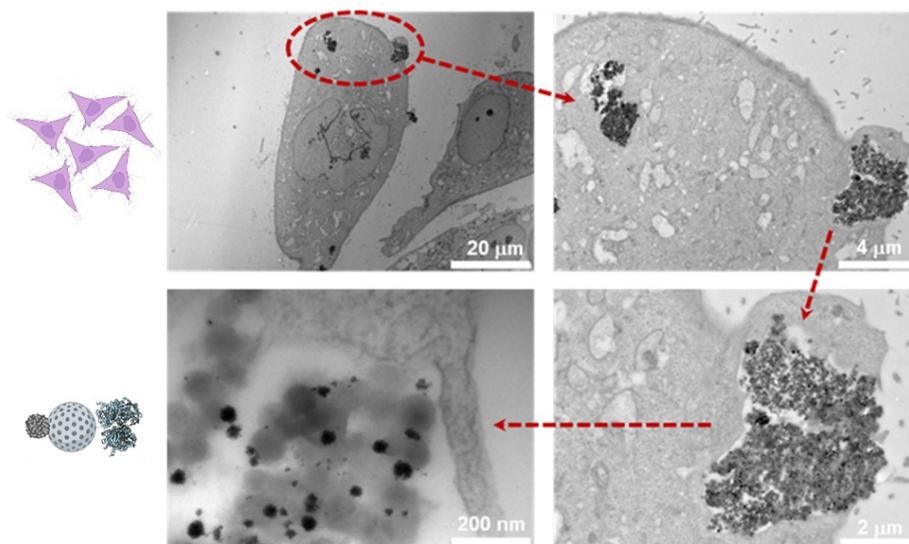
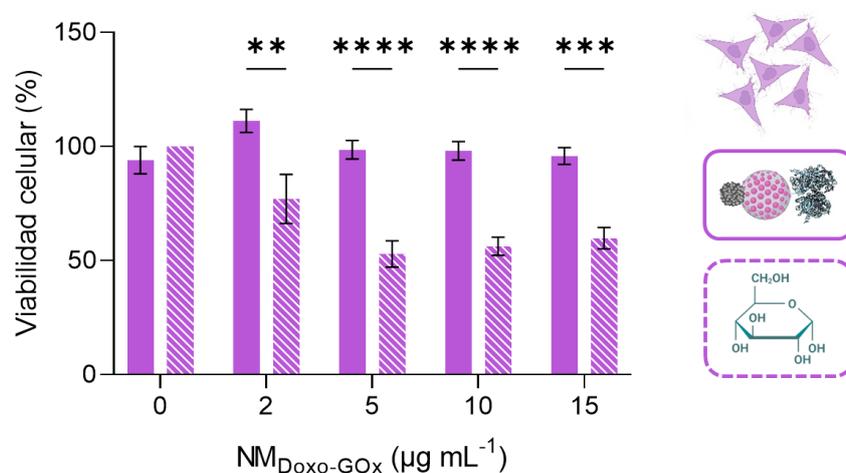


Figura V.28. Internalización celular del nanomotor. Evaluada mediante TEM tras la incubación de células HeLa con  $NM_{GOx}$  (sin Doxo para evitar la toxicidad asociada) durante 24 h a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las imágenes pertenecen a la misma célula y muestran el proceso de endocitosis a diferentes aumentos (siguiendo la flecha roja). Como se puede observar, los nanomotores se localizan en los compartimentos celulares donde se encuentran las enzimas proteolíticas (lisosomas).

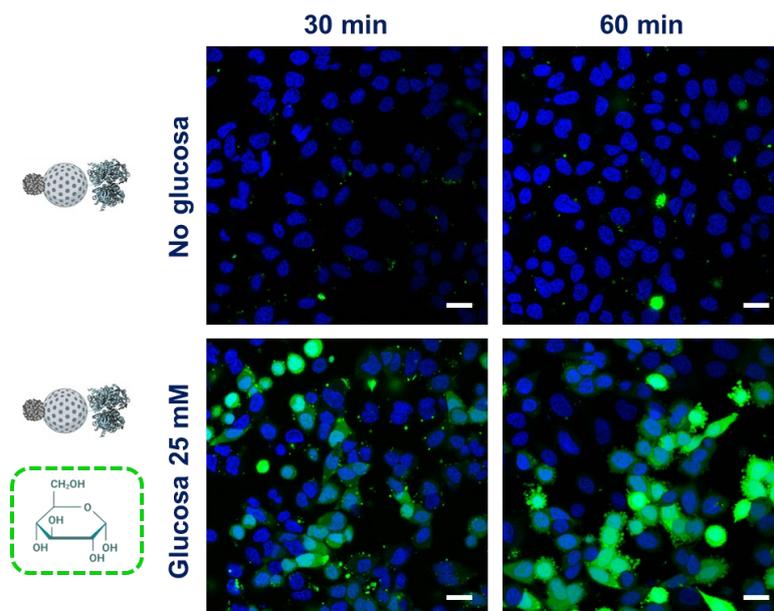
### - Cultivo 2D de células HeLa

En este modelo se evaluó la influencia del movimiento en el efecto citotóxico de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ . Para ello, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular en ausencia y presencia del combustible. Los resultados, mostrados en la **Figura V.29**, indican que el nanomotor a concentraciones muy bajas y presencia de glucosa (**lila rayado**) logra un gran efecto terapéutico. Así, a una dosis de solo  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  ya se observa una reducción significativa en la viabilidad de las células cancerosas, la cual desciende hasta el 53 % a una dosis de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por el contrario, a las mismas concentraciones de nanomotor, pero ausencia de glucosa (**lila**), la viabilidad celular se mantiene cercana al 100 %. En ambas condiciones, al aumentar la cantidad de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ , la muerte celular también se incrementa. Este potente efecto citotóxico es el esperado como consecuencia de la liberación intracelular de Doxo.



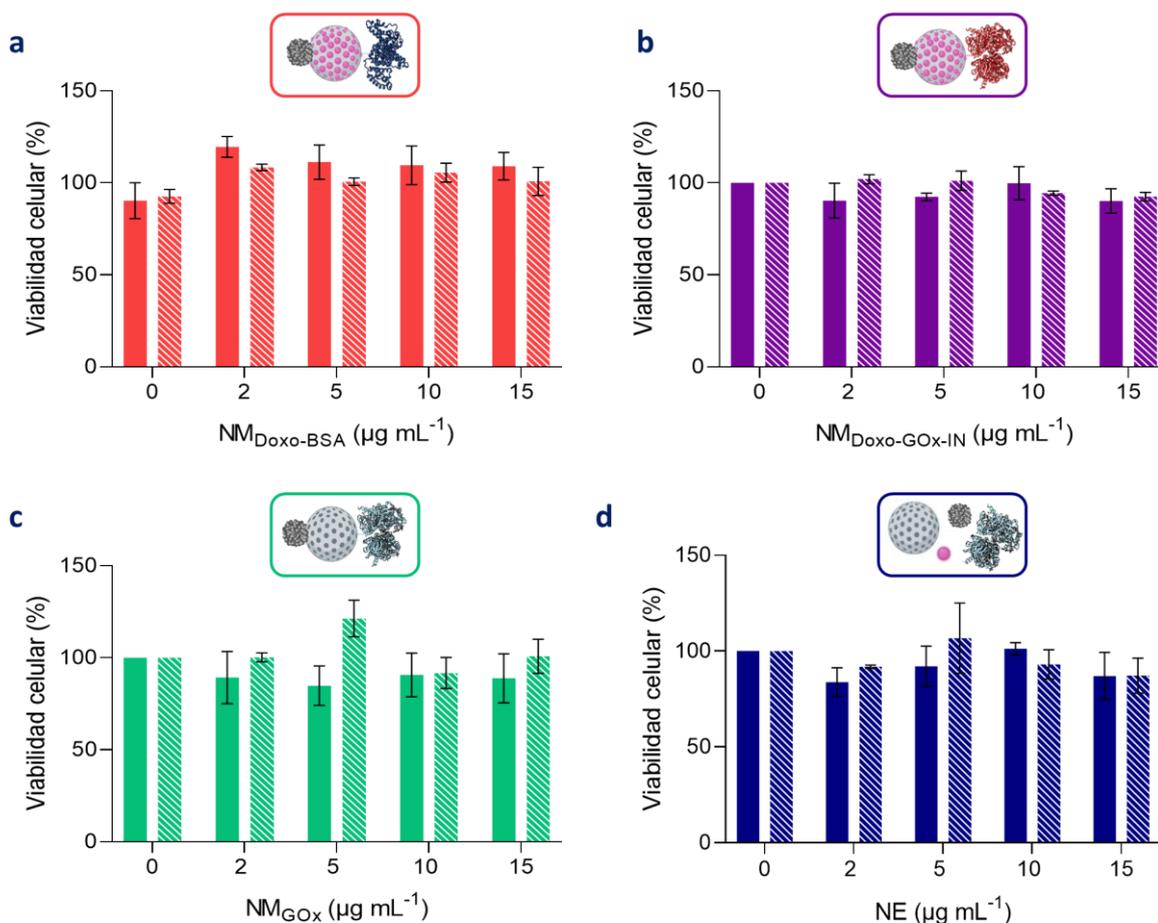
**Figura V.29. Toxicidad de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  en cultivo 2D de células HeLa.** Determinada mediante ensayo WST-1 tras 24 h de tratamiento con el nanomotor En ausencia (lila) y presencia de glucosa (25 mM, lila rayado). Concentraciones de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  de 2 a  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

El siguiente paso fue investigar si el nanomotor inducía la generación de ROS debido a la actividad en cascada de la GOx y el Pt (**Reacción V.2**). Para estos estudios se empleó  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  en lugar de  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  para evitar la toxicidad de la droga. Las imágenes de CLSM (**Figura V.30**) confirman que el tratamiento con  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  a altas concentraciones y presencia de glucosa da lugar a la producción intracelular de ROS (**verde**). Este resultado indica que parte del efecto citotóxico del nanomotor se debe a la inducción de estrés oxidativo en las células diana. Para determinar qué papel concreto desempeñan las ROS en la muerte celular sería necesario repetir estos ensayos en el mismo rango de concentraciones empleado en los ensayos de viabilidad (de 2 a  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura V.30. Producción intracelular de ROS utilizando DCFDA-H2DCFDA como sonda de detección.** Las células HeLa se trataron con  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  en ausencia o presencia de glucosa (25 mM). Azul: núcleos celulares, verde: DCF oxidado por ROS. Imagen obtenida por CLSM. Barra de escala  $20 \mu\text{m}$ .

Por último, se realizaron ensayos de viabilidad celular empleando las nanopartículas control en ausencia y presencia de glucosa (**Figura V.31**). Mediante estos experimentos se evaluó la importancia del movimiento,  $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$  (**rojo**) y  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$  (**morado**); de la liberación de la droga,  $\text{NM}_{\text{GOx}}$  (**verde**); de la generación de ROS ( $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$  y  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx-IN}}$ ); y de la combinación de todas las habilidades en un solo nanodispositivo (NE, **azul oscuro**, concentraciones equivalentes a  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$ ) para exhibir un efecto citotóxico significativo. Los resultados revelan la necesidad de que todos los elementos que conforman  $\text{NM}_{\text{Doxo-GOx}}$  estén presentes y ensamblados para generar la sinergia que provoca la eliminación efectiva de las células cancerosas a una muy baja concentración de nanopartículas ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Cuando la concentración de éstas se incrementa (por encima de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , datos no mostrados), la citotoxicidad también lo hace, tal y como se espera por el efecto de la Doxo ( $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$ ,  $\text{NM}_{\text{Doxo-BSA}}$  y NE) o las ROS ( $\text{NM}_{\text{GOx}}$  y NE).



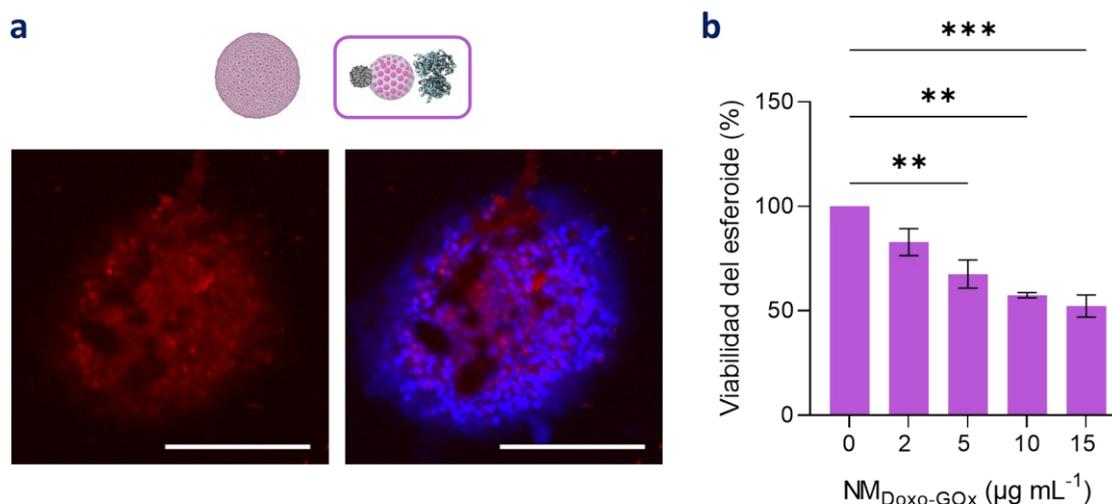
**Figura V.31. Toxicidad de las nanopartículas control en cultivo 2D de células HeLa.** Determinada mediante ensayo WST-1 tras 24 h de tratamiento (concentraciones de 2 a 15  $\mu g mL^{-1}$ ) en ausencia y presencia de glucosa (25 mM, rayado). **a**  $NM_{Doxo-BSA}$  (rojo). **b**  $NM_{Doxo-GOx-IN}$  (morado). **c**  $NM_{GOx}$  (verde). **d** NE (azul oscuro). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

En conjunto, estos datos experimentales sugieren que el aumento de motilidad de los nanomotores por la transformación enzimática de glucosa influye positivamente en la destrucción de las células cancerosas en cultivo 2D, mediante la administración mejorada de Doxo y la producción intracelular de ROS. Además, es remarcable que ni las nanopartículas control ni NA son capaces de generar un efecto terapéutico comparable al exhibido por  $NM_{Doxo-GOx}$  a muy baja concentración.

#### - Esferoides tumorales 3D de células HeLa

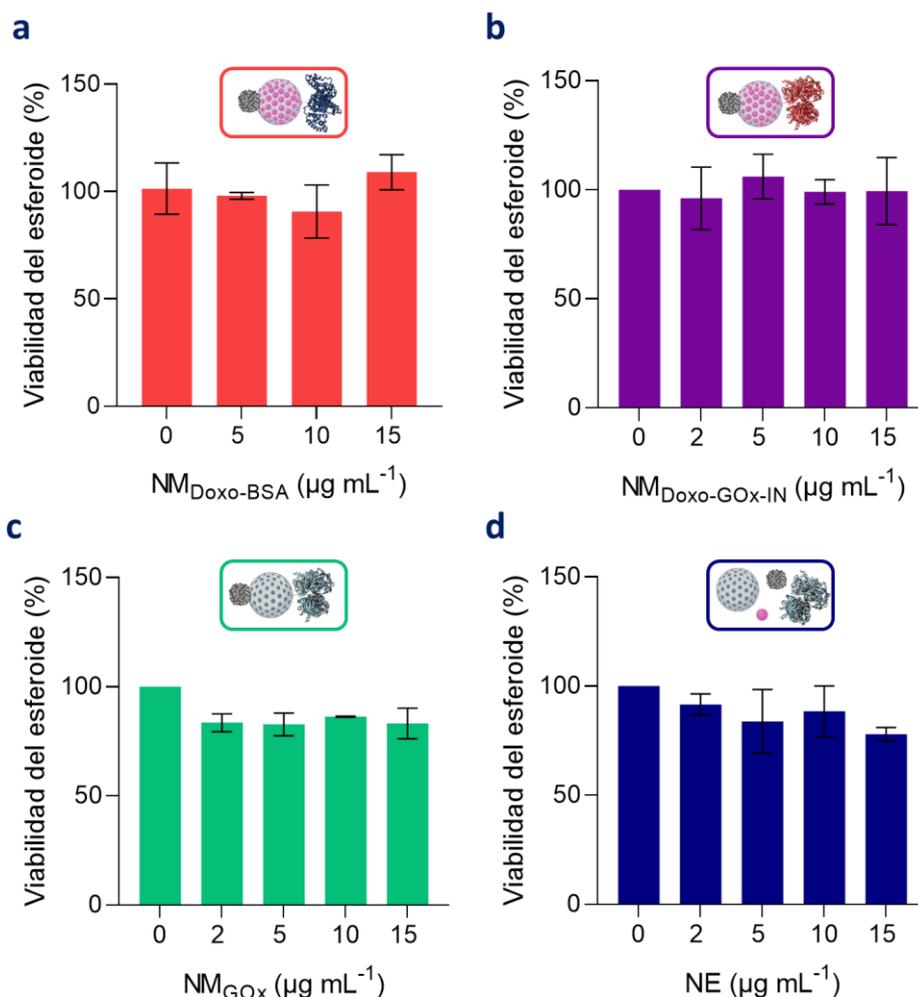
Motivados por los prometedores resultados obtenidos en cultivos celulares 2D, pasamos a investigar el rendimiento de los nanomotores en cultivos multicelulares con estructura 3D, ya que se asemejan más a al comportamiento de los tumores en el organismo. En este caso fue imposible evaluar el efecto de las nanopartículas en ausencia de glucosa, ya que ésta es esencial para mantener la integridad de los esferoides. Los ensayos de proliferación celular en presencia de glucosa (la concentración requerida para que se mantenga la estructura del esferoide es de 25 mM) (**Figura V.32**) indican que el tratamiento de los esferoides con  $NM_{Doxo-GOx}$  reduce significativamente su viabilidad, hasta un 48 % a una concentración de 15  $\mu g mL^{-1}$ . Su capacidad citotóxica en este modelo es menor que en cultivo 2D debido a la complejidad e

impenetrabilidad de las estructuras tumorales. Aun así, estos resultados confirman que el nanomotor exhibe un notable efecto terapéutico desencadenando la muerte celular en esferoides 3D a una dosis muy baja.



**Figura V.32. Toxicidad de NM<sub>Doxo-GOx</sub> en esferoides tumorales 3D de células HeLa.** **a** Imagen de CLSM de un esferoide en presencia del nanomotor (50 µg mL<sup>-1</sup>) (azul: núcleos celulares, rojo: Doxo liberada). Barra de escala: 200 µm. **b** Ensayo de viabilidad WST-1 tras 24 h de tratamiento con NM<sub>Doxo-GOx</sub> (concentraciones de 2 a 15 µg mL<sup>-1</sup>). Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

En este modelo las nanopartículas control (NM<sub>Doxo-BSA</sub>, rojo, NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub>, morado, NM<sub>GOx</sub>, verde y NE, azul oscuro) no generan una reducción en la viabilidad celular comparable a la causada por el nanomotor final a las concentraciones ensayadas (Figura V.33). Estos datos apoyan las conclusiones obtenidas en cultivo 2D; es preciso que todos los elementos de NM<sub>Doxo-GOx</sub> colaboren para reducir efectivamente la biomasa de los esferoides tumorales.



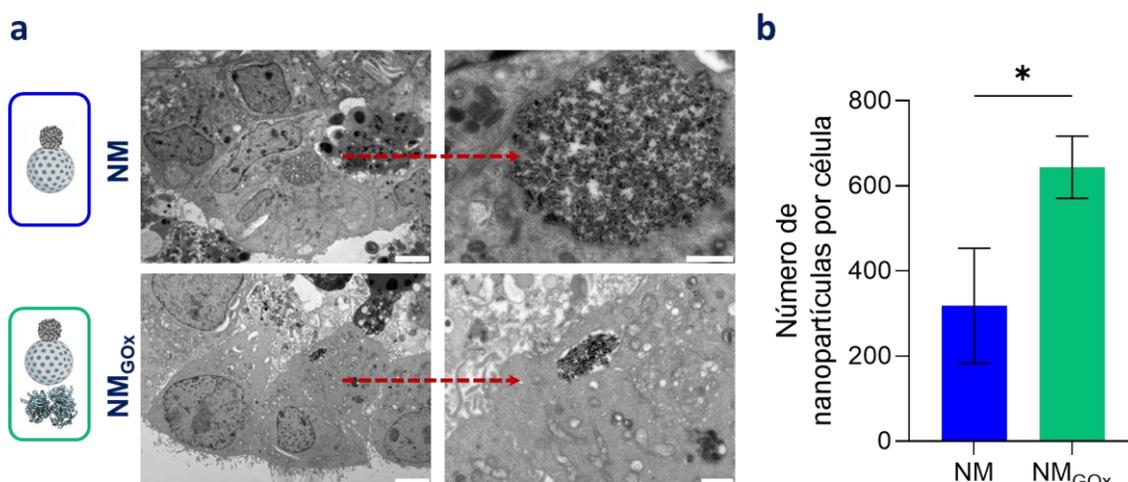
**Figura V.33. Toxicidad de las nanopartículas control en esferoides tumorales 3D de células HeLa.** Determinada mediante ensayo WST-1 tras 24 h de tratamiento (concentraciones de 2 a 15 µg mL<sup>-1</sup>). **a** NM<sub>Doxo-BSA</sub> (rojo). **b** NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub> (morado). **c** NM<sub>GOx</sub> (verde). **d** NE (azul oscuro). Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

#### V.6.4.2 El nanomotor exhibe una mayor penetración tumoral que las nanopartículas pasivas

Hasta el momento, los nanomotores activos desarrollados han demostrado una mejor penetración en un entorno similar a la ECM (**Figura V.23**) y un mayor efecto citotóxico en una estructura similar a un tumor (**Figuras V.32 y V.33**) en comparación con las nanopartículas pasivas. No obstante, para poder concluir de forma certera que la capacidad anticancerígena de NM<sub>Doxo-GOx</sub> se debe a que su autopropulsión potencia una penetración más profunda en el tumor, se llevaron a cabo diversos estudios en esferoides tumorales 3D (**Sección V.5.6.2**).

Por un lado, la penetración tumoral de los nanomotores se estudió mediante TEM. Para ello, los esferoides se trataron con NM<sub>GOx</sub> (sin Doxo para eludir la toxicidad) o con NM (como control pasivo). En ambos casos, los nanodispositivos se visualizan claramente en el interior del citoplasma de las células cancerosas (**Figura V.34a**). Al cuantificar el número de nanopartículas por célula (**Figura V.34b**), se observa que en los esferoides tratados con NM<sub>GOx</sub> (**verde**) es casi 2 veces superior que en los esferoides tratados con NM (**azul**). Estos hallazgos apuntan a que la difusión del nanomotor resulta en una internalización celular mejorada. Sin embargo, mediante

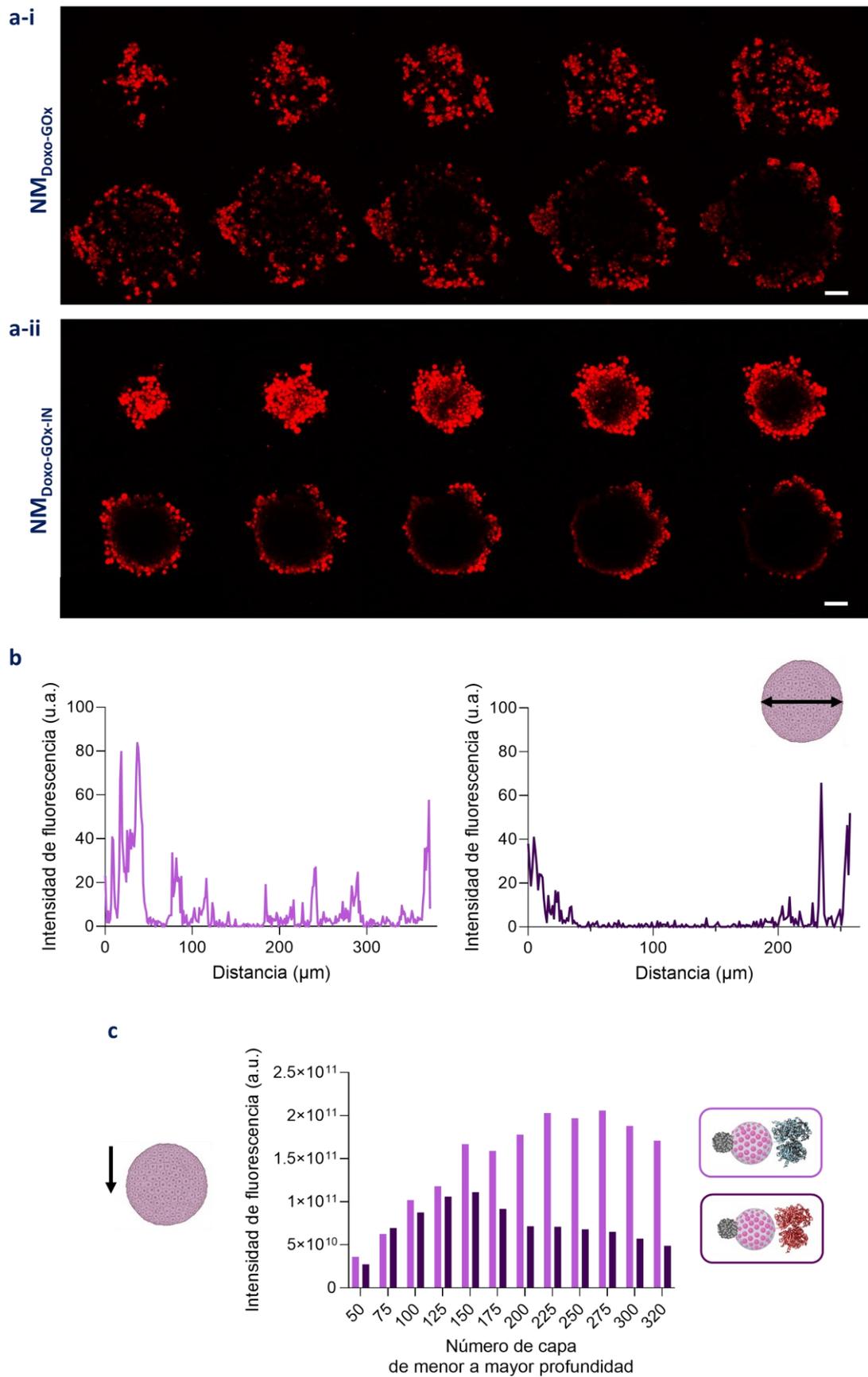
esta técnica no se puede determinar su alcance en términos de profundidad. Además, el control pasivo seleccionado no es el más adecuado pues, al carecer de funcionalización superficial, su tamaño y carga superficial son diferentes, lo cual puede afectar a los parámetros evaluados.



**Figura V.34. Evaluación de la internalización del nanomotor en esferoides tumorales 3D de células HeLa.** **a** Imágenes TEM mostrando la endocitosis a diferentes aumentos (siguiendo la flecha roja). Barra de escala: 4 y 1  $\mu\text{m}$ . **b** Cuantificación del número de nanopartículas por célula utilizando el programa ImageJ. NM: azul. NM<sub>GOx</sub>: verde. Los nanodispositivos se incubaron durante 4 h a una concentración de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

La penetración tumoral de los nanomotores también se estudió mediante CLSM (**Figura V.35**). Para ello, los esferoides (tamaño aproximado de  $300 \mu\text{m}$ ) se trataron con NM<sub>Doxo-GOx</sub> (cargado con Doxo para posibilitar su visualización) o con NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub> (como control pasivo similar al nanomotor final). En ambos casos, se observa la liberación de Doxo en las distintas secciones (grosor de  $0.57 \mu\text{m}$ ) de los esferoides (**a**). Sin embargo, en el esferoide tratado con la nanopartícula pasiva, la señal fluorescente se localiza mayoritariamente en el borde exterior, mientras que en el núcleo y en las capas más profundas no se aprecia prácticamente la presencia de Doxo. De forma opuesta, en el esferoide tratado con la nanopartícula activa, la señal se localiza también en la parte central de las capas más internas. En este punto es importante recalcar que, debido a la elevada opacidad y compactación de la estructura tumoral, la penetración del láser se ve limitada a aproximadamente el tercio superior del esferoide (aproximadamente  $170 \mu\text{m}$ ).

Los perfiles de fluorescencia de una de las secciones (**b**, profundidad de  $114 \mu\text{m}$ ) apoyan la distribución de la droga observada en las imágenes. En los esferoides tratados con NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub> (**morado**) se localiza en la parte externa y en los tratados con NM<sub>Doxo-GOx</sub> (**lila**) también se localiza en la parte interna. Además, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia total en las distintas secciones ordenadas de menor a mayor profundidad (**c**) también coincide con lo contemplado. En el esferoide incubado con NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub> (**morado**) hay más Doxo en las capas superficiales y en el esferoide incubado con NM<sub>Doxo-GOx</sub> (**lila**) hay más Doxo en las capas profundas. En las imágenes también se observa que la integridad del esferoide tratado con NM<sub>Doxo-GOx</sub> se ve afectada a consecuencia de su toxicidad, mientras que el esferoide tratado con NM<sub>Doxo-GOx-IN</sub> se mantiene prácticamente inalterado.



**Figura V.35. Evaluación de la penetración de los nanomotores en esferoides tumorales 3D de células HeLa. a** Imágenes de CLSM (**a-i**  $NM_{Doxo-GOx}$ , **a-ii**  $NM_{Doxo-GOx-IN}$ ). Barra de escala: 50  $\mu m$ . **b** Perfil de

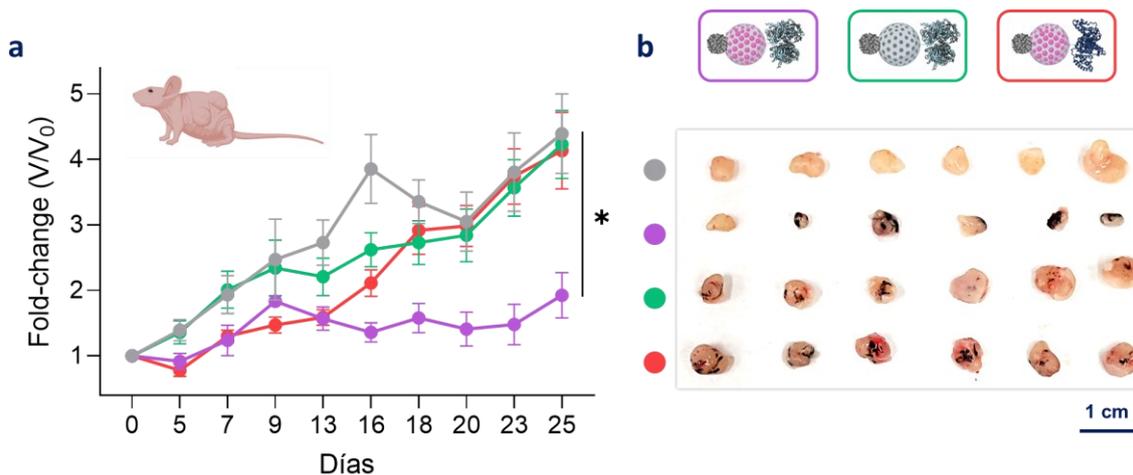
intensidad de fluorescencia en una de las secciones (número 200). **c** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en secciones representativas ordenadas de menor a mayor profundidad. La flecha indica en el sentido de los planos. Las determinaciones de los gráficos b y c se llevaron a cabo con el programa ImageJ.  $NM_{Doxo-GOx}$ : lila,  $NM_{Doxo-GOx-IN}$ : morado.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que el movimiento de los nanomotores en respuesta a la transformación de la glucosa del medio promueve en gran medida el proceso de penetración de los fármacos portados hasta áreas profundas de esferoides tumorales 3D. Este fenómeno podría de una las causas que dan lugar a la eficaz erradicación de las células cancerosas tras el tratamiento con el nanodispositivo activo. No obstante, en este modelo no está presente la ECM de los tumores, la cual podría obstaculizar la difusividad de los nanomotores. Para investigar esa condición se llevó a cabo un ensayo *in vivo*.

#### V.6.4.3 $NM_{Doxo-GOx}$ exhibe actividad anticancerígena *in vivo*

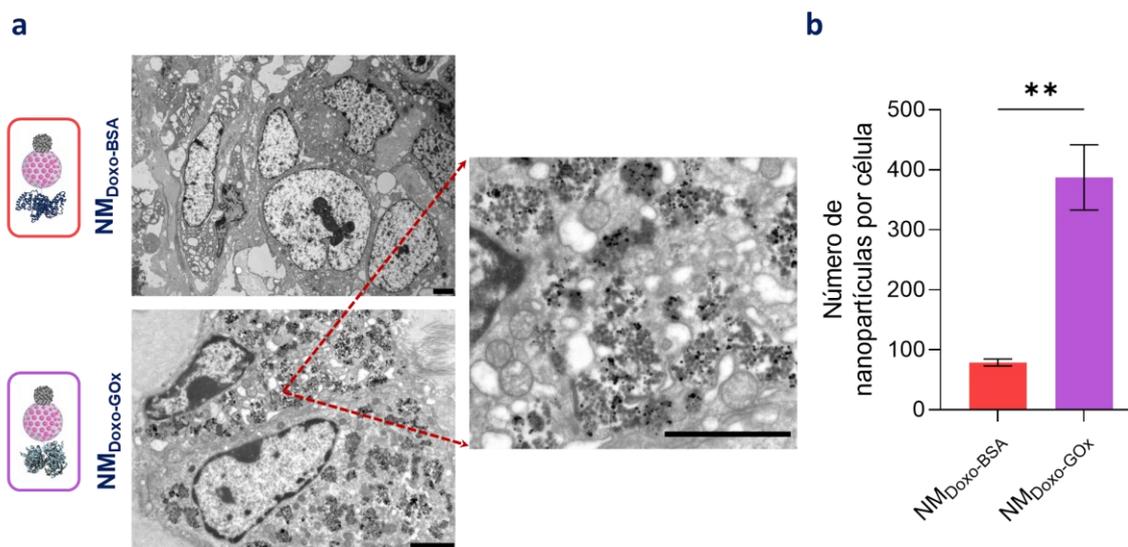
La capacidad antitumoral del nanomotor diseñado se evaluó *in vivo* en un modelo murino de xenoinjerto. El objetivo era comparar el efecto terapéutico de  $NM_{Doxo-GOx}$  con el de las nanopartículas control desprovistas de sus habilidades fundamentales: liberación de fármacos,  $NM_{GOx}$ , y autopropulsión,  $NM_{Doxo-BSA}$ . Sólo se seleccionó una nanopartícula pasiva representativa entre todas las sintetizadas para reducir el número de grupos experimentales por razones éticas. Para constituir el modelo se inyectaron células HeLa por vía subcutánea en el flanco dorsolateral de ratones Balb/c inmunodeprimidos, dando lugar a la formación de tumores sólidos. Cuando éstos alcanzaron un volumen de aproximadamente  $25 \text{ mm}^3$  (día 13), comenzó la administración de los tratamientos. Las nanopartículas se inyectaron en el tumor dos veces por semana durante 4 semanas a una dosis de  $15 \mu\text{g tumor}^{-1}$  (Sección V.5.7, Figura V.5).

En la Figura V.36a se representa la monitorización del crecimiento tumoral tras el tratamiento con los nanomotores y las nanopartículas control. Para cada tumor se calculó el volumen tumoral mediante la Ecuación V.3 y después se determinó el cambio de volumen con respecto al volumen inicial (*fold-change*,  $V/V_0^{-1}$ ). Como se puede observar, los tumores de los grupos tratados con  $NM_{GOx}$  (verde) y  $NM_{Doxo-BSA}$  (rojo) crecen hasta niveles comparables a los de los ratones no tratados (gris). Así, mediante este experimento no se logra determinar que las nanopartículas incompletas posean efecto terapéutico a la dosis aplicada. En cambio, el grupo tratado con  $NM_{Doxo-GOx}$  sí muestra una inhibición significativa en el crecimiento tumoral (lila). Esto también se ve respaldado por la fotografía de los tumores extraídos al final del experimento (Figura V.35b). En ella se aprecia a simple vista que el tratamiento con  $NM_{Doxo-GOx}$  reduce las dimensiones tumorales. Estos resultados revelan que el nanomotor desarrollado también posee actividad anticancerígena *in vivo*.



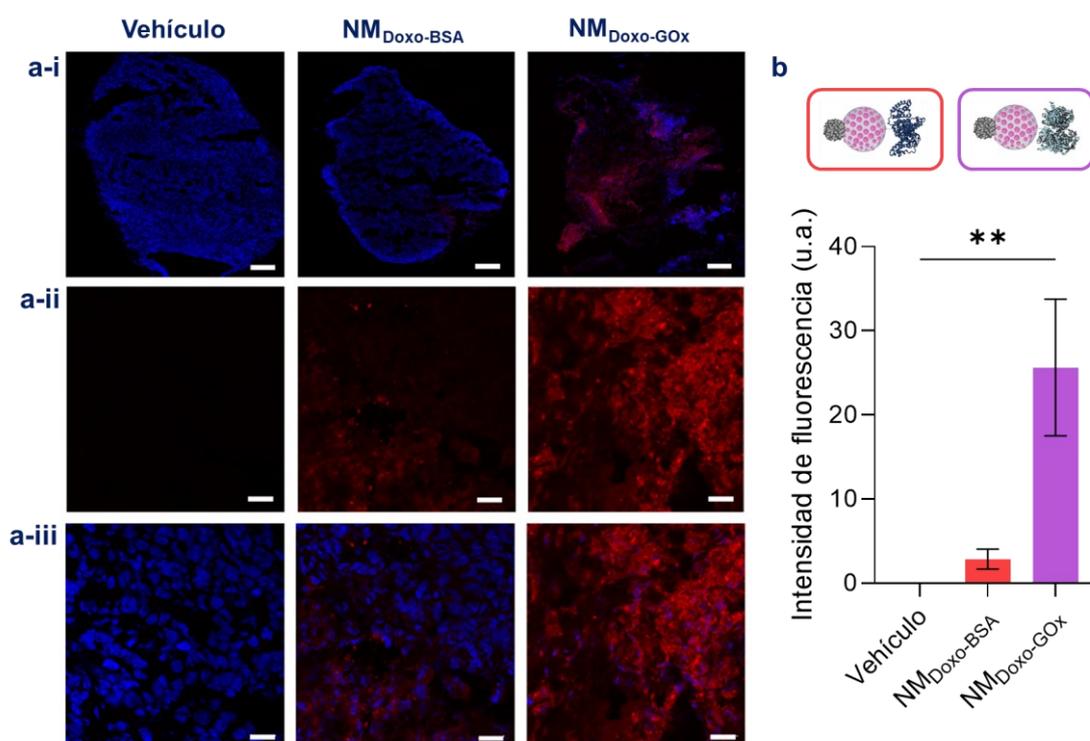
**Figura V.36. NM<sub>Doxo-GOx</sub> reduce el volumen tumoral *in vivo*.** **a** Monitorización del volumen tumoral a lo largo del tratamiento (representado como *fold-change*,  $V/V_0$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados de 6 tumores. Vehículo: gris, NM<sub>GOx</sub>: verde, NM<sub>Doxo-BSA</sub>: rojo y NM<sub>Doxo-GOx</sub>: lila. \*  $p < 0.05$ . **b** Fotografía de los tumores al final del experimento.

Alentados por estos prometedores hallazgos y por los anteriores resultados de penetración en un microambiente que imita la ECM y en esferoides tumorales 3D, se decidió investigar si, en este modelo *in vivo*, el movimiento mejora la dispersión de los nanomotores en el tejido tumoral profundo y la posterior captación celular. Para ello, se comparó el número de nanopartículas por célula en secciones de tumores tratados con NM<sub>Doxo-GOx</sub> o con NM<sub>Doxo-BSA</sub> (Figura V.37). Como indican las imágenes obtenidas por TEM (a) y la posterior cuantificación (b), el número de nanodispositivos que alcanzan el citoplasma celular es 4 veces superior en los ratones tratados con NM<sub>Doxo-GOx</sub> (lila) que en los tratados con el control (rojo). Esto prueba que la difusión del nanomotor lleva a una mayor internalización en las células cancerosas.



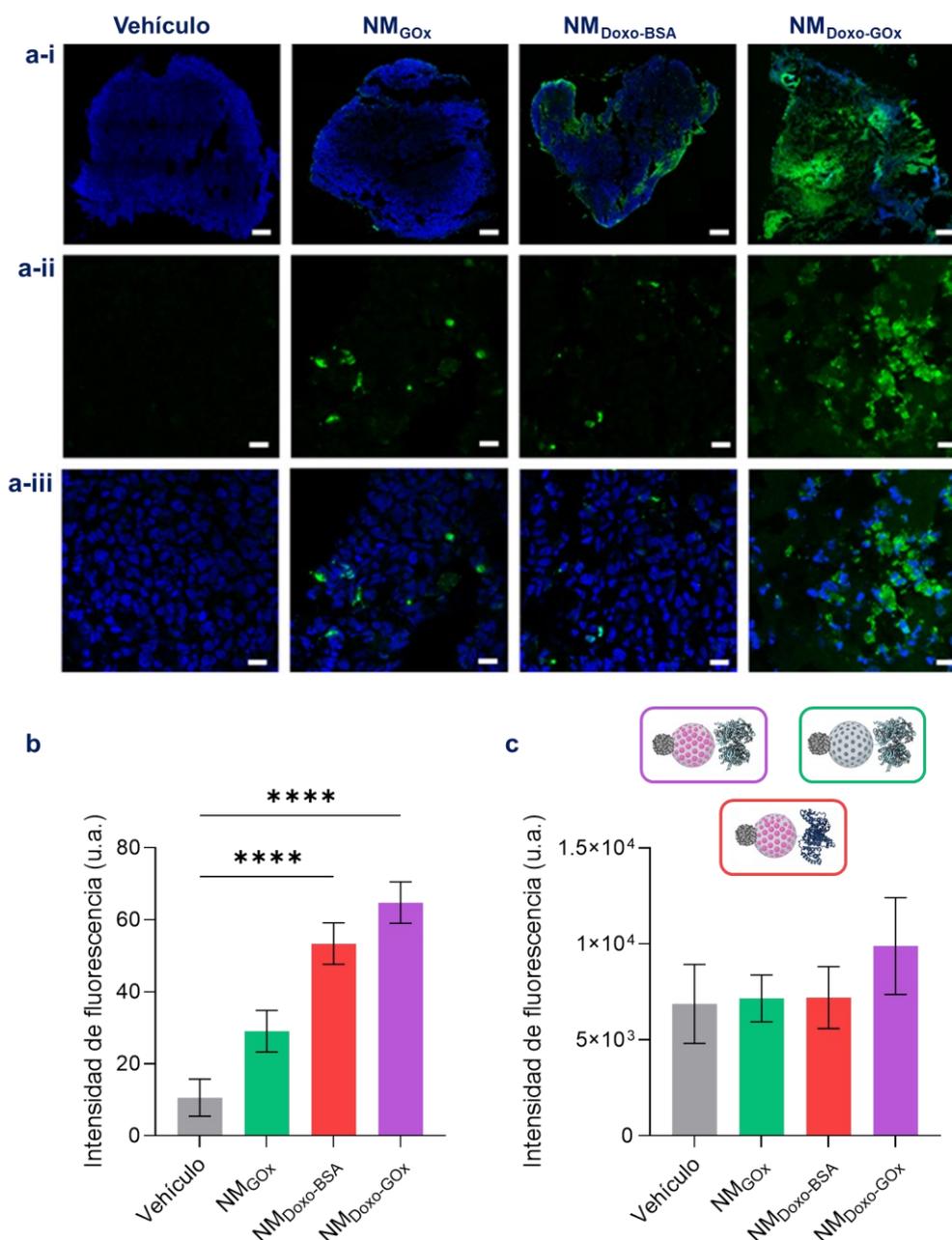
**Figura V.37. Penetración de NM<sub>Doxo-GOx</sub> en tejido tumoral profundo *in vivo*.** **a** Imágenes de TEM. Barra de escala: 2  $\mu$ m. **b** Cuantificación del número de nanopartículas por célula mediante el programa ImageJ. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 tumores. NM<sub>Doxo-BSA</sub>: rojo, NM<sub>Doxo-GOx</sub>: lila. \*\*  $p < 0.01$ .

Además, también investigamos si en este entorno la autopropulsión se traduce en una entrega mejorada del fármaco, tal y como ocurre en los modelos simplificados anteriormente evaluados. Para este fin, se comparó la fluorescencia derivada de la liberación intracelular de la droga en secciones de tumores tratados con el nanomotor final o con la nanopartícula no dotada de movimiento (**Figura V.38**). Las imágenes de CLSM (**a**) y la cuantificación de la señal fluorescente (**b**) muestran que la cantidad de Doxo liberada es mucho más alta en las células de los ratones tratados con  $NM_{Doxo-GOx}$  (**lila**) que en los tratados con  $NM_{Doxo-BSA}$  (**rojo**). Esto confirma que el movimiento del nanomotor conduce a una mayor liberación del fármaco en las células cancerosas. Luego, los datos de TEM y CLSM apuntan a que la autopropulsión favorece la penetración en la ECM tumoral, llegando a alcanzar células localizadas en áreas profundas.



**Figura V.38. Liberación mejorada de Doxo *in vivo* por  $NM_{Doxo-GOx}$ .** **a** Imágenes CLSM. Azul: núcleos celulares, rojo: Doxo. **a-i** Sección completa de un tumor (barra de escala = 100  $\mu$ m). **a-ii-iii** Imágenes ampliadas (barra de escala = 20  $\mu$ m). **b** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia empleando el programa ImageJ (seleccionando 3 campos aleatorios en cada imagen). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados de 4 tumores.  $NM_{Doxo-BSA}$ : rojo,  $NM_{Doxo-GOx}$ : lila. \*\*\*  $p < 0.001$ .

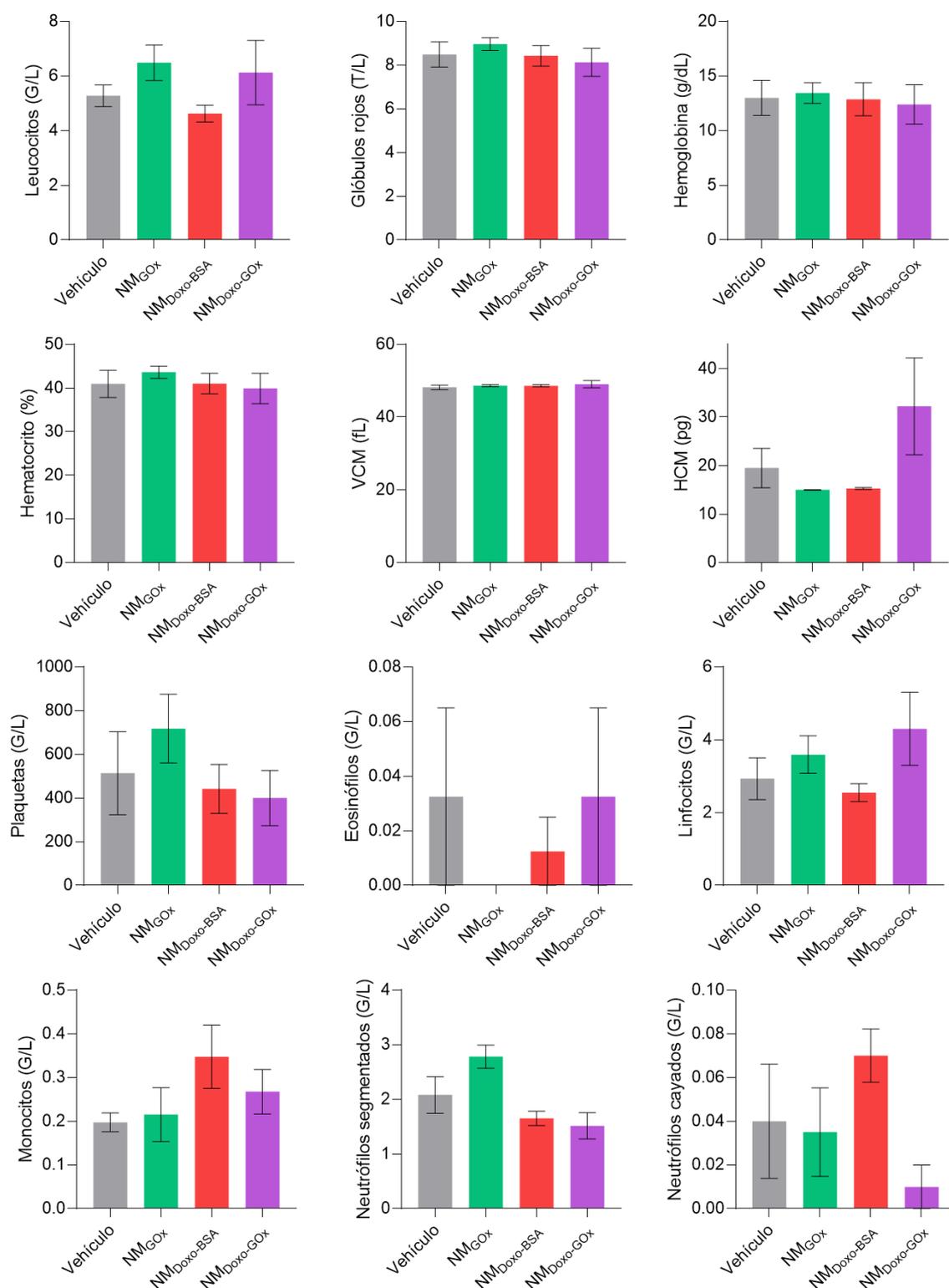
El siguiente paso fue estudiar los niveles de muerte celular en las secciones tumorales. El análisis histológico mediante el ensayo TUNEL revela que la terapia con  $NM_{Doxo-GOx}$  produce una citotoxicidad mayor que el resto de los tratamientos ( $NM_{GOx}$  y  $NM_{Doxo-BSA}$ ). Este efecto se observa claramente en las imágenes de CLSM (**Figura V.39a**) y en la consiguiente cuantificación (**Figura V.39b**). Estos resultados concuerdan con la reducción del crecimiento tumoral observada en la **Figura V.36**. El incremento en la muerte celular se atribuye a que la motilidad del nanomotor confiere una mayor penetración de la Doxo a través de la ECM tumoral y, por tanto, una mejora en su efecto citotóxico. Además, esto también se combina con la producción de ROS asociada a la actividad de la enzima y el metal en el nanomotor, aunque los resultados obtenidos no son significativos (**Figura V.39c**).



**Figura V.39. Citotoxicidad de  $NM_{Doxo-GOx}$  *in vivo*.** **a-b** Ensayo TUNEL tras el tratamiento con los distintos nanodispositivos. **a** Imágenes CLSM representativas. Azul: núcleos celulares, verde: células apoptóticas. **a-i** Sección completa de un tumor (barra de escala = 100  $\mu m$ ). **a-ii-iii** Imágenes ampliadas (barra de escala = 20  $\mu m$ ). **b** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (células muertas, TUNEL<sup>+</sup>) empleando el programa ImageJ (seleccionando 3 áreas aleatorias de cada imagen en al menos 3 cortes de 4 tumores). **c** Producción de ROS utilizando DCFDA-H2DCFDA como sonda de detección. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados de 4 tumores. Vehículo: gris,  $NM_{GOx}$ : verde,  $NM_{Doxo-BSA}$ : rojo,  $NM_{Doxo-GOx}$ : lila. \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

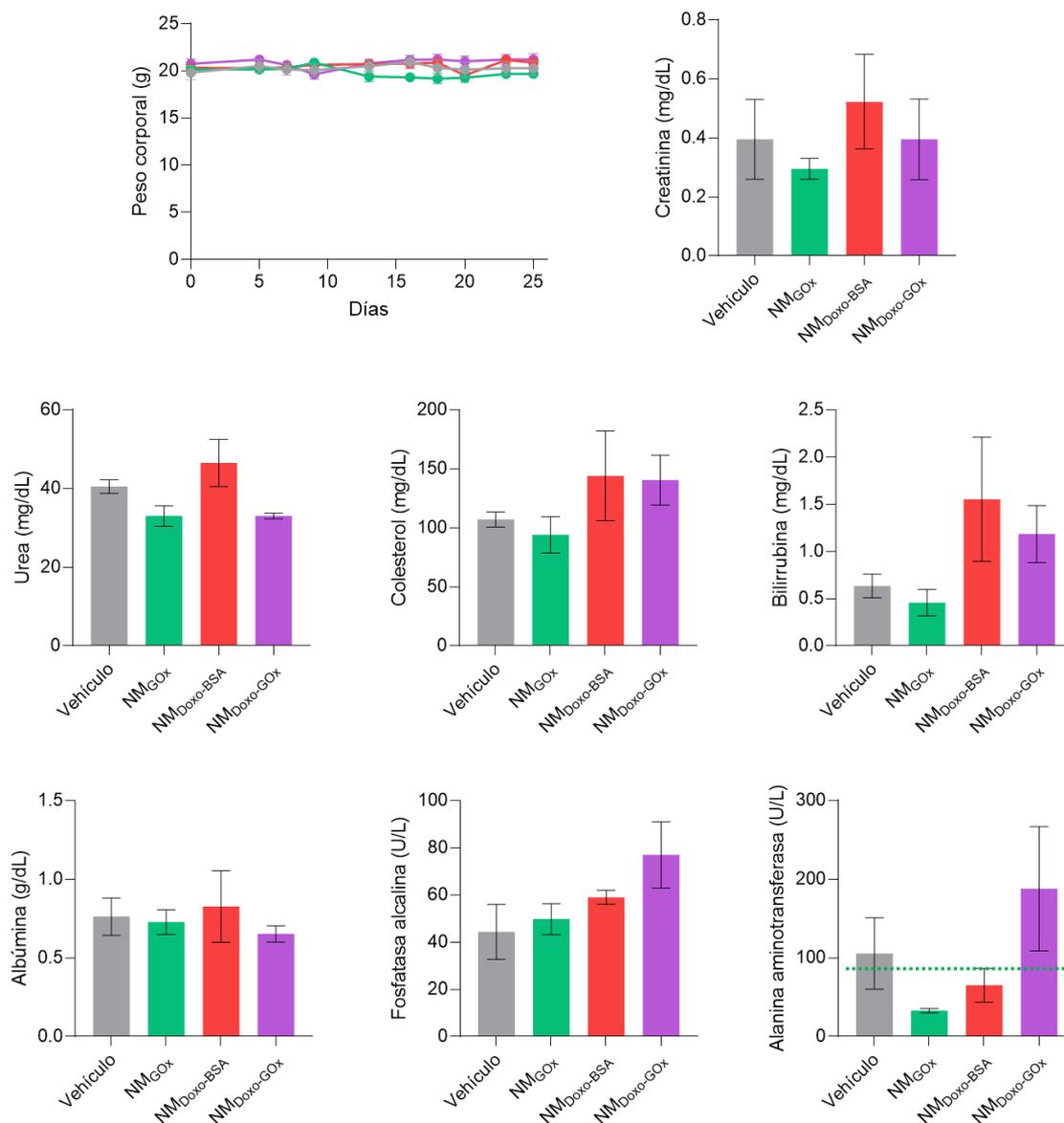
Para concluir, se evaluó la bioseguridad del tratamiento con el nanomotor mediante el control del peso corporal de los ratones durante todo el experimento y mediante análisis bioquímicos y hematológicos en muestras de sangre de los ratones al final del experimento. Los parámetros estudiados muestran fluctuaciones no significativas (Figura V.40 y V.41), con excepción de la actividad de la enzima ALT, cuyos niveles de se encuentran fuera de lo normal.

En conjunto, estos datos sugieren que los nanodispositivos preparados no generan efectos adversos en el organismo a las dosis y vía de administración aplicadas, aunque podrían desencadenar cierta toxicidad hepática a largo plazo.



**Figura V.40. Evaluación de la biocompatibilidad de las nanopartículas (I).** Recuento hematológico en muestras de sangre de los ratones al final del estudio: leucocitos ( $\text{g L}^{-1}$ ), glóbulos rojos ( $\text{T L}^{-1}$ ), hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ ), hematocrito (%), VCM (fL), HCM (pg), plaquetas ( $\text{g L}^{-1}$ ), eosinófilos ( $\text{g L}^{-1}$ ), linfocitos

(g L<sup>-1</sup>), monocitos (g L<sup>-1</sup>), neutrófilos segmentados (g L<sup>-1</sup>) y neutrófilos cayados (g L<sup>-1</sup>), (media ± SEM, n = 4). Vehículo: gris, NM<sub>GOx</sub>: verde, NM<sub>Doxo-BSA</sub>: rojo, NM<sub>Doxo-GOx</sub>: lila.



**Figura V.41. Evaluación de la biocompatibilidad de las nanopartículas (II).** Variación del peso corporal de los ratones desde el inicio hasta el final de los tratamientos y análisis bioquímico en muestras de sangre de los ratones al final del estudio: creatinina (mg dL<sup>-1</sup>), urea (mg dL<sup>-1</sup>), colesterol (mg dL<sup>-1</sup>), bilirrubina (mg dL<sup>-1</sup>), albúmina (g dL<sup>-1</sup>), FA (U L<sup>-1</sup>) y ALT (U L<sup>-1</sup>), (media ± SEM, n = 4). Vehículo: gris, NM<sub>GOx</sub>: verde, NM<sub>Doxo-BSA</sub>: rojo, NM<sub>Doxo-GOx</sub>: lila. La línea verde indica el valor umbral a partir del cual la actividad ALT se considera fuera de lo normal.

En suma, la información obtenida mediante los ensayos descritos sobre estas líneas demuestra que el nanomotor ideado presenta efecto terapéutico al reducir el volumen de los tumores sólidos *in vivo*. Esta notable acción antitumoral es el resultado de la sinergia entre la autopropulsión (dada por la nanoarquitectura y los componentes catalíticos del nanomotor) y la liberación controlada del fármaco (dada por el uso de una puerta molecular sensible a proteasas). Es decir, la difusión a través de la ECM del tumor da lugar a una internalización

celular mejorada que favorece la liberación localizada de Doxo. Finalmente, la droga provoca la muerte de las células cancerosas.

Además, las actividades catalíticas del nanomotor podrían estar contribuyendo a la producción de ROS,<sup>383</sup> al consumo de la glucosa del TME (terapia de inanición)<sup>384</sup> y al alivio de la hipoxia tumoral (por la generación de O<sub>2</sub>).<sup>226</sup> Todos estos procesos también asistirían la eliminación de las células cancerosas. Sin embargo, no han sido confirmados experimentalmente. Además, tampoco se ha evaluado el efecto de inyectar las nanopartículas por vía intravenosa. Mediante esa ruta de administración, el nanomotor se enfrentaría a obstáculos adicionales que podrían limitar su acción terapéutica. Por ejemplo, su captación por el SFM (que reduciría la dosis que alcanza el tumor) y la hidrólisis de su puerta molecular por las proteasas vasculares (que provocaría la liberación inespecífica de la droga antes de alcanzar su destino). Por tanto, determinar el efecto terapéutico de NM<sub>Doxo-GOx</sub> tras ser administrado sistémicamente es uno de los objetivos que tendrán que ser abordados en el futuro.

## V.7 CONCLUSIONES

En el último capítulo experimental de esta tesis doctoral se ha descrito el diseño, síntesis, caracterización y validación de un nanomotor multifuncional tipo Janus Pt-MSN que utiliza la transformación de glucosa como fuerza motriz y es capaz de mejorar el tratamiento de los tumores sólidos. A continuación, se enumeran las principales conclusiones halladas:

- ✓ Se ha llevado a cabo la **síntesis del nanomotor  $NM_{Doxo-GOx}$**  a partir de la plataforma inorgánica NM. Para ello, la cara de MSN se ha cargado con el fármaco antitumoral Doxo y su superficie externa se ha funcionalizado con la enzima GOx. También se han preparado **nanopartículas control desprovistas de alguna de las habilidades fundamentales**.
- ✓ La estructura y composición de las nanopartículas sintetizadas se han confirmado por las técnicas estándar de caracterización de nanomateriales.
- ✓ La multifuncionalidad del nanomotor se ha validado *in vitro*. Por un lado, se ha demostrado su habilidad para **autopropulsarse en respuesta a glucosa**. Esta funcionalidad se debe a una reacción híbrida en cascada entre la actividad de la GOx (primer elemento del sistema de propulsión) y la cara de Pt (segundo elemento). La enzima transforma glucosa en  $H_2O_2$  y, a su vez, el Pt transforma el  $H_2O_2$  producido localmente en  $O_2$  y  $H_2O$ . Los productos se acumulan en un lado del nanodispositivo (por su estructura asimétrica) y finalmente lo impulsan seguramente siguiendo un mecanismo de **difusioforesis**. Por otro lado, se ha demostrado su habilidad para **controlar la entrega de Doxo en respuesta a actividad proteolítica**. Esta funcionalidad se debe a que la GOx también actúa como puerta molecular sensible a enzimas.
- ✓ La capacidad antitumoral del nanomotor se ha confirmado mediante ensayos biológicos en 3 modelos de cáncer de cérvix: cultivo celular 2D, esferoides tumorales 3D e *in vivo*. En todos ellos,  $NM_{Doxo-GOx}$  da lugar a **eliminación más eficiente de las células cancerosas** que el resto de los tratamientos (nanopartículas incompletas y NE).

Proponemos que el notable efecto antitumoral exhibido *in vivo* se debe a un mecanismo en el que la difusión potenciada por la glucosa endógena del TME impulsa al nanomotor a promover su **penetración profunda a través de la densa y rígida ECM tumoral**, lo que resulta en una internalización celular mejorada. Una vez dentro del compartimento intracelular, el nanomotor lleva a cabo la liberación específica de la Doxo transportada. Ello conduce a la apoptosis celular y a la consiguiente reducción del tamaño del tumor. Por estas características, el nanomotor diseñado cuenta con un enorme potencial como nanotransportador *«inteligente»* para la administración de fármacos en zonas patológicas de difícil acceso como los tumores. Esperamos que esta visión pueda servir como punto de partida para el desarrollo de nuevas aproximaciones para el tratamiento del cáncer.



**CAPÍTULO VI:**  
**CONCLUSIONES**  
**GENERALES**



El objeto de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de una novedosa estrategia para la liberación de fármacos en aplicaciones biomédicas, la cual se basa en nanopartículas multifuncionales autopropulsadas, *i.e.*, **nanomotores**. Las principales conclusiones obtenidas se resumen a continuación:

- ✓ Se ha diseñado un nanomotor basado en una **nanopartícula Janus** anisotrópica con nanoarquitectura de «*muñeco de nieve*» que cuenta con dos caras: **Pt** y **MSN**. Su síntesis se llevó a cabo de forma satisfactoria empleando el método toposelectivo de emulsión de Pickering y su estructura se confirmó por los métodos habituales de caracterización de nanomateriales.
- ✓ El nanomotor exhibió una difusión incrementada en respuesta a la **descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> (g)** por parte de la elevada área catalítica de la cara de Pt. Así, se trata de un nanomotor químico autónomo que sigue el mecanismo motil de propulsión por burbujas.
- ✓ El nanomotor exhibió la habilidad de **transportar moléculas** y de **liberarlas de forma controlada**, gracias a las propiedades de la cara de MSN, *i.e.*, alta capacidad de almacenaje en su sistema de canales ordenados y posibilidad de funcionalización con sistemas de control del transporte de masa tipo estímulo-respuesta. De forma preliminar, se encapsuló una molécula modelo y se empleó una puerta molecular sensible a sustancias redox.
- ✓ La **autopropulsión** del nanomotor resultó en una aceleración en el proceso de apertura de la puerta molecular, **favoreciendo la liberación de la carga**.

Los hallazgos expuestos supusieron el punto de partida para la **aplicación** del nanomotor desarrollado en la entrega de fármacos **en entornos complejos caracterizados por la presencia de BB**, como la ECM de biopelículas y tumores sólidos. Estas estructuras dificultan la llegada de los agentes terapéuticos hasta las áreas patológicas diana, promoviendo la virulencia de las enfermedades en las que están implicadas. Es por ello por lo que la búsqueda de herramientas que favorezca el acceso través de ellas es una de las prioridades en el área de los nanomateriales avanzados.

En cuanto a la aplicación del nanomotor para la **entrega controlada de agentes antimicrobianos a través de la ECM de biopelículas**:

- ✓ Se cargó con un antiséptico, CHX, y se funcionalizó con una puerta molecular sensible a pH. Estaba formada por un complejo de inclusión establecido entre grupos BNZ, que decoraban la superficie de la MSN, y  $\beta$ CDs, que decoraban la proteasa ficina. Asimismo, la correcta síntesis y estructura del nanomotor fue corroborada.
- ✓ El nanomotor exhibió autopropulsión en respuesta a la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disrupción de parte proteica de la ECM bacteriana y liberación controlada del antiséptico a pH ácido.
- ✓ Las habilidades antimicrobianas del nanomotor se validaron en 2 modelos *ex vivo* de infecciones endodónticas: biopelículas orales polimicrobianas derivadas de saliva y

biopelículas de *S. mutans* crecidas sobre dentina. El nanodispositivo mostró una gran eficacia terapéutica, mayor que la lograda por sus distintos componentes administrados por separado.

En cuanto a la aplicación del nanomotor para la **entrega controlada de fármacos anticancerígenos a través de la ECM de tumores sólidos**:

- ✓ Se cargó con un antineoplásico, Doxo, y se funcionalizó con una puerta molecular sensible a enzimas, formada por la enzima GOx unida a la superficie de la MSN mediante enlaces amida. En este caso, ante la necesidad de emplear biocombustibles, la **GOx** también actuaba como **motor enzimático generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ a partir de glucosa**. Del mismo modo, la adecuada fabricación y nanoarquitectura del nanomotor fue comprobada.
- ✓ El nanomotor exhibió un incremento en el coeficiente de difusión en presencia de glucosa, siguiendo probablemente un mecanismo de **propulsión por difusioforesis**; así como liberación controlada de Doxo en respuesta a la acción de proteasas.
- ✓ Las capacidades anticancerígenas del nanomotor se validaron en 3 modelos de cáncer de cérvix: cultivo 2D, esferoides tumorales 3D y un modelo murino de xenoinjerto. En todos los casos, el nanodispositivo logró reducir la población de células malignas en mayor grado que las diferentes nanopartículas control incompletas o que sus distintos componentes administrados independientemente.

Como conclusión general, se puede inferir que el nuevo enfoque propuesto cuenta con una gran **potencialidad para mejorar el tratamiento de enfermedades como las infecciones bacterianas o el cáncer**. Además, por su **enorme versatilidad**, el nanomotor desarrollado podría portar otros tipos de fármacos y funcionalizarse con otras puertas moleculares y/o agentes disruptores de la ECM, incrementando su espectro de aplicación a otras patologías. No obstante, a pesar de los avances realizados, aún se ha de refinar ciertos aspectos en vista a lograr su futura aplicación segura y eficaz en entornos biomédicos reales.

En conjunto, esperamos que la información aportada al área de conocimiento de la nanomedicina inspire el desarrollo de nuevas estrategias o al perfeccionamiento de otras ya existentes para contribuir a resolver el reto de la entrega eficaz de agentes terapéuticos en zonas enfermas de difícil acceso, un problema clínico todavía no resuelto en la actualidad.

# **REFERENCIAS**



1. Kumar, N. & Kumbhat, S. *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology. Essentials in Nanoscience and Nanotechnology* (2016). doi:10.1002/9781119096122.
2. Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. Preprint at <https://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html> (1959).
3. Taniguchi, N. On the basic concept of "Nano-Technology". in *the basic concept of "Nano-Technology", Proceedings of the International Conference on Production Engineering Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo* (1974).
4. Drexler, K. E. Engines of creation 2.0." The Coming Era of Nanotechnology. *Anchor Books-Doubleday* 1986, (2006).
5. Binning, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 49, (1982).
6. Trotta, F. & Mele, A. Nanomaterials: Classification and Properties. *Nanosponges* Preprint at <https://doi.org/10.1002/9783527341009.ch1> (2019).
7. Griffin, S. *et al.* Natural nanoparticles: A particular matter inspired by nature. *Antioxidants* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox7010003> (2018).
8. Bhushan, B. Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. Preprint at [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31833-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31833-2_1) (2016).
9. Findik, F. Nanomaterials and their Applications. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences* 9, (2021).
10. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules25010112> (2020).
11. Decuzzi, P. *et al.* Roadmap on nanomedicine. *Nanotechnology* vol. 32 Preprint at <https://doi.org/10.1088/1361-6528/abaadb> (2021).
12. Dawidczyk, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *Journal of Controlled Release* vol. 187 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.036> (2014).
13. Wang, W. & Zhou, C. A Journey of Nanomotors for Targeted Cancer Therapy: Principles, Challenges, and a Critical Review of the State-of-the-Art. *Advanced Healthcare Materials* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adhm.202001236> (2021).
14. Weiss, C. & Diabaté, S. Toxicology and biocompatibility of nanomaterials. *Nanomaterials* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano11113110> (2021).
15. Bourquin, J. *et al.* Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Advanced Materials* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.201704307> (2018).
16. Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W. & Ghandehari, H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006> (2015).
17. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* vol. 33 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nbt.3330> (2015).

18. Abdelhamid, H. N. & Badr, G. Nanobiotechnology as a platform for the diagnosis of COVID-19: a review. *Nanotechnology for Environmental Engineering* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s41204-021-00109-0> (2021).
19. Zhao, Z. *et al.* Recent advances in engineering iron oxide nanoparticles for effective magnetic resonance imaging. *Bioactive Materials* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.014> (2022).
20. Albuquerque, G. M. *et al.* Quantum Dots and Gd<sup>3+</sup> Chelates: Advances and Challenges Towards Bimodal Nanoprobes for Magnetic Resonance and Optical Imaging. *Topics in Current Chemistry* vol. 379 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s41061-021-00325-x> (2021).
21. Xu, Y. *et al.* Hydroxyapatite Nanoparticle-Crosslinked Peptide Hydrogels for Three-Dimensional Culture and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblasts. *J Biomed Nanotechnol* 15, (2019).
22. Nizami, M. Z. I. *et al.* Ceramic Nanomaterials in Caries Prevention: A Narrative Review. *Nanomaterials* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano12244416> (2022).
23. Gamaleia, N. F. & Shton, I. O. Gold mining for PDT: Great expectations from tiny nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12, (2015).
24. Kumar, A. V. P. *et al.* Recent advances in nanoparticles mediated photothermal therapy induced tumor regression. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 606 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120848> (2021).
25. Zhou, W. *et al.* Hafnium-Based Metal-Organic Framework Nanoparticles as a Radiosensitizer to Improve Radiotherapy Efficacy in Esophageal Cancer. *ACS Omega* 7, 12021–12029 (2022).
26. Tang, S. & Zheng, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503> (2018).
27. Patra, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8> (2018).
28. Alavi, M. & Hamidi, M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032> (2019).
29. Samaridou, E., Heyes, J. & Lutwyche, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* vols 154–155 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002> (2020).
30. Cunha, S., Amaral, M. H., Lobo, J. M. S. & Silva, A. C. Lipid nanoparticles for nasal/intranasal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 34, (2017).
31. Madkhali, O. A. Perspectives and Prospective on Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Molecules* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules27051543> (2022).
32. Raman, S. *et al.* Polymeric Nanoparticles for Brain Drug Delivery - A Review. *Curr Drug Metab* 21, (2020).
33. Matalqah, S. M. *et al.* Chitosan Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System: A Review Article. *Curr Drug Targets* 21, (2020).

34. Hu, J. *et al.* Long Circulating Polymeric Nanoparticles for Gene/Drug Delivery. *Curr Drug Metab* 19, (2017).
35. Wang, W., Lu, K. J., Yu, C. H., Huang, Q. L. & Du, Y. Z. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0514-y> (2019).
36. Hill, B. D., Zak, A., Khera, E. & Wen, F. Engineering Virus-like Particles for Antigen and Drug Delivery. *Curr Protein Pept Sci* 19, (2017).
37. Tang, F., Li, L. & Chen, D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials* 24, (2012).
38. Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A. & Auguste, D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 176 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851> (2021).
39. Mohamed, M. *et al.* PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advanced Materials* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174> (2019).
40. Ashkar, A., Sosnik, A. & Davidovich-Pinhas, M. Structured edible lipid-based particle systems for oral drug-delivery. *Biotechnology Advances* vol. 54 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107789> (2022).
41. Dhaval, M. *et al.* Lipid-based emulsion drug delivery systems — a comprehensive review. *Drug Delivery and Translational Research* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01071-9> (2022).
42. Rajpoot, K. Solid Lipid Nanoparticles: A Promising Nanomaterial in Drug Delivery. *Curr Pharm Des* 25, (2019).
43. Haddadzadegan, S., Dorkoosh, F. & Bernkop-Schnürch, A. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 182 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114097> (2022).
44. Kianfar, E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00896-3> (2021).
45. Ma, W. *et al.* The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00727-9> (2021).
46. Wijaya, C. J., Ismadji, S. & Gunawan, S. A review of lignocellulosic-derived nanoparticles for drug delivery applications: Lignin nanoparticles, xylan nanoparticles, and cellulose nanocrystals. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26030676> (2021).
47. Cordeiro, A. S. *et al.* Carboxymethyl- $\beta$ -glucan/chitosan nanoparticles: new thermostable and efficient carriers for antigen delivery. *Drug Deliv Transl Res* 11, (2021).
48. Odeniyi, M., Omoteso, O., Adepoju, A. & Jaiyeoba, K. Starch nanoparticles in drug delivery: A review. *Polymers in Medicine* 48, (2019).
49. Cao, J., Li, X. & Tian, H. Metal-Organic Framework (MOF)-Based Drug Delivery. *Curr Med Chem* 27, (2019).

50. Zhao, J., Weng, G., Li, J., Zhu, J. & Zhao, J. Polyester-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Materials Science and Engineering C* vol. 92 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.027> (2018).
51. D'souza, A. A. & Shegokar, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485> (2016).
52. Hao, F. *et al.* Polyethylenimine-based Formulations for Delivery of Oligonucleotides. *Curr Med Chem* 26, (2018).
53. Sharifzadeh, G., Hezaveh, H., Muhamad, I. I., Hashim, S. & Khairuddin, N. Montmorillonite-based polyacrylamide hydrogel rings for controlled vaginal drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 110, (2020).
54. Hornok, V. Serum albumin nanoparticles: Problems and prospects. *Polymers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/polym13213759> (2021).
55. Jin, Y., Schladetsch, M. A., Huang, X., Balunas, M. J. & Wiemer, A. J. Stepping forward in antibody-drug conjugate development. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 229 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107917> (2022).
56. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* vol. 161 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043> (2012).
57. Chauhan, A. S. Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules* 23, (2018).
58. Lim, Y. W. *et al.* Challenges and Complications of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Long-Acting Drug Product Development. *Pharmaceutics* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030614> (2022).
59. Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G. & Bachmann, M. F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.014> (2017).
60. Tornesello, A. L., Tagliamonte, M., Buonaguro, F. M., Tornesello, M. L. & Buonaguro, L. Virus-Like Particles as Preventive and Therapeutic Cancer Vaccines. *Vaccines* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/vaccines10020227> (2022).
61. Sakai, C. *et al.* Human hepatitis B virus-derived virus-like particle as a drug and DNA delivery carrier. *Biochem Biophys Res Commun* 581, (2021).
62. Zhao, X. S. Novel porous materials for emerging applications. *Journal of Materials Chemistry* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1039/b600327n> (2006).
63. Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C. & Beck, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359, (1992).
64. Beck, J. S. *et al.* A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J Am Chem Soc* 114, (1992).
65. Perego, C. & Millinib, R. Porous materials in catalysis: Challenges for mesoporous materials. *Chem Soc Rev* 42, (2013).
66. Thomas, K. M. Hydrogen adsorption and storage on porous materials. *Catal Today* 120, (2007).
67. Garrido, E. *et al.* Chromogenic and Fluorogenic Probes for the Detection of Illicit Drugs. *ChemistryOpen* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1002/open.201800034> (2018).

68. Wang, Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014> (2015).
69. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci* 26, (1968).
70. Raman, N. K., Anderson, M. T. & Brinker, C. J. Template-based approaches to the preparation of amorphous, nanoporous silicas. *Chemistry of Materials* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1021/cm960138+> (1996).
71. Candela-Noguera, V. Study, development and improvement of MCM41-type MSN synthesis oriented to biomedical applications. (2021).
72. Croissant, J. G., Fatieiev, Y., Almalik, A. & Khashab, N. M. Mesoporous Silica and Organosilica Nanoparticles: Physical Chemistry, Biosafety, Delivery Strategies, and Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adhm.201700831> (2018).
73. Zhou, Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007> (2018).
74. Liu, H. J. & Xu, P. Smart mesoporous silica nanoparticles for protein delivery. *Nanomaterials* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano9040511> (2019).
75. Liu, T. *et al.* Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* 32, (2011).
76. Tarn, D. *et al.* Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: Biofunctionality and biocompatibility. *Acc Chem Res* 46, (2013).
77. Oh, N. & Park, J. H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592> (2014).
78. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732> (2019).
79. Ozdal, M. & Gurkok, S. Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. *ADMET DMPK* 10, (2022).
80. Zhang, C. *et al.* Applications and Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanocarriers in the Field of Medicine. *Frontiers in Pharmacology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.829796> (2022).
81. Sun, R. *et al.* The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 191 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114614> (2022).
82. Ngoune, R., Peters, A., von Elverfeldt, D., Winkler, K. & Pütz, G. Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *Journal of Controlled Release* 238, (2016).
83. Castillo, R. R. *et al.* Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery: an update. *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1598375> (2019).
84. Asefa, T. & Tao, Z. Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.1021/tx300166u> (2012).

85. Watermann, A. & Brieger, J. Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery vehicles in cancer. *Nanomaterials* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano7070189> (2017).
86. Stein, A., Melde, B. J. & Schroden, R. C. Hybrid inorganic-organic mesoporous silicates-nanoscope reactors coming of age. *Advanced Materials* 12, (2000).
87. Casula, A. *et al.* A new class of silica-supported chromo-fluorogenic chemosensors for anion recognition based on a selenourea scaffold. *Chemical Communications* 53, (2017).
88. Han, Y. R. *et al.* A one-step co-condensation method for the synthesis of well-defined functionalized mesoporous SBA-15 using trimethylsilylanes as organosilane sources. *Chemical Communications* 51, (2015).
89. Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J. & Fröba, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 45 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.200503075> (2006).
90. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 99 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012> (2016).
91. Descalzo, A. B., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F., Hoffmann, K. & Rurack, K. The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 45 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.200600734> (2006).
92. Ariga, K., Ishihara, S., Labuta, J. & Hill, J. P. Supramolecular Approaches to Nanotechnology: Switching Properties and Dynamic Functions. *Curr Org Chem* 15, (2012).
93. Mohanan, S., Guan, X., Liang, M., Karakoti, A. & Vinu, A. Stimuli-Responsive Silica Silanol Conjugates: Strategic Nanoarchitectonics in Targeted Drug Delivery. *Small* (2023) doi:10.1002/sml.202301113.
94. Aznar, E. *et al.* Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules. *Chemical Reviews* vol. 116 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00456> (2016).
95. Mi, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, tumor imaging, therapy and theranostics. *Theranostics* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.7150/thno.38069> (2020).
96. Zhang, B. *et al.* Cytochrome c end-capped mesoporous silica nanoparticles as redox-responsive drug delivery vehicles for liver tumor-targeted triplex therapy in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release* 192, (2014).
97. Bernardos, A. *et al.* Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings. *Journal of Controlled Release* 131, 181–189 (2008).
98. Deng, Z. *et al.* Hollow chitosan-silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials* 32, (2011).
99. Yang, D. *et al.* Reversing Cancer Multidrug Resistance in Xenograft Models via Orchestrating Multiple Actions of Functional Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, (2016).
100. Zhang, P. *et al.* DNA-hybrid-gated multifunctional mesoporous silica nanocarriers for dual-targeted and microRNA-responsive controlled drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition* 53, (2014).

101. Pascual, L. *et al.* Oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles as DNA-responsive dye delivery systems for genomic DNA detection. *Chemical Communications* 51, (2015).
102. Ribes, À. *et al.* Selective and Sensitive Probe Based in Oligonucleotide-Capped Nanoporous Alumina for the Rapid Screening of Infection Produced by *Candida albicans*. *ACS Sens* 4, (2019).
103. Yu, E. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide)-gated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> core shell nanoparticles with expanded mesoporous structures for the temperature triggered release of lysozyme. *Colloids Surf B Biointerfaces* 135, 652–660 (2015).
104. Chen, X. *et al.* Rattle-Structured Rough Nanocapsules with in-Situ-Formed Gold Nanorod Cores for Complementary Gene/Chemo/Photothermal Therapy. *ACS Nano* 12, (2018).
105. Kim, D. H. *et al.* Temperature-sensitive magnetic drug carriers for concurrent gemcitabine chemohyperthermia. *Adv Healthc Mater* 3, (2014).
106. Lv, Y. *et al.* Ultrasound-Triggered Destruction of Folate-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticle-Loaded Microbubble for Targeted Tumor Therapy. *Adv Healthc Mater* 6, (2017).
107. Thomas, O. S. & Weber, W. Overcoming Physiological Barriers to Nanoparticle Delivery—Are We There Yet? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00415> (2019).
108. Jia, J. *et al.* Crossing biological barriers by engineered nanoparticles. *Chem Res Toxicol* 33, (2020).
109. Choudhury, H., Gorain, B. & Kesharwani, P. Physiology of the biological barriers. *Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines* Preprint at <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820466-5.00004-1> (2020).
110. Norlén, L., Lundborg, M., Wennberg, C., Narangifard, A. & Daneholt, B. The Skin's Barrier: A Cryo-EM Based Overview of its Architecture and Stepwise Formation. *Journal of Investigative Dermatology* vol. 142 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.06.037> (2022).
111. Hsia, C. C. W., Hyde, D. M. & Weibel, E. R. Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange. *Compr Physiol* 6, (2016).
112. Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Meerveld, B. G. Van & Verne, G. N. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and Motility* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x> (2012).
113. Bors, L. A. & Erdö, F. Overcoming the blood-brain barrier. Challenges and tricks for CNS drug delivery. *Scientia Pharmaceutica* vol. 87 Preprint at <https://doi.org/10.3390/scipharm87010006> (2019).
114. Baeten, K. M. & Akassoglou, K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol* 71, (2011).
115. Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94> (2016).
116. Singh, A. *et al.* Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. *Biomedical Materials (Bristol)* 17, (2022).

117. Huang, J. *et al.* Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00544-0> (2021).
118. Marsh, T., Pietras, K. & McAllister, S. S. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1832 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013> (2013).
119. Levental, K. R. *et al.* Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* 139, (2009).
120. Najafi, M., Farhood, B. & Mortezaee, K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem* 120, (2019).
121. Björnmalm, M., Thurecht, K. J., Michael, M., Scott, A. M. & Caruso, F. Bridging Bio-Nano Science and Cancer Nanomedicine. *ACS Nano* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04855> (2017).
122. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14> (2016).
123. Dawidczyk, C. M., Russell, L. M. & Searson, P. C. Nanomedicines for cancer therapy: State-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Frontiers in Chemistry* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00069> (2014).
124. Ozin, G. A., Manners, I., Fournier-Bidoz, S. & Arsenault, A. Dream nanomachines. *Advanced Materials* 17, (2005).
125. Srivastava, S. K., Clergeaud, G., Andresen, T. L. & Boisen, A. Micromotors for drug delivery in vivo: The road ahead. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 138 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.005> (2019).
126. Tezel, G. *et al.* Current status of micro/nanomotors in drug delivery. *Journal of Drug Targeting* Preprint at <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1797052> (2020).
127. Chen, S. *et al.* Active nanomotors surpass passive nanomedicines: current progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B* vol. 10 7099–7107 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d2tb00556e> (2022).
128. Gao, C. *et al.* Biomedical Micro-/Nanomotors: From Overcoming Biological Barriers to In Vivo Imaging. *Advanced Materials* vol. 33 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.202000512> (2021).
129. Happel, J. & Brenner, H. Low Reynolds number hydrodynamics. (1973) doi:10.1017/cbo9781316134030.008.
130. Spiechowicz, J., Marchenko, I. G., Hänggi, P. & Łuczka, J. Diffusion Coefficient of a Brownian Particle in Equilibrium and Nonequilibrium: Einstein Model and Beyond. *Entropy* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/e25010042> (2023).
131. Santiago, I. Nanoscale active matter matters: Challenges and opportunities for self-propelled nanomotors. *Nano Today* 19, 11–15 (2018).
132. Ricotti, L. *et al.* Biohybrid actuators for robotics: A review of devices actuated by living cells. *Science Robotics* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1126/scirobotics.aaq0495> (2017).
133. Chen, H., Zhao, Q. & Du, X. Light-powered micro/nanomotors. *Micromachines* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/mi9020041> (2018).

134. Xu, T., Gao, W., Xu, L. P., Zhang, X. & Wang, S. Fuel-Free Synthetic Micro-/Nanomachines. *Advanced Materials* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.201603250> (2017).
135. Sanchez, S., Soler, L. & Katuri, J. Chemically powered micro- and nanomotors. *Angewandte Chemie - International Edition* 54, (2015).
136. Hermanová, S. & Pumera, M. Biocatalytic Micro- and Nanomotors. *Chemistry - A European Journal* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.1002/chem.202001244> (2020).
137. Xu, T. *et al.* Reversible swarming and separation of self-propelled chemically powered nanomotors under acoustic fields. *J Am Chem Soc* 137, (2015).
138. Wang, Y., Tu, Y. & Peng, F. The energy conversion behind micro-and nanomotors. *Micromachines* vol. 12 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/mi12020222> (2021).
139. Liu, C., Huang, J., Xu, T. & Zhang, X. Powering bioanalytical applications in biomedicine with light-responsive Janus micro-/nanomotors. *Microchimica Acta* vol. 189 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05229-1> (2022).
140. Dong, R. *et al.* Visible-light-driven BiOI-based janus micromotor in pure water. *J Am Chem Soc* 139, (2017).
141. Hormigos, R. M., Sánchez, B. J. & Escarpa, A. Multi-Light-Responsive Quantum Dot Sensitized Hybrid Micromotors with Dual-Mode Propulsion. *Angewandte Chemie - International Edition* 58, (2019).
142. Liu, M. *et al.* Light-driven Au-ZnO nanorod motors for enhanced photocatalytic degradation of tetracycline. *Nanoscale* 14, 12804–12813 (2022).
143. Wang, Y. *et al.* NIR-II Light Powered Asymmetric Hydrogel Nanomotors for Enhanced Immunochemotherapy. *Angewandte Chemie - International Edition* 62, (2023).
144. Ji, X. *et al.* Multifunctional Parachute-like Nanomotors for Enhanced Skin Penetration and Synergistic Antifungal Therapy. *ACS Nano* 15, (2021).
145. Zhang, D. *et al.* A phototactic liquid micromotor. *J Mater Chem C Mater* 6, (2018).
146. Zhou, M. *et al.* Self-Propelled and Targeted Drug Delivery of Poly(aspartic acid)/Iron-Zinc Microrocket in the Stomach. *ACS Nano* 13, (2019).
147. Yang, J. *et al.* Three-Dimensional Hierarchical HRP-MIL-100(Fe)@TiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Janus Magnetic Micromotor as a Smart Active Platform for Detection and Degradation of Hydroquinone. *ACS Appl Mater Interfaces* 14, (2022).
148. Karaca, G. Y., Kaya, H. K., Kuralay, F. & Oksuz, A. U. Chitosan functionalized gold-nickel bimetallic magnetic nanomachines for motion-based deoxyribonucleic acid recognition. *Int J Biol Macromol* 193, (2021).
149. Rao, K. J. *et al.* A Force to Be Reckoned With: A Review of Synthetic Microswimmers Powered by Ultrasound. *Small* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.201403621> (2015).
150. Díez, P., Esteban-Fernández De Ávila, B., Ramírez-Herrera, D. E., Villalonga, R. & Wang, J. Biomedical nanomotors: Efficient glucose-mediated insulin release. *Nanoscale* 9, 14307–14311 (2017).
151. Singh, A. V. *et al.* Sperm cell driven microrobots-Emerging opportunities and challenges for biologically inspired robotic design. *Micromachines* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/M111040448> (2020).
152. Xie, S. *et al.* Bacteria-propelled microtubular motors for efficient penetration and targeting delivery of thrombolytic agents. *Acta Biomater* 142, (2022).

153. Fangyu, Z. *et al.* Gastrointestinal tract drug delivery using algae motors embedded in a degradable capsule. *Science Robotics* 7, (2022).
154. Shao, J. *et al.* Chemotaxis-Guided Hybrid Neutrophil Micromotors for Targeted Drug Transport. *Angewandte Chemie - International Edition* 56, (2017).
155. Aydin, O. *et al.* Neuromuscular actuation of biohybrid motile bots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, (2019).
156. Xu, H. *et al.* Sperm-Hybrid Micromotor for Targeted Drug Delivery. *ACS Nano* 12, 327–337 (2018).
157. Stanton, M. M. *et al.* Magnetotactic Bacteria Powered Biohybrids Target E. coli Biofilms. *ACS Nano* 11, 9968–9978 (2017).
158. Wu, Z. *et al.* Turning erythrocytes into functional micromotors. *ACS Nano* 8, (2014).
159. Li, T. *et al.* Engineered Platelet-Based Micro/Nanomotors for Cancer Therapy. *Small* 17, (2021).
160. Wu, Z. *et al.* RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications. *Nanoscale* 7, 13680–13686 (2015).
161. Chang, X., Feng, Y., Guo, B., Zhou, D. & Li, L. Nature-inspired micro/nanomotors. *Nanoscale* vol. 14 219–238 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d1nr07172f> (2022).
162. Gao, W. & Wang, J. Synthetic micro/nanomotors in drug delivery. *Nanoscale* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c4nr03124e> (2014).
163. Paxton, W. F. *et al.* Catalytic nanomotors: Autonomous movement of striped nanorods. *J Am Chem Soc* 126, (2004).
164. Wang, Y. *et al.* Bipolar electrochemical mechanism for the propulsion of catalytic nanomotors in hydrogen peroxide solutions. *Langmuir* 22, (2006).
165. Gibbs, J. G. & Zhao, Y. P. Autonomously motile catalytic nanomotors by bubble propulsion. *Appl Phys Lett* 94, (2009).
166. Chi, Q., Wang, Z., Tian, F., You, J. & Xu, S. A review of fast bubble-driven micromotors powered by biocompatible fuel: Low-concentration fuel, bioactive fluid and enzyme. *Micromachines* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/mi9100537> (2018).
167. Gibbs, J. G. & Zhao, Y. P. Design and characterization of rotational multicomponent catalytic nanomotors. *Small* 5, (2009).
168. Gibbs, J. & Zhao, Y. Catalytic nanomotors: Fabrication, mechanism, and applications. *Frontiers of Materials Science in China* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11706-011-0120-x> (2011).
169. Manesh, K. M. *et al.* Template-assisted fabrication of salt-independent catalytic tubular microengines. *ACS Nano* 4, (2010).
170. Wrede, P., Medina-Sánchez, M., Fomin, V. M. & Schmidt, O. G. Switching Propulsion Mechanisms of Tubular Catalytic Micromotors. *Small* 17, (2021).
171. Urso, M., Iffelsberger, C., Mayorga-Martinez, C. C. & Pumera, M. Nickel Sulfide Microrockets as Self-Propelled Energy Storage Devices to Power Electronic Circuits “On-Demand”. *Small Methods* 5, (2021).
172. Wang, W., Duan, W., Sen, A. & Mallouk, T. E. Catalytically powered dynamic assembly of rod-shaped nanomotors and passive tracer particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, (2013).

173. Tu, Y., Peng, F., White, P. B. & Wilson, D. A. Redox-Sensitive Stomatocyte Nanomotors: Destruction and Drug Release in the Presence of Glutathione. *Angewandte Chemie - International Edition* 56, (2017).
174. Ye, Y. *et al.* Fabrication of Self-Propelled Micro- and Nanomotors Based on Janus Structures. *Chemistry - A European Journal* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.1002/chem.201900840> (2019).
175. Zhong, H. *et al.* Pt/DOX Nanomotors Enhance Penetration in the Deep Tumor by Positive Chemotaxis. *ACS Appl Mater Interfaces* 14, 38172–38184 (2022).
176. Wang, Y. S. *et al.* Self-propelled micromotors based on Au-mesoporous silica nanorods. *Nanoscale* 7, (2015).
177. Yang, Y. *et al.* Manganese-Based Micro/Nanomotors: Synthesis, Motion, and Applications. *Small* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.202100927> (2021).
178. Mou, F. *et al.* ZnO-based micromotors fueled by CO<sub>2</sub>: The first example of self-reorientation-induced biomimetic chemotaxis. *Nat Sci Rev* 8, (2021).
179. Chen, C., Karshalev, E., Guan, J. & Wang, J. Magnesium-Based Micromotors: Water-Powered Propulsion, Multifunctionality, and Biomedical and Environmental Applications. *Small* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.201704252> (2018).
180. Wang, L. *et al.* Artificial nanomotors: Fabrication, locomotion characterization, motion manipulation, and biomedical applications. *Interdisciplinary Materials* 1, (2022).
181. Pera-Titus, M., Leclercq, L., Clacens, J. M., Campo, F. De & Nardello-Rataj, V. Pickering interfacial catalysis for biphasic systems: From emulsion design to green reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* 54, (2015).
182. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.7150/jca.17648> (2017).
183. Valadares, L. F. *et al.* Catalytic nanomotors: Self-propelled sphere dimers. *Small* 6, (2010).
184. Draz, M. S. *et al.* Motion-Based Immunological Detection of Zika Virus Using Pt-Nanomotors and a Cellphone. *ACS Nano* 12, (2018).
185. Zhou, C. *et al.* Autonomous Motion of Bubble-Powered Carbonaceous Nanoflask Motors. *Langmuir* 36, (2020).
186. Liu, T. *et al.* Interfacial Superassembly of Light-Responsive Mechanism-Switchable Nanomotors with Tunable Mobility and Directionality. *ACS Appl Mater Interfaces* 14, (2022).
187. Guo, J. *et al.* Self-propelled Janus nanomotor as active probe for detection of pepsinogen by lateral flow immunoassay. *Microchimica Acta* 189, (2022).
188. Hu, S. *et al.* Preparation and Properties of Janus Heparin-Loaded Ammoniated-Hollow Mesoporous Silica Nanomotors. *Journal of Physical Chemistry C* 122, (2018).
189. Ma, X. *et al.* Reversed Janus Micro/Nanomotors with Internal Chemical Engine. *ACS Nano* 10, (2016).
190. Xing, Y., Du, X., Xu, T. & Zhang, X. Janus dendritic silica/carbon@Pt nanomotors with multiengines for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, near-infrared light and lipase powered propulsion. *Soft Matter* 16, (2020).
191. Ma, X., Hahn, K. & Sanchez, S. Catalytic mesoporous janus nanomotors for active cargo delivery. *J Am Chem Soc* 137, (2015).

192. Wilson, D. A., Nolte, R. J. M. & Van Hest, J. C. M. Autonomous movement of platinum-loaded stomatocytes. *Nat Chem* 4, 268–274 (2012).
193. Xuan, M., Shao, J., Lin, X., Dai, L. & He, Q. Self-propelled janus mesoporous silica nanomotors with sub-100 nm diameters for drug encapsulation and delivery. *ChemPhysChem* 15, (2014).
194. Sattayasamitsathit, S. *et al.* Fully loaded micromotors for combinatorial delivery and autonomous release of cargoes. *Small* 10, (2014).
195. Ávila, B. E. F. De *et al.* Micromotor-enabled active drug delivery for in vivo treatment of stomach infection. *Nat Commun* 8, (2017).
196. Guix, M., Meyer, A. K., Koch, B. & Schmidt, O. G. Carbonate-based Janus micromotors moving in ultra-light acidic environment generated by HeLa cells in situ. *Sci Rep* 6, (2016).
197. Chen, C., Karshalev, E., Guan, J. & Wang, J. Magnesium-Based Micromotors: Water-Powered Propulsion, Multifunctionality, and Biomedical and Environmental Applications. *Small* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.201704252> (2018).
198. Llopis-Lorente, A. *et al.* Enzyme-powered gated mesoporous silica nanomotors for on-command intracellular payload delivery. *ACS Nano* 13, (2019).
199. Keller, S., Teora, S. P., Hu, G. X., Nijemeisland, M. & Wilson, D. A. High-Throughput Design of Biocompatible Enzyme-Based Hydrogel Microparticles with Autonomous Movement. *Angewandte Chemie - International Edition* 57, (2018).
200. Jin, H., Cui, J. & Zhan, W. Enzymatic Janus Liposome Micromotors. *Langmuir* (2023) doi:10.1021/acs.langmuir.3c00335.
201. Gao, S. *et al.* Superassembled Biocatalytic Porous Framework Micromotors with Reversible and Sensitive pH-Speed Regulation at Ultralow Physiological H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration. *Adv Funct Mater* 29, (2019).
202. Sakaue, T., Kapral, R. & Mikhailov, A. S. Nanoscale swimmers: Hydrodynamic interactions and propulsion of molecular machines. *European Physical Journal B* 75, (2010).
203. Illien, P. *et al.* Exothermicity Is Not a Necessary Condition for Enhanced Diffusion of Enzymes. *Nano Lett* 17, (2017).
204. Golestanian, R. Enhanced Diffusion of Enzymes that Catalyze Exothermic Reactions. *Phys Rev Lett* 115, (2015).
205. Riedel, C. *et al.* The heat released during catalytic turnover enhances the diffusion of an enzyme. *Nature* 517, (2015).
206. Wang, L., Hortelão, A. C., Huang, X. & Sánchez, S. Lipase-Powered Mesoporous Silica Nanomotors for Triglyceride Degradation. *Angewandte Chemie - International Edition* 58, (2019).
207. Ye, Y. *et al.* Apoptotic Tumor DNA Activated Nanomotor Chemotaxis. *Nano Lett* 21, (2021).
208. Yehl, K. *et al.* High-speed DNA-based rolling motors powered by RNase H. *Nat Nanotechnol* 11, (2016).
209. Ghosh, S. *et al.* Motility of Enzyme-Powered Vesicles. *Nano Lett* 19, (2019).
210. Wu, Z. *et al.* Carrier-Free Trehalose-Based Nanomotors Targeting Macrophages in Inflammatory Plaque for Treatment of Atherosclerosis. *ACS Nano* 16, (2022).

211. Wan, M. *et al.* Zwitterion-Based Hydrogen Sulfide Nanomotors Induce Multiple Acidosis in Tumor Cells by Destroying Tumor Metabolic Symbiosis. *Angewandte Chemie - International Edition* 60, 16139–16148 (2021).
212. Zheng, J. *et al.* Cascade Catalytically Released Nitric Oxide-Driven Nanomotor with Enhanced Penetration for Antibiofilm. *Small* 18, (2022).
213. Ma, X. & Sánchez, S. Bio-catalytic mesoporous Janus nano-motors powered by catalase enzyme. *Tetrahedron* 73, (2017).
214. Choi, H., Cho, S. H. & Hahn, S. K. Urease-Powered Polydopamine Nanomotors for Intravesical Therapy of Bladder Diseases. *ACS Nano* 14, (2020).
215. Wasserman, D. H. Four grams of glucose. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* vol. 296 Preprint at <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90563.2008> (2009).
216. Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J. & Bauerová-Hlinková, V. Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12030472> (2022).
217. Bunea, A. I., Pavel, I. A., David, S. & Gáspár, S. Sensing based on the motion of enzyme-modified nanorods. *Biosens Bioelectron* 67, (2015).
218. Ma, X. *et al.* Enzyme-Powered Hollow Mesoporous Janus Nanomotors. *Nano Lett* 15, (2015).
219. Schattling, P., Thingholm, B. & Städler, B. Enhanced Diffusion of Glucose-Fueled Janus Particles. *Chemistry of Materials* 27, (2015).
220. Abdelmohsen, L. K. E. A. *et al.* Dynamic Loading and Unloading of Proteins in Polymeric Stomatocytes: Formation of an Enzyme-Loaded Supramolecular Nanomotor. *ACS Nano* 10, (2016).
221. Schattling, P. S., Ramos-Docampo, M. A., Salgueiriño, V. & Städler, B. Double-Fueled Janus Swimmers with Magnetotactic Behavior. *ACS Nano* 11, (2017).
222. Ji, Y. *et al.* Macroscale Chemotaxis from a Swarm of Bacteria-Mimicking Nanoswimmers. *Angewandte Chemie - International Edition* 58, (2019).
223. Gao, C., Zhou, C., Lin, Z., Yang, M. & He, Q. Surface Wettability-Directed Propulsion of Glucose-Powered Nanoflask Motors. *ACS Nano* 13, (2019).
224. Shen, H. *et al.* Oriented immobilization of enzyme-DNA conjugates on magnetic Janus particles for constructing a multicompartiment multienzyme system with high activity and stability. *J Mater Chem B* 8, (2020).
225. Kutorglo, E. M. *et al.* Polypyrrole-Based Nanorobots Powered by Light and Glucose for Pollutant Degradation in Water. *ACS Appl Mater Interfaces* 13, (2021).
226. Yu, W. *et al.* Self-propelled nanomotor reconstructs tumor microenvironment through synergistic hypoxia alleviation and glycolysis inhibition for promoted anti-metastasis. *Acta Pharm Sin B* 11, 2924–2936 (2021).
227. Liu, M. *et al.* Enzyme-Based Mesoporous Nanomotors with Near-Infrared Optical Brakes. *J Am Chem Soc* 144, (2022).
228. Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P. & Rovira, C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc* 131, (2009).

229. Llopis-Lorente, A. *et al.* Stimulus-responsive nanomotors based on gated enzyme-powered Janus Au-mesoporous silica nanoparticles for enhanced cargo delivery. *Chemical Communications* 55, 13164–13167 (2019).
230. Liu, L., Mo, H., Wei, S. & Raftery, D. Quantitative analysis of urea in human urine and serum by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *Analyst* 137, (2012).
231. Li, X., Zhao, S., Zheng, N., Cheng, J. & Wang, J. Progress in bacterial urease complexes and their activation mechanisms. *Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology* vol. 35 Preprint at <https://doi.org/10.13345/j.cjb.180239> (2019).
232. Hortelao, A. C., Carrascosa, R., Murillo-Cremaes, N., Patino, T. & Sánchez, S. Targeting 3D Bladder Cancer Spheroids with Urease-Powered Nanomotors. *ACS Nano* 13, (2019).
233. Vilela, D. *et al.* Drug-Free Enzyme-Based Bactericidal Nanomotors against Pathogenic Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces* 13, (2021).
234. Hortelao, A. C. *et al.* Swarming behavior and in vivo monitoring of enzymatic nanomotors within the bladder. *Sci Robot* 6, (2021).
235. Patiño, T. *et al.* Influence of Enzyme Quantity and Distribution on the Self-Propulsion of Non-Janus Urease-Powered Micromotors. *J Am Chem Soc* 140, (2018).
236. Zhou, C. *et al.* Torque-Driven Orientation Motion of Chemotactic Colloidal Motors. *Angewandte Chemie - International Edition* 61, (2022).
237. Rajabasadi, F. *et al.* Multifunctional 4D-Printed Sperm-Hybrid Microcarriers for Assisted Reproduction. *Advanced Materials* 34, (2022).
238. Schwarz, L. *et al.* A Rotating Spiral Micromotor for Noninvasive Zygote Transfer. *Advanced Science* 7, (2020).
239. Lin, Z. *et al.* Magnetically Actuated Peanut Colloid Motors for Cell Manipulation and Patterning. *ACS Nano* 12, (2018).
240. Garcia-Gradilla, V. *et al.* Functionalized ultrasound-propelled magnetically guided nanomotors: Toward practical biomedical applications. *ACS Nano* 7, (2013).
241. Peng, X., Urso, M., Ussia, M. & Pumera, M. Shape-Controlled Self-Assembly of Light-Powered Microrobots into Ordered Microchains for Cells Transport and Water Remediation. *ACS Nano* (2021) doi:10.1021/acsnano.1c11136.
242. Wu, J. *et al.* Motion-based DNA detection using catalytic nanomotors. *Nat Commun* 1, (2010).
243. Ma, E., Wang, K. & Wang, H. An immunoassay based on nanomotor-assisted electrochemical response for the detection of immunoglobulin. *Microchimica Acta* 189, (2022).
244. Jurado-Sánchez, B., Pacheco, M., Rojo, J. & Escarpa, A. Magnetocatalytic Graphene Quantum Dots Janus Micromotors for Bacterial Endotoxin Detection. *Angewandte Chemie - International Edition* 56, (2017).
245. Liu, W. *et al.* One-by-one single-molecule counting method for digital quantification of SARS-CoV-2 RNA. *Nano Today* 47, (2022).
246. Ying, Y., Plutnar, J. & Pumera, M. Six-Degree-of-Freedom Steerable Visible-Light-Driven Microsubmarines Using Water as a Fuel: Application for Explosives Decontamination. *Small* 17, (2021).
247. Jurado-Sánchez, B. *et al.* Self-propelled activated carbon janus micromotors for efficient water purification. *Small* 11, (2015).

248. Ye, H. *et al.* Magnetically steerable iron oxides-manganese dioxide core-shell micromotors for organic and microplastic removals. *J Colloid Interface Sci* 588, (2021).
249. Jurado-Sánchez, B., Wang, J. & Escarpa, A. Ultrafast Nanocrystals Decorated Micromotors for On-Site Dynamic Chemical Processes. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, (2016).
250. Wang, M. *et al.* Nanomotor-based adsorbent for blood Lead(II) removal in vitro and in pig models. *Bioact Mater* 6, (2021).
251. Soto, F. *et al.* Rotibot: Use of Rotifers as Self-Propelling Biohybrid Microcleaners. *Adv Funct Mater* 29, (2019).
252. Tao, Y. *et al.* Nitric oxide-driven nanomotors with bowl-shaped mesoporous silica for targeted thrombolysis. *J Colloid Interface Sci* 611, (2022).
253. Xi, W. *et al.* Rolled-up magnetic microdrillers: Towards remotely controlled minimally invasive surgery. *Nanoscale* 5, (2013).
254. Srivastava, S. K., Medina-Sánchez, M., Koch, B. & Schmidt, O. G. Medibots: Dual-Action Biogenic Microdaggers for Single-Cell Surgery and Drug Release. *Advanced Materials* 28, (2016).
255. Gehr, P. *et al.* Endocytosis of environmental and engineered micro- and nanosized particles. *Compr Physiol* 1, (2011).
256. Zhang, Z. *et al.* Icebreaker-inspired Janus nanomotors to combat barriers in the delivery of chemotherapeutic agents. *Nanoscale* 13, (2021).
257. Chen, P., Xu, Z., Zhu, G., Dai, X. & Yan, L. T. Cellular Uptake of Active Particles. *Phys Rev Lett* 124, (2020).
258. Zhang, D., Liu, S., Guan, J. & Mou, F. "Motile-targeting" drug delivery platforms based on micro/nanorobots for tumor therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1002171> (2022).
259. Zha, F., Wang, T., Luo, M. & Guan, J. Tubular Micro/Nanomotors: Propulsion mechanisms, fabrication techniques and applications. *Micromachines* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/mi9020078> (2018).
260. Soto, F., Wang, J., Ahmed, R. & Demirci, U. Medical Micro/Nanorobots in Precision Medicine. *Advanced Science* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1002/advs.202002203> (2020).
261. Wu, Y., Wu, Z., Lin, X., He, Q. & Li, J. Autonomous movement of controllable assembled Janus capsule motors. *ACS Nano* 6, (2012).
262. Wu, Z. *et al.* Self-propelled polymer-based multilayer nanorockets for transportation and drug release. *Angewandte Chemie - International Edition* 52, (2013).
263. Yu, H. *et al.* Confined Catalytic Janus Swimmers in a Crowded Channel: Geometry-Driven Rectification Transients and Directional Locking. *Small* 12, (2016).
264. Zhao, T. & Li, X. On The Approach to Nanoscale Robots: Understanding the Relationship between Nanomotor's Architecture and Active Motion. *Advanced Intelligent Systems* 2200429 (2023) doi:10.1002/aisy.202200429.
265. Huang, G. & Mei, Y. Nanomembranes and corresponding three-dimensional structures: Fabrications, properties and applications. *Zhongguo Kexue Jishu Kexue/Scientia Sinica Technologica* 46, (2016).
266. Mou, F. *et al.* Single-component TiO<sub>2</sub> tubular microengines with motion controlled by light-induced bubbles. *Small* 11, (2015).

267. Xin, C. *et al.* Conical Hollow Microhelices with Superior Swimming Capabilities for Targeted Cargo Delivery. *Advanced Materials* 31, (2019).
268. Doherty, R. P. *et al.* Catalytically propelled 3D printed colloidal microswimmers. *Soft Matter* 16, (2020).
269. Li, J. & Pumera, M. 3D printing of functional microrobots. *Chemical Society Reviews* vol. 50 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0cs01062f> (2021).
270. Wen, X. *et al.* 3D-printed silica with nanoscale resolution. *Nat Mater* 20, (2021).
271. Sanders, S. N. *et al.* Triplet fusion upconversion nanocapsules for volumetric 3D printing. *Nature* 604, (2022).
272. Pickering S U. Emulsions. *J. Chem. Soc* 91, 2001 (1907).
273. Hong, L., Jiang, S. & Granick, S. Simple method to produce janus colloidal particles in large quantity. *Langmuir* 22, (2006).
274. Sun, Z. *et al.* Pickering emulsions stabilized by colloidal surfactants: Role of solid particles. *Particuology* vol. 64 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.06.004> (2022).
275. Sánchez, A., Díez, P., Martínez-Ruiz, P., Villalonga, R. & Pingarrón, J. M. Janus Au-mesoporous silica nanoparticles as electrochemical biorecognition-signaling system. *Electrochem commun* 30, (2013).
276. Casagrande, C., Fabre, P., Raphaël, E. & Veyssié, M. «Janus beads»: Realization and behaviour at water/oil interfaces. *EPL* 9, (1989).
277. de Gennes, P. -G. Soft Matter (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.199208421> (1992).
278. Su, H. *et al.* Janus particles: design, preparation, and biomedical applications. *Materials Today Bio* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100033> (2019).
279. Villalonga, R. *et al.* Enzyme-controlled sensing-actuating nanomachine based on janus au-mesoporous silica nanoparticles. *Chemistry - A European Journal* 19, (2013).
280. Purcell, E. M. Life at low Reynolds number. *Am J Phys* 45, (1977).
281. Chen, X., Zhou, C. & Wang, W. Colloidal Motors 101: A Beginner's Guide to Colloidal Motor Research. *Chemistry - An Asian Journal* vol. 14 2388–2405 Preprint at <https://doi.org/10.1002/asia.201900377> (2019).
282. Happel, J. & Brenner, H. Low Reynolds number hydrodynamics - with special applications to particulate media. (1983) doi:10.1016/0021-8502(75)90096-8.
283. Howse, J. R. *et al.* Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk. *Phys Rev Lett* 99, (2007).
284. Cerbino, R. Quantitative optical microscopy of colloids: The legacy of Jean Perrin. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.03.003> (2018).
285. Muddana, H. S., Sengupta, S., Mallouk, T. E., Sen, A. & Butler, P. J. Substrate catalysis enhances single-enzyme diffusion. *J Am Chem Soc* 132, (2010).
286. Sengupta, S. *et al.* Self-powered enzyme micropumps. *Nat Chem* 6, (2014).
287. Moo, J. G. S. & Pumera, M. Self-Propelled Micromotors Monitored by Particle-Electrode Impact Voltammetry. *ACS Sens* 1, (2016).

288. Jiang, L., Santiago, I. & Foord, J. Observation of nanoimpact events of catalase on diamond ultramicroelectrodes by direct electron transfer. *Chemical Communications* 53, (2017).
289. Lee, T. C. *et al.* Self-propelling nanomotors in the presence of strong Brownian forces. *Nano Lett* 14, (2014).
290. Wang, W. & Mallouk, T. E. A Practical Guide to Analyzing and Reporting the Movement of Nanoscale Swimmers. *ACS Nano* vol. 15 15446–15460 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c07503> (2021).
291. Dunderdale, G., Ebbens, S., Fairclough, P. & Howse, J. Importance of particle tracking and calculating the mean-squared displacement in distinguishing nanopropulsion from other processes. *Langmuir* 28, (2012).
292. Zhang, Y. & Hess, H. Chemically-powered swimming and diffusion in the microscopic world. *Nature Reviews Chemistry* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00281-6> (2021).
293. Santiago, I., Jiang, L., Foord, J. & Turberfield, A. J. Self-propulsion of catalytic nanomotors synthesised by seeded growth of asymmetric platinum-gold nanoparticles. *Chemical Communications* 54, (2018).
294. Long, N. V. *et al.* The synthesis and characterization of platinum nanoparticles: A method of controlling the size and morphology. *Nanotechnology* 21, (2010).
295. Peng, F., Tu, Y., Van Hest, J. C. M. & Wilson, D. A. Self-Guided Supramolecular Cargo-Loaded Nanomotors with Chemotactic Behavior towards Cells. *Angewandte Chemie - International Edition* 54, 11662–11665 (2015).
296. Barrett, E. P., Joyner, L. G., Halenda Vol, P. P., -RnAtn Apj, R. & Vn-Rn Atn Ac, R. A.  $Vp_2 = R2AV2-R2AT2$  ACi Generalizing equation (4) and substituting (6a) for  $Vm^*$  yields.
297. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. *Adsorption of Gases in Multimolecular Layers*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1938).
298. Fan, J. *et al.* Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles. *Biomaterials* 32, 1611–1618 (2011).
299. Long, N. V. *et al.* Synthesis and characterization of polyhedral Pt nanoparticles: Their catalytic property, surface attachment, self-aggregation and assembly. *J Colloid Interface Sci* 359, 339–350 (2011).
300. Choudhury, U., Soler, L., Gibbs, J. G., Sanchez, S. & Fischer, P. Surface roughness-induced speed increase for active Janus micromotors. *Chemical Communications* 51, 8660–8663 (2015).
301. Creighton, J. A. & Eadont, D. G. *Ultraviolet-Visible Absorption Spectra of the Colloidal Metallic Elements*. *J. CHEM. SOC. FARADAY TRANS* vol. 87 (1991).
302. Hackley, V. A. & Clogston, J. D. *Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering*. vol. 697 (Methods in Molecular Biology, 2010).
303. Díez, P. *et al.* Ultrafast Directional Janus Pt-Mesoporous Silica Nanomotors for Smart Drug Delivery. *ACS Nano* 15, 4467–4480 (2021).
304. Huang, X. *et al.* The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. in *ACS Nano* vol. 5 (2011).

305. Brown, A. L., Kai, M. P., DuRoss, A. N., Sahay, G. & Sun, C. Biodistribution and toxicity of micellar platinum nanoparticles in mice via intravenous administration. *Nanomaterials* 8, (2018).
306. Liu, X. L. *et al.* Biomimetic Liposomal Nanoplatinum for Targeted Cancer Chemophotherapy. *Advanced Science* 8, (2021).
307. Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H. & Thurnheer, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology* vol. 28 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016> (2020).
308. Sauer, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0> (2022).
309. Pozo, J. L. Del. Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036> (2018).
310. Lv, X. *et al.* Recent Nanotechnologies to Overcome the Bacterial Biofilm Matrix Barriers. *Small* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.202206220> (2023).
311. del Pozo, J. L., Rouse, M. S. & Patel, R. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review. *International Journal of Artificial Organs* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.1177/039139880803100906> (2008).
312. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd1008> (2003).
313. Smith, K. F. *et al.* Global rise in human infectious disease outbreaks. *J R Soc Interface* 11, (2014).
314. Srey, S., Jahid, I. K. & Ha, S. Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001> (2013).
315. Vishwakarma, V. Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of Basic Microbiology* vol. 60 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569> (2020).
316. Neelakantan, P. *et al.* Biofilms in Endodontics—Current status and future directions. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms18081748> (2017).
317. Yoo, Y.-J. *et al.* Endodontic biofilms: contemporary and future treatment options. *Restor Dent Endod* 44, (2019).
318. Ohl, C. D., Arora, M., Dijkink, R., Janve, V. & Lohse, D. Surface cleaning from laser-induced cavitation bubbles. *Appl Phys Lett* 89, (2006).
319. Blanken, J., Moor, R. J. G. De, Meire, M. & Verdaasdonk, R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 1: A visualization study. *Lasers Surg Med* 41, (2009).
320. Virdee, S. S. *et al.* The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. *Int Endod J* 53, (2020).
321. Roig-Soriano, X. *et al.* Nanoparticles in Endodontics Disinfection: State of the Art. *Pharmaceutics* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071519> (2022).

322. Kirkevang, L. L. What does epidemiology tell us about treatment outcomes in endodontics. *International Endodontic Journal* vol. 56 Preprint at <https://doi.org/10.1111/iej.13850> (2023).
323. Dasgupta, D., Peddi, S., Saini, D. K. & Ghosh, A. Mobile Nanobots for Prevention of Root Canal Treatment Failure. *Adv Healthc Mater* 11, (2022).
324. Maric, T., Løvind, A., Zhang, Z., Geng, J. & Boisen, A. Near-Infrared Light-Driven Mesoporous SiO<sub>2</sub>/Au Nanomotors for Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Adv Healthc Mater* (2023) doi:10.1002/adhm.202203018.
325. Ussia, M. *et al.* Light-Propelled Nanorobots for Facial Titanium Implants Biofilms Removal. *Small* 18, (2022).
326. Xie, S. *et al.* Self-Propelling Nanomotors Integrated with Biofilm Microenvironment-Activated NO Release to Accelerate Healing of Bacteria-Infected Diabetic Wounds. *Adv Healthc Mater* 11, (2022).
327. Peng, J. *et al.* Nitric oxide-propelled nanomotors for bacterial biofilm elimination and endotoxin removal to treat infected burn wounds. *J Mater Chem B* 10, (2022).
328. Villalonga, R. *et al.* Transglutaminase-catalyzed synthesis of trypsin-cyclodextrin conjugates: Kinetics and stability properties. *Biotechnol Bioeng* 81, 732–737 (2003).
329. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*.
330. Uba, G., Manogaran, M., Gunasekaran, B., Halmi, M. I. E. & Shukor, M. Y. A. Improvement of ficin-based inhibitive enzyme assay for toxic metals using response surface methodology and its application for near real-time monitoring of mercury in marine waters. *Int J Environ Res Public Health* 17, 1–15 (2020).
331. Arias-Moliz, M. T. *et al.* Doxycycline-functionalized polymeric nanoparticles inhibit *Enterococcus faecalis* biofilm formation on dentine. *Int Endod J* 54, 413–426 (2021).
332. Usta, S. N. *et al.* Effectiveness of conservative instrumentation in root canal disinfection. *Clin Oral Investig* 27, 3181–3188 (2023).
333. Morago, A. *et al.* Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin. *J Endod* 42, 1647–1650 (2016).
334. Farrugia, C., Baca, P., Camilleri, J. & Arias Moliz, M. T. Antimicrobial activity of ProRoot MTA in contact with blood. *Sci Rep* 7, (2017).
335. Gomes, B. P. F. A. *et al.* Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J* 24, 89–102 (2013).
336. Horev, B. *et al.* PH-Activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano* 9, 2390–2404 (2015).
337. Baidamshina, D. R. *et al.* Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. *Sci Rep* 7, (2017).
338. Žiemytė, M., Rodríguez-Díaz, J. C., Ventero, M. P., Mira, A. & Ferrer, M. D. Effect of Dalbavancin on Staphylococcal Biofilms When Administered Alone or in Combination With Biofilm-Detaching Compounds. *Front Microbiol* 11, (2020).
339. Cohen, W. Characterization of Ficin. *Nature* 182, 659–660 (1958).
340. Jerez, G., Kaufman, G., Prystai, M., Schenkeveld, S. & Donkor, K. K. Determination of thermodynamic pKa values of benzimidazole and benzimidazole derivatives by capillary electrophoresis. *J Sep Sci* 32, 1087–1095 (2009).

341. Yousef, F. O., Zughul, M. B. & Badwan, A. A. The modes of complexation of benzimidazole with aqueous  $\beta$ -cyclodextrin explored by phase solubility, potentiometric titration, <sup>1</sup>H-NMR and molecular modeling studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57, 519–523 (2007).
342. Monteiro, A. S. F., Macedo, L. G. S., Macedo, N. L., Feitosa, F. A. & Toyoshima, T. Biocompatibility of a chlorhexidine local delivery system in a subcutaneous mouse model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16, (2011).
343. García-Fernández, A. *et al.* Targeted Delivery of the Pan-Inflammasome Inhibitor MM01 as an Alternative Approach to Acute Lung Injury Therapy. *Adv Healthc Mater* (2023) doi:10.1002/adhm.202301577.
344. OECD/OCDE 423 OECD Guideline for Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (2001).
345. Ford, C. A., Hurford, I. M. & Cassat, J. E. Antivirulence Strategies for the Treatment of Staphylococcus aureus Infections: A Mini Review. *Frontiers in Microbiology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.632706> (2021).
346. Žiemytė, M. *et al.* Ficin-Cyclodextrin-Based Docking Nanoarchitectonics of Self-Propelled Nanomotors for Bacterial Biofilm Eradication. *Chemistry of Materials* 35, 4412–4426 (2023).
347. Simon-Soro, A. *et al.* Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. <https://journals.asm.org/journal/mbio> (2022).
348. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (2011).
349. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> (2022).
350. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España. *Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)* (2022).
351. Gaffney, D. K., Hashibe, M., Kepka, D., Maurer, K. A. & Werner, T. L. Too many women are dying from cervix cancer: Problems and solutions. *Gynecologic Oncology* vol. 151 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.10.004> (2018).
352. van der Zanden, S. Y., Qiao, X. & Neefjes, J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *FEBS Journal* vol. 288 Preprint at <https://doi.org/10.1111/febs.15583> (2021).
353. Sterner, R. C. & Sterner, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7> (2021).
354. Kumari, P., Ghosh, B. & Biswas, S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049> (2016).
355. Riley, R. S., June, C. H., Langer, R. & Mitchell, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z> (2019).
356. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release* vol. 244 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015> (2016).

357. Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, (2014).
358. Chen, S. *et al.* Dual-source powered nanomotor with integrated functions for cancer photo-theranostics. *Biomaterials* 288, (2022).
359. Yue, L., Yang, K., Li, J., Cheng, Q. & Wang, R. Self-Propelled Asymmetrical Nanomotor for Self-Reported Gas Therapy. *Small* 17, (2021).
360. Xu, L. *et al.* Boosting cisplatin chemotherapy by nanomotor-enhanced tumor penetration and DNA adducts formation. *J Nanobiotechnology* 20, (2022).
361. Chang, X. *et al.* Enhanced manipulation of tumor microenvironments by nanomotor for synergistic therapy of malignant tumor. *Biomaterials* 290, (2022).
362. Li, Q. *et al.* Nanosized Janus AuNR-Pt Motor for Enhancing NIR-II Photoacoustic Imaging of Deep Tumor and Pt<sup>2+</sup>/Ion-Based Chemotherapy. *ACS Nano* (2022) doi:10.1021/acsnano.2c00732.
363. Cao, Y. *et al.* Oral Nanomotor-Enabled Mucus Traverse and Tumor Penetration for Targeted Chemo-Sono-Immunotherapy against Colon Cancer. *Small* 18, (2022).
364. Wan, M. M. *et al.* Nitric Oxide-Driven Nanomotor for Deep Tissue Penetration and Multidrug Resistance Reversal in Cancer Therapy. *Advanced Science* 8, (2021).
365. Chen, H. *et al.* Deep Penetration of Nanolevel Drugs and Micrometer-Level T Cells Promoted by Nanomotors for Cancer Immunotherapy. *J Am Chem Soc* 143, (2021).
366. Chen, H. *et al.* A nitric-oxide driven chemotactic nanomotor for enhanced immunotherapy of glioblastoma. *Nat Commun* 14, (2023).
367. Zheng, Z. *et al.* Pressure-Gradient Counterwork of Dual-Fuel Driven Nanocarriers in Abnormal Interstitial Fluids for Enhancing Drug Delivery Efficiency. *Small* (2023) doi:10.1002/smll.202207252.
368. Gsünbaç, D. D. *et al.* High charge carrier mobility and efficient charge separation in highly soluble perylenetetracarboxyl-diimides. *Chemical Communications* 50, 4955–4958 (2014).
369. Douarre, M., Martí-Centelles, V., Rossy, C., Pianet, I. & McClenaghan, N. D. Regulation of Macrocyclic Shuttling Rates in [2]Rotaxanes by Amino-Acid Speed Bumps in Organic–Aqueous Solvent Mixtures. *European J Org Chem* 2020, 5820–5827 (2020).
370. He, F. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-101* e44 (2011).
371. Bateman, R. C. & Evans, J. A. *The Modern Student laboratory Using the Glucose Oxidase/Peroxidase System in Enzyme Kinetics*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
372. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4, 309–324 (2009).
373. Ishida, T. *et al.* Investigation of the influence of glucose concentration on cancer cells by using a microfluidic gradient generator without the induction of large shear stress. *Micromachines (Basel)* 7, (2016).
374. Lee, H. Y. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-dependent demethylation of phosphatase PP2Ac promotes glucose deprivation-induced cell death independently of inhibiting glycolysis. *Sci. Signal* vol. 11 <https://www.science.org> (2018).
375. Kim, J. W. & Dang, C. V. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Research* vol. 66 8927–8930 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1501> (2006).

376. Otto Warburg, B., Wind, F. & Negelein, N. *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY*.
377. Choi, H. & Na, K. J. Different Glucose Metabolic Features According to Cancer and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 11, (2021).
378. Dinda, S., Sarkar, S. & Das, P. K. Glucose oxidase mediated targeted cancer-starving therapy by biotinylated self-assembled vesicles. *Chemical Communications* 54, 9929–9932 (2018).
379. Lee, J., Kim, K., Kwon, I. C. & Lee, K. Y. Intracellular Glucose-Depriving Polymer Micelles for Antiglycolytic Cancer Treatment. *Advanced Materials* 35, (2023).
380. Ming, J. *et al.* Pd@Pt-GOx/HA as a Novel Enzymatic Cascade Nanoreactor for High-Efficiency Starving-Enhanced Chemodynamic Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 12, 51249–51262 (2020).
381. Wang, M. *et al.* Recent Advances in Glucose-Oxidase-Based Nanocomposites for Tumor Therapy. *Small* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1002/sml.201903895> (2019).
382. Li, Z., Li, X., Ai, S., Liu, S. & Guan, W. Glucose Metabolism Intervention-Facilitated Nanomedicine Therapy. *International Journal of Nanomedicine* vol. 17 2707–2731 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S364840> (2022).
383. Zhang, T. *et al.* Glucose oxidase and polydopamine functionalized iron oxide nanoparticles: Combination of the photothermal effect and reactive oxygen species generation for dual-modality selective cancer therapy. *J Mater Chem B* 7, 2190–2200 (2019).
384. Li, Z., Li, X., Ai, S., Liu, S. & Guan, W. Glucose Metabolism Intervention-Facilitated Nanomedicine Therapy. *International Journal of Nanomedicine* vol. 17 2707–2731 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S364840> (2022).

## AGRADECIMIENTOS

He estado posponiendo la redacción de esta parte de la tesis (puede que la más importante), pero ha llegado el momento, pues sin familia y mis compañeros este trabajo nunca podría haberse llevado a cabo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Ramón Martínez Máñez y Paula Díez. A Ramón por permitir que desarrolle esta tesis en su grupo de investigación y por su trabajo para que podamos disponer de todos los recursos. A Paula, porque ha sido la mejor directora que se podría tener y mucho más. Desde que entré al 2.6, hemos trabajado codo con codo y me has enseñado todo lo que sé. Gracias de corazón por tu inestimable ayuda durante todo este tiempo, por tener fe en que los experimentos van a salir bien y por confiar siempre en mi trabajo.

Por otro lado, quiero agradecer a todas las personas que han pasado por el grupo. Intento hacer un recopilatorio. Antiguo 2.6: Angy, Serena, Juanfran, Bea de Luis, Marcia, Guille, Andy, Eva Garrido, Giovanni, Toni Llopis y Xente. Nuevo 0.2: Sandra Pradana, Estela y Carol. CIPF: Alejandra, Araceli, Blanca, Javi M., David A., David B., Alba O., Jenny y Sandra Clara. CPI: Miguel, Yoel, Lucía y María C. Todas las chicas del equipo La Fe (Marina, Alba L., Nieves, Isa y Andrea T.). Despachos: Eva Brun, M<sup>a</sup> Carmen, Félix, Vicente, Loles, Elena A., Tania, Ana y Andrea Bernardos. Así como a todas las personas que han hecho aquí el TFG/M o que se han incorporado más recientemente. Seguro que me dejo a alguien, disculpadme. Todos vosotros habéis contribuido de un modo u otro a esta tesis, ya sea solucionando problemas cotidianos del laboratorio, resolviendo dudas científicas, pasando buenos momentos en comidas/almuerzos o pasando malos momentos post-reunión. Gracias.

Además, quiero destacar la ayuda de Javi Hicke. Aunque yo era la “veterana” de nanomotores, tú eres quien realmente me ha enseñado a trabajar en un laboratorio de química (lo poco que sé, jeje). Pese a que nos retroalimentemos negativamente en las desgracias, sin tu apoyo diario llegar a este punto hubiera sido imposible (no me arrepiento de no espantarte cuando me preguntaste). Ahora te toca a ti. No quiero que suene a tópico, pero lo vas a conseguir (aunque en este punto te parezca imposible). También me gustaría resaltar el trabajo y la buena coordinación con Elena Lucena, quien inicialmente llevó a cabo los experimentos en células y Migle, quien llevó a cabo los ensayos antimicrobianos. Finalmente, quiero agradecer a Alba su labor en esta última parte. Admiro tu forma de trabajar y eres un ejemplo para todos nosotros.

Por último, también quiero agradecer al personal de los distintos servicios (animalario, microscopía, limpieza, cafetería, gestión económica, etc.) por su imprescindible ayuda; así como a los ratones que han sido sacrificados a lo largo de esta tesis.

A los nuevos integrantes del equipo nanomotores, Juanjo, María Miralles y Víctor, espero que la labor previa (semanas enteras analizando datos del nanosight, cientos de liberaciones fallidas del sistema de comunicación y movimiento, meses esperando que los tumores de HeLa crezcan...) os inspire para que vuestros trabajos puedan avanzar y superar con creces lo realizado hasta ahora. Mucha suerte.

He dejado para el final lo más importante, mi familia.

A mis gatos Khaleesita, Landita, Elfo y Rasta.

A Xavi, por tu esfuerzo en comprenderme y acompañarme en la etapa más difícil de mi vida.

A mi hermano, eres la persona de la que más orgullosa estoy. Al transitar este camino, he aprendido que alcanzar la perfección en el trabajo es imposible y que hay otras cosas más

importantes en la vida. Espero que no te parezcas a mi demasiado y llegues a la misma conclusión mucho antes. A partir de ahora espero poder continuar sin trabajar (según tú) una temporada más.

A mis padres, por vuestro esfuerzo para proporcionarme la mejor educación, por valorar mis capacidades mucho más que yo y por respetar siempre mis decisiones. Gracias por interesaros en mi trabajo y bienestar, pero dejándome el espacio necesario. Si he llegado hasta aquí ha sido por vuestra confianza y apoyo incondicional. Seguiremos afrontando juntos todo lo que venga.

Abuela, siempre me preguntabas cuando acabaría de estudiar y volvería a la casa. Ya he acabado.

Abuelo, siempre me decías que hasta que no trabajara no sabría si lo que había estudiado me gustaba y era lo que de verdad quería hacer. **Ahora lo sé.**

