

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**INSTITUTO INTERUNIVERSITARIO DE RECONOCIMIENTO  
MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO**



**Desarrollo de nanodispositivos basados en  
nanoestrellas de oro y nanopartículas  
mesoporosas de sílice para la fotoliberación de  
fármacos empleando radiaciones del infrarrojo  
cercano con potenciales aplicaciones en la  
terapia del cáncer.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por

**Andy Hernández Montoto**

Dirigida por

**Prof. Ramón Martínez Máñez  
Prof.<sup>a</sup> María Dolores Marcos Martínez**

Valencia, Diciembre 2018





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

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

D.<sup>a</sup> María Dolores Marcos Martínez, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València

Certifican:

Que el trabajo ***“Desarrollo de nanodispositivos basados en nanoestrellas de oro y nanopartículas mesoporosas de sílice para la fotoliberación de fármacos empleando radiaciones del infrarrojo cercano con potenciales aplicaciones en la terapia del cáncer”*** presentado por Andy Hernández Montoto se ha realizado bajo nuestra dirección en el Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la *Universitat Politècnica de València*.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctor, expedimos la presente que firmamos en Valencia, a 14 de diciembre de 2018.

Prof. Ramón Martínez Máñez

Prof.<sup>a</sup> María Dolores Marcos Martínez



*A mi familia.*

*A ustedes va dedicado este gran logro de mi vida, porque son mi mayor inspiración para alcanzar las metas que me propongo.*



## *Agradecimientos*

---

### **Agradecimientos**

Quiero agradecer no solo a las personas que han estado involucradas directamente con la confección de este trabajo y con mi formación profesional, sino también a todas las personas que han compartido parte de su tiempo conmigo.

En primer lugar, agradecer al programa Erasmus Mundus (Programme European Union- Action 2- Erasmus Mundus Partnerships, GRANT AGREEMENT NUMBER - 2014 - 0870 / 001 – 001) por concederme la beca en el proyecto EuroInkaNet para realizar los estudios de doctorado en la Universitat Politècnica de Valencia. Quiero agradecer a las personas que estuvieron involucradas de una manera u otra en la confección de este trabajo. A mis directores de tesis Ramón y Loles, gracias por su acogida en el grupo de investigación del IDM y por su apoyo para realizar este trabajo. A los colegas de trabajo, que han colaborado en la obtención de los resultados de investigación que hoy presento en esta tesis: Roberto Montes, Mónica, Toni, Jose Manuel, Felix, Robertico, María, Borja, Elena, Javier, Rafael, Mar, Akbar y Lene.

A mi familia, que sin su apoyo e inspiración no hubiese alcanzado todas las metas que me he propuesto. A Fausto y Merci a los que recuerdo siempre con mucho cariño. A mi esposa Yilean, mi amante, amiga y compañera de la vida, gracias por tu amor y tu apoyo en todo momento, te adoro. A mi mamá que es mi mayor inspiración. Le agradezco por su cariño y sus enseñanzas. Todo lo que soy se lo debo a ella y por eso quiero que se sienta orgullosa y satisfecha por la buena educación que me ha dado. A Tatá que la quiero con el alma. Gracias por tus buenos y sabios consejos que me han guiado y que me guiarán en la vida. A mi papá que le quiero mucho y le agradezco por sus consejos, su cariño y su apoyo. A Pilla que con su cariño y picardía me ha enseñado a enfrentarme a los problemas que la vida depara. Gracias por tu apoyo en todos los momentos difíciles de nuestras vidas, te quiero mucho. A mi hermano Pablo, por el que siento un amor especial. Siempre puedes contar conmigo para ayudarte y apoyarte en lo que necesites. A mi prima Yanet, con la que compartí toda mi infancia y mi adolescencia. Te quiero mucho mi hermana. A la familia de Yilean que también es mi familia, en especial su madre Tania. Le

---

## *Agradecimientos*

---

agradezco a Jake que ya forma parte también de la familia, por todos los momentos que hemos compartido junto a Yanet y a su familia. Al resto de mi familia que, aunque haya compartido menos tiempo de mi vida con ellos, siempre los tengo presente y le agradezco por cada uno de esos momentos. A mis tíos, Silvio, Isa y María Amelia, a mis primos Anairis, Maykel, Tianet, Yusleidy, Angelito, Lisney, Alexander, Alexei, Yosvani, Mayelín, y Rocío. A Nadina y Nadinita que siempre estuvieron pendientes de nuestros problemas y nos dieron su apoyo. A la familia de Fausto con la que he pasado numerosos momentos de mi vida: Erick, Yaritza, Celita, Rafael, Tania, Yaima, Héctor, Hectico, Viana, Camila, Luis, Luisin, Orialy, Oriality, Manolo, Ramona, Negri y Mayito.

A mis compañeros del IDM, CPI y CIPF gracias por acogerme y compartir cada espacio y cada momento en el laboratorio y fuera del laboratorio: Toni, Tania, Roberto, Santi, Xente, Borja, Cristina, Maria, Diego, Amelia, Juanan, Andrea, Bea de Luis, Eva, Lorena, Paula Diez, Helena, Delphin, Maria Elena, Monica, Luis, Lorena, Marta, Alba, Lluís, Hazem, Ismael, Sameh, Bea Lozano, Cristina de la Torre, Adrian, Elisa, Angela, Irene, Iris, Alejandra, Sara Rojas, Gema, Araceli, Sara, Angels, Mar, Oscar, Juan Carlos, Andrea, Mari Carmen, Mutu, Yotir, Manoharan, Mirka, Arianna, Edgar, Maria, Juanfran, Luis Villaescusa, Serena, Carmen, Eva, Pablo, Kike, Arantxa, Enrique, Alberto, Estefania, Paula, Alicia. A los técnicos del servicio de microscopia electrónica de la UPV donde pasé gran parte del tiempo de investigación: Ximo, Alicia, Manolo, Jose Luis y Merche. A las profesoras Josefina y Cristina con las que compartí la colaboración docente en las prácticas de laboratorio. A los profesores que forman parte del comité de evaluadores y del tribunal, gracias de antemano por las críticas y sugerencias respecto al trabajo. A los coordinadores del programa de la beca en Manchester y en la UPV por todo su apoyo durante esta estancia. A mi amigo Robertico que sin sus ideas y su apoyo no hubiese sido posible la materialización de este trabajo. Gracias por adentrarme en este maravilloso mundo de las nanociencias. A todos mis profesores de la universidad, del bachillerato, de la enseñanza secundaria y primaria y a todos los colegas de trabajo del centro de Biomateriales, CQB, LBI, CIM que han contribuido a mi

---

## *Agradecimientos*

---

formación profesional y personal. Al profesor Reynaldo y a su familia, gracias por su ayuda y sus consejos.

A mis amistades por compartir conmigo gran parte del tiempo que no le dediqué a los estudios y por apoyarme y estar pendiente siempre de mis logros y mis problemas. A Javier, Rubén, Luisito, José Gabriel y Ernesto que hemos compartido durante casi todos los años de la vida y que continuamos compartiendo en las buenas y malas. Rubén, Javi y Luisito saben que los quiero como mis hermanos, siempre he podido contar con su compañía y con su apoyo en los momentos difíciles, gracias de corazón. A los familiares de ellos que los considero como míos: Carolina, Diana, Eva, Adriana, Yanet, Baby, July, Lina, Rubén, Lileana, Miguelin, Mariana, Guille, Patricia, Yanelys, y Yareida que siempre estará presente en mí por todos los buenos momentos que compartimos. Quiero agradecer a Martha, Angel, Maria Angeles, Yudith, Oscar y Liam por compartir con nosotros y hacernos sentir parte de la familia. Igualmente, a Sarai, Lourdes, Braison y Joel por su compañía y apoyo. A mis compañeros de estudio de la Lenin y de la facultad: Joel, Enrique, Bety. Kike muchas gracias a ti y a tus padres por toda la ayuda que me dieron. Joe, gracias a tus padres y hermana por los buenos momentos que hemos compartido juntos, siempre los recuerdo con mucha satisfacción. A Julio, Neivis, Carlos Ernesto, Giulia, Marco y Laura por todos los momentos compartidos. A mis compañeros del bachillerato Carlitos, Jorge Ernesto y Daniel, gracias por su ayuda y por los momentos que hemos compartido. A mis amigos del barrio que juntos crecimos divirtiéndonos y que después de tantos años continuamos compartiendo nuestras experiencias: Osmany, Frank José, Jesús, Alejandro y Eduardo Muro, Alejandrito, Alejandro, Josué, Camilo, Sheila, Laura y Lauren. A mis vecinos: Pupi, Alfredo, Jaime, Maribel, Anita y Eduardo Muro, Mine, Any, Mara y Frank, que siempre recordaré sus buenos y sabios consejos. A Yohan, Yusniel, Dunia, Alain, Chuco y Natanael por todos los momentos compartidos en casa de mi papá. A las amistades de Yilean con la que he compartido muy agradables momentos: Gabriela, Glenda, Yalepsi, Oscar, Daily. A Sabah, su hermana y los otros compañeros del ESPAI por todos los momentos compartidos. A Toni, sus hermanos, sus padres, Tania, su prima, Hazem, su esposa e hija y Maria Elena por cada momento que hemos vivido juntos. A Eva y Miguel

---

## *Agradecimientos*

---

por sus atenciones y preocupación. A las amistades de Yanet y Jake con la que he compartido también muy gratos momentos. A Pilar por todo su apoyo y atenciones con nosotros.

A todas estas personas les estoy profundamente agradecido por haber estado y por estar presentes en mi vida.

Muchas Gracias.

---

### **Resumen**

En este trabajo se han desarrollado cinco sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en tres tipos de nanopartículas: nanoestrellas de oro recubiertas de una capa mesoporosa de sílice (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>), nanoestrellas de oro (AuNSt) y nanopartículas Janus formadas por nanoestrellas de oro y nanopartículas mesoporosas de sílice (AuNSt-MSNP). Los sistemas sintetizados se basan en dos mecanismos de activación de la liberación, asociados con las propiedades ópticas de las nanoestrellas de oro. El primer mecanismo está relacionado con la conversión de la energía luminosa en calor, debido a la absorción de la radiación electromagnética por las partículas de oro. El calor generado durante la irradiación de las nanopartículas con un láser del infrarrojo cercano (NIR) se usa, en este caso como estímulo para activar la liberación del fármaco asociado a las nanopartículas. El otro mecanismo está relacionado con la amplificación del campo electromagnético de la radiación en la superficie de las nanopartículas. La amplificación del campo electromagnético favorece la absorción multifotónica de las radiaciones NIR en moléculas que absorben un fotón de mayor energía. Utilizando este mecanismo, se puede activar la fotoliberación del fármaco mediante el empleo de ligandos fotolábiles, que pueden enlazar directamente el fármaco a la partícula permitiendo su liberación después de la fotodescomposición. Por otra parte, la unión de otras moléculas a las nanopartículas a través de ligandos fotolábiles, también permite la activación indirecta de la liberación del fármaco, debido a un segundo proceso asociado con las moléculas enlazadas a la partícula y que se produce después de la fotodescomposición del ligando.

El primer sistema desarrollado está constituido por nanoestrellas de oro recubiertas de una capa mesoporosa de sílice funcionalizada con moléculas de parafina que actúan como puertas moleculares termosensibles. Estas moléculas de parafina en la superficie externa de los poros evitan la liberación de la doxorubicina. La irradiación del sistema produce la fusión de la parafina debido al calor generado, provocando la liberación al medio del fármaco. Las nanopartículas no muestran toxicidad hacia las células HeLa hasta que se irradian con un láser de 808 nm que

---

## *Resumen*

---

produce la generación de calor y la liberación de la doxorubicina que conllevan a la disminución de la viabilidad celular por acción conjunta de la hipertermia y la quimioterapia.

Los otros sistemas desarrollados están basados en dos profármacos de la doxorubicina que se activan al irradiarlas en presencia de las nanoestrellas de oro generando el fármaco correspondiente. La doxorubicina se modifica a través de un enlace carbamato con dos ligandos fotolábiles que poseen un espaciador 2-nitrobencílico. Uno de estos ligandos tiene un grupo disulfuro que permite unir el profármaco a la superficie de las AuNSts. La activación se produce debido a la absorción multifotónica de la radiación NIR por los profármacos que se favorece en presencia de las AuNSts, provocando la ruptura del ligando fotolábil y la generación de la doxorubicina. Los profármacos mostraron una citotoxicidad hacia las células HeLa cien veces menor que la doxorubicina. La toxicidad se incrementa cuando los profármacos se incuban con las AuNSts y se irradian con un láser de 808 nm que produce la fotodescomposición del espaciador 2-nitrobencílico y la formación de la doxorubicina.

También se obtuvo un sistema formado por nanopartículas Janus AuNSt-MSNP. El fármaco se encapsula en la nanopartícula mesoporosa de sílice que se funcionaliza con un complejo supramolecular entre el benzimidazol, unido covalentemente a la superficie externa de los poros, y la  $\beta$ -ciclodextrina. Este complejo actúa como puerta molecular sensible al pH evitando la difusión de la doxorubicina. La superficie de la nanoestrella de oro se funcionaliza con un ligando fotolábil tiolado que posee un espaciador 2-nitrobencílico y que tiene enlazado el ácido succínico. La irradiación del sistema híbrido produce la descomposición del ligando en la superficie de la AuNSt y la generación de ácido succínico que provoca la disociación del complejo supramolecular en la superficie de la MSNP, conduciendo finalmente a la liberación del fármaco encapsulado.

Por último, se obtuvo un sistema basado en nanoestrellas de oro cubiertas de una capa mesoporosa de sílice funcionalizada con moléculas de polietilenglicol a través de un ligando fotolábil que tiene un espaciador 2-nitrobencílico. El polietilenglicol

---

## *Resumen*

---

modificado con el ligando fotolábil actúa como puerta molecular fotosensible impidiendo la difusión del fármaco encapsulado. Al irradiar las partículas se produce la descomposición del ligando, la liberación del PEG y la difusión del fármaco desde el interior de los poros.

---

### **Abstract**

Herein, five doxorubicin photo-release systems based on three types of nanoparticles: gold nanostars coated with a mesoporous silica shell (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>), gold nanostars (AuNSts) and Janus gold nanostars-mesoporous silica nanoparticles (AuNSt-MSNP) have been developed. Photo-release mechanisms are directly related to optical properties of AuNSts. One of them is concerned to the light-heat energy conversion efficiency of AuNSts due to localized surface plasmon resonance associated with the strong absorption of electromagnetic radiation at near infrared wavelengths by anisotropic nanoparticles. Heat evolved during the irradiation of nanoparticles with NIR laser is used as stimulus for triggering drug delivery from the nanoparticles. Another mechanism is related to the strong electromagnetic field enhancement taking place onto nanoparticle's surface, which could favour multiphoton absorption of NIR radiations by photolabile molecules. Drug photo-release can be triggered by using photolabile linker which attaches drug to nanoparticle surface due to multiphoton molecular dissociation of linker induced by NIR irradiation. Moreover, other molecules can be linked to nanoparticles, which acts as indirect stimulus triggering drug delivery due to other processes related to released molecules after NIR irradiation.

The first developed system is formed by AuNSts coated with mesoporous silica shell capped with paraffins, which act as thermo-sensitive molecular gates. These paraffin molecules onto the external silica surface form a hydrophobic layer that blocks the pores and avoids drug release. NIR irradiation of the hybrid nanoparticles produces plasmonic heating of nanoparticle's surrounding and subsequent paraffin melting and drug delivery. Doxorubicin loaded nanoparticles show no cytotoxicity toward HeLa cells, until they are irradiated with 808 nm laser, provoking drug release and a reduction of cell viability due to the synergistic effect of hyperthermia and chemotherapy.

Other developed systems are based on two doxorubicin prodrugs, which can be activated by NIR laser irradiation in presence of AuNSts. Doxorubicin was coupled with two photolabile molecules bearing a 2-nitrobenzyl linker via carbamate linkage.

---

## *Abstract*

---

One of them has a disulphide group, allowing directly attachment of the prodrug to the nanoparticle's surface. Multiphoton absorption of NIR radiation by the doxorubicin prodrug is favoured in presence of AuNSts provoking molecular photodissociation of the 2-nitrobenzyl linker and drug release. Both prodrugs show cytotoxicity toward HeLa cells 100 times lower than that of free doxorubicin. Cell viability decreased when cells were co-incubated with prodrugs and AuNSts and were irradiated with 808 nm laser, provoking photocleavage of prodrugs and doxorubicin delivery.

A system based on Janus AuNSt-MSNP was also synthesized. Doxorubicin was loaded into MSNPs functionalized onto external surface with a supramolecular complex between benzimidazole (Bzi) and  $\beta$ -cyclodextrin (CD), which acts as pH sensitive molecular gate. AuNSts were modified with thiolated photolabile molecules bearing a 2-nitrobenzyl linker, which anchor succinic acid to nanoparticle's surface. NIR irradiation of the hybrid nanoparticles produce photocleavage of 2-nitrobenzyl linker and succinic acid release resulting in dissociation of the Bzi-CD complex and doxorubicin delivery from MSNPs.

Finally, a system based on AuNSts coated with mesoporous silica shell capped with polyethyleneglycol (PEG) molecules bearing a 2-nitrobenzyl linker, was developed. These modified PEG molecules act as photosensitive molecular gates, preventing drug release from the mesoporous silica shell. NIR irradiation of these nanoparticles produces the photodissociation of 2-nitrobenzyl linker, leading to PEG release and doxorubicin delivery from the mesoporous silica.

---

### **Resum**

En aquest treball s'han desenvolupat cinc sistemes de foto-alliberació de doxorubicina basats en tres tipus de nano-partícules: nano-estrelles d'or recobertes d'una capa mesoporosa de sílice (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>), nano-estrelles d'or (AuNSt) i nano-partícules Janus formades per nano-estrelles d'or i nano-partícules mesoporoses de sílice (AuNSt-MSNP). Els sistemes sintetitzats es basen en dos mecanismes d'activació de l'alliberament associats amb les propietats òptiques de les nano-estrelles d'or. El primer mecanisme està relacionat amb la conversió de l'energia lluminosa en calor degut a l'absorció de la radiació electromagnètica per les partícules d'or. La calor generat durant la irradiació de les nano-partícules amb un làser de l'infraroig pròxim (NIR) pot utilitzar-se com a estímul per a activar l'alliberament del fàrmac associat a les nano-partícules. L'altre mecanisme està relacionat amb l'amplificació del camp electromagnètic de la radiació en la superfície de les nano-partícules. L'amplificació del camp electromagnètic afavoreix l'absorció multifotònica de les radiacions NIR en molècules que absorbeixen un fotó de major energia. Utilitzant aquest mecanisme es pot activar la foto-alliberació del fàrmac per mitjà de l'ús de lligants foto-làbils que poden enllaçar directament el fàrmac a la partícula permetent el seu alliberament després de la foto-descomposició. D'altra banda, la unió d'altres molècules a les nano-partícules a través de lligants foto-làbils també permet l'activació indirecta de l'alliberament del fàrmac degut a un segon procés associat amb les molècules enllaçades a la partícula i que es produeix després de la foto-descomposició del lligant.

El primer sistema desenvolupat està constituït per nano-estrelles d'or recobertes d'una capa de sílice mesoporosa funcionalitzada amb molècules de parafines que actuen com a portes moleculars termosensibles. Aquestes molècules unides a la superfície externa dels porus eviten la difusió de la doxorubicina. La irradiació del sistema produeix la fusió de la parafina a causa de la calor generada, provocant l'alliberament al medi del fàrmac. Les nano-partícules no van mostrar toxicitat cap a les cèl·lules He-La fins que no es van irradiar amb un làser de 808 nm que produïx la generació de calor i l'alliberament de la doxorubicina que comporten a la

---

## *Resum*

---

disminució de la viabilitat cel·lular per acció conjunta de la hipertèrmia i la quimioteràpia.

Els altres sistemes desenvolupats estan basats en dos prodrogues de doxorubicina que s'activen a l'irradiar-les en presència de les nano-estrelles d'or generant la droga corresponent. La doxorubicina es modifica a través d'un enllaç carbamat amb dos lligants foto-làbils que posseeixen un espaiador 2-nitrobencílic. Un dels lligants té un grup disulfur que permet unir la prodroga a la superfície de les AuNSts. L'activació es produeix a causa de l'absorció multifotònica de la radiació NIR per les prodrogues que s'afavorix en presència de les AuNSts, provocant la ruptura del lligant foto-làbil i la generació de la doxorubicina. Les prodrogues van mostrar una citotoxicitat cap a les cèl·lules He-La cent vegades menor que la doxorubicina. La toxicitat s'incrementa quan les prodrogues es coven amb les AuNSts i s'irradien amb un làser de 808 nm que produeix la foto-descomposició de l'espaiador 2-nitrobencílic i la formació de la doxorubicina.

També es va obtindre un sistema format per nano-partícules Janus AuNSt-MSNP. El fàrmac s'encapsula en la nanopartícula mesoporosa de sílice que es funcionalitza amb un complex supramolecular entre el benzimidazol, unit covalentment a la superfície externa dels porus, i la  $\beta$ -ciclodextrina. Este complex actua com a porta molecular sensible al pH evitant la difusió de la doxorubicina. La superfície de la nano-estrela d'or es funcionalitza amb un lligant foto-làbil tiolat que posseeix un espaiador 2-nitrobencílic i que té enllaçat l'àcid succínic. La irradiació del sistema híbrid produeix la descomposició del lligant en la superfície de l'AuNSt i la generació d'àcid succínic que provoca la dissociació del complex supramolecular en la superfície de la MSNP conduint finalment a l'alliberament de la droga encapsulada.

Finalment, es va obtindre un sistema basat en nano-estrelles d'or cobertes d'una capa de sílice mesoporosa funcionalitzada amb molècules de polietilenglicol a través d'un lligant foto-làbil que té un espaiador 2-nitrobencílic. El polietilenglicol modificat amb el lligant fotolàbil actua com a porta molecular fotosensible impeding la difusió de la droga encapsulada. A l'irradiar les partícules es produeix la

---

## *Resum*

---

descomposició del lligant, l'alliberament del PEG i la difusió del fàrmac des de l'interior dels porus.

---

## *Abreviaturas y Acrónimos*

---

### **Abreviaturas y Acrónimos**

AcM	Anticuerpos monoclonales
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
APTES	(3-aminopropil)trietoxisilano
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNSts	Nanoestrellas de oro
BEM	Método del elemento de contorno
Bzi	Benzimidazol
CD	$\beta$ -Ciclodextrina
Cis	Cisteamina
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
DCM	Diclorometano
DEPT	Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ con sensibilidad incrementada sin distorsión por transferencia de polarización
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMF	Dimetilformamida
Dox	Doxorrubicina
EDC	N-etil, N'-dimetilaminopropilcarbodiimida
EDXS	Espectroscopía de emisión de rayos X
EELS	Espectroscopía por pérdida de energía de los electrones
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ESI-TOF MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray y detección de tiempo de vuelo
EtOH	Etanol
FDTD	Método del dominio de tiempo de diferencias finitas
FESEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

---

## *Abreviaturas y Acrónimos*

---

FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear a simple cuanto
IPTMS	(3-iodopropil)trimetoxisilano
LSPR	Resonancia plasmónica superficial localizada
MeOH	Metanol
MSNP	Nanopartículas mesoporosas de sílice
MSSh o mSiO <sub>2</sub>	Capa mesoporosa de sílice
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIR	Infrarrojo cercano
ODTMS	Octadeciltrimetoxisilano
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PEGNH <sub>2</sub>	Metoxipolietilenglicol monoaminado M <sub>w</sub> =750 g/mol
PEGSH	Metoxipolietilenglicol monotiolado M <sub>w</sub> =2000 g/mol
PVP	Polivinilpirrolidona
PXRD	Difracción de rayos X en polvo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAED	Difracción de electrones en área seleccionada
STEM	Microscopía electrónica de transmisión y barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
TLC	Cromatografía de capa fina

---

# Índice

---

	Página
Introducción.	1
1. Nanopartículas de oro.	3
1.1. Propiedades ópticas de las AuNPs.	3
1.2. Aplicaciones de las propiedades ópticas de las AuNPs en sistemas de liberación de fármacos.	14
1.3. Métodos químicos para la obtención de AuNPs.	21
2. Nanopartículas mesoporosas de sílice.	30
2.1. Métodos de síntesis.	31
2.2. Eliminación del surfactante y funcionalización superficial.	39
3. Sistemas híbridos sílice-oro.	40
4. Sistemas empleados para la fotoliberación de fármacos.	44
Objetivos.	48
Resultados y Discusión.	50
Capítulo 1.	50
1.1. Introducción.	50
1.2. Resultados y discusión.	53
1.3. Conclusiones.	75
Capítulo 2.	77
2.1. Introducción.	78
2.2. Resultados y discusión.	79
2.3. Conclusiones.	97
Capítulo 3.	98
3.1. Introducción.	99
3.2. Resultados y discusión.	100
3.3. Conclusiones.	127
Materiales y Métodos.	129
1. Reactivos y línea celular.	129
2. Técnicas de caracterización.	129

---

## *Índice*

---

3. Síntesis de materiales.	134
4. Síntesis de compuestos orgánicos.	139
5. Experimentos para determinar la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas irradiadas con el láser.	143
6. Experimentos de fotoliberación.	145
7. Experimentos con células.	146
8. Espectros FT-IR.	149
9. Espectros RMN.	154
10. Equipo láser y otras imágenes.	206
Conclusiones generales.	211
Referencias bibliográficas.	215

---

### **Introducción**

El desarrollo de dispositivos nanométricos con propiedades adecuadas para ser empleados de forma simultánea en la terapia y el diagnóstico de enfermedades como el cáncer, constituye uno de los temas de investigación que en la actualidad se llevan a cabo con mayor auge en el campo de la nanociencia, la nanotecnología y la nanomedicina.<sup>[1-4]</sup> Las nanopartículas se diseñan para detectar y tratar exclusivamente células tumorales dentro del organismo. Por lo tanto, se están realizando numerosos estudios enfocados en encontrar diferentes vías de crear sistemas complejos basados en nanopartículas que contengan 4 elementos esenciales: 1- que actúe como reservorio del fármaco, 2- que permita la acumulación selectiva de las partículas en las células diana, 3- que pueda activar el mecanismo de liberación controlada del fármaco almacenado como respuesta a estímulos internos o externos,<sup>[5]</sup> y 4- que pueda emitir ciertas señales que determinen la localización de las partículas dentro del organismo. Los sistemas de liberación de fármacos controlados remotamente por la irradiación con luz han recibido una gran atención en este campo de investigación. En este sentido, las radiaciones del infrarrojo cercano (NIR) se han utilizado en mayor extensión como estímulo externo cuando se desarrollan materiales funcionales para la terapia foto-estimulada del cáncer. Esta región del espectro electromagnético (700–1100 nm) se denomina “ventana terapéutica” de transparencia para aplicaciones biológicas debido a que las radiaciones poseen una mayor profundidad de penetración en los tejidos y producen daños mínimos sobre estos.<sup>[6]</sup>

Las nanopartículas plasmónicas de oro se han utilizado en ensayos clínicos en el tratamiento del cáncer para la liberación de fármacos, la terapia fototérmica y la imagenología celular.<sup>[7-10]</sup> Debido a su intensa resonancia plasmónica superficial cuando interactúan con radiaciones electromagnéticas adecuadas, las nanopartículas pueden absorber la radiación y transformarla en energía térmica,<sup>[11-13]</sup> lo cual permite estimular la liberación de los fármacos almacenados. Además, el efecto sinérgico de combinar los tratamientos de hipertermia y quimioterapia ha demostrado ser marcadamente más eficiente para destruir las células tumorales.<sup>[14-17]</sup> Entre todas las

nanopartículas de oro anisótropas, las nanoestrellas poseen múltiples puntas agudas que le confieren propiedades plasmónicas superiores,<sup>[1, 18-20]</sup> al tener una mayor eficiencia de la conversión de luz en calor.<sup>[21-22]</sup> Esta elevada eficiencia en la conversión energética de las nanoestrellas al interactuar con la radiación electromagnética se debe a la gran intensificación del campo electromagnético que tiene lugar en las puntas agudas, actuando como múltiples puntos calientes. Por otro lado, la intensificación del campo electromagnético cerca de la superficie de las nanopartículas de oro provoca la activación de procesos no lineales como la absorción multifotónica en moléculas que normalmente absorben un fotón de mayor energía que la de la radiación a la cual resuenan las nanopartículas de oro. Este fenómeno se ha utilizado para diseñar sistemas en los cuales se asocia el fármaco a la nanopartícula a través de un ligando fotolábil de forma que la absorción multifotónica produce la fotodescomposición del ligando y la consiguiente liberación del fármaco. Además, debido a su forma irregular las nanoestrellas exhiben una mayor internalización celular y retención intracelular<sup>[23-24]</sup> que incrementa la efectividad de la liberación de los fármacos así como también minimiza la resistencia contra el tratamiento.<sup>[25-26]</sup>

Otros materiales utilizados para la liberación controlada de fármacos están compuestos principalmente por dos subunidades: un soporte inorgánico poroso en el cual el fármaco puede almacenarse y ciertas entidades moleculares o supramoleculares, generalmente unidas a la superficie externa del soporte inorgánico, las cuales pueden controlar el transporte de masa desde los poros.<sup>[27]</sup> En muchas ocasiones para la preparación de estos sistemas se han usado materiales mesoporosos de sílice. Los soportes mesoporosos de sílice pueden obtenerse en diferentes formas y tamaños (micropartículas y nanopartículas). Están formados por poros con dimensiones determinadas y poseen volúmenes de poros y áreas superficiales elevadas.

En este trabajo se sintetizarán sistemas híbridos basados en AuNPs (en forma de estrellas) y nanopartículas mesoporosas de sílice para el desarrollo de dispositivos de fotoliberación de fármacos usando radiaciones NIR con potenciales aplicaciones

en la terapia del cáncer. Por tal razón, en este capítulo se hará una breve descripción de las propiedades ópticas, y de algunas otras relacionadas con la química de superficie de las AuNPs, así como de los métodos de síntesis de las nanoestrellas de oro. Además, se describirán los métodos de síntesis y de funcionalización superficial de los materiales mesoporosos de sílice. Por otro lado, trataremos los métodos de síntesis de nanopartículas híbridas basadas en AuNPs y MSNPs con diferentes morfologías. Finalmente, describiremos los sistemas de fotoliberación de fármacos usando radiaciones NIR, reportados en la literatura para la terapia del cáncer.

### 1. Nanopartículas de oro

El estudio y uso de las nanopartículas de metales nobles constituye uno de los principales temas de investigación que se han desarrollado en años recientes.<sup>[28]</sup> Numerosos grupos prosiguen las investigaciones para comprender como las propiedades de las nanopartículas pueden ser ajustadas para mejorar y ampliar sus aplicaciones físicas y biomédicas.<sup>[29-30]</sup>

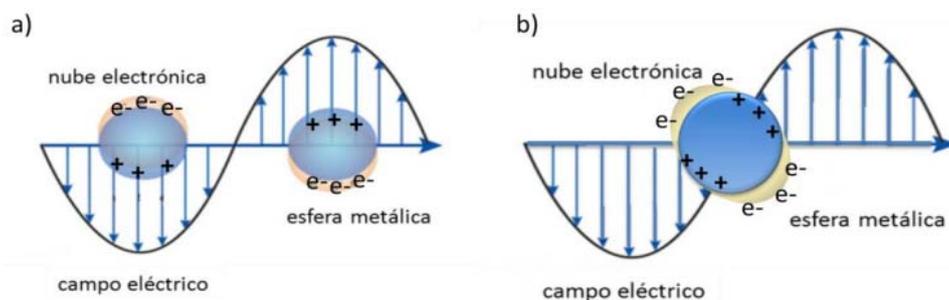
Una nanopartícula metálica está formada por un conjunto de átomos metálicos que posee dimensiones del orden de los 100 nm. Un conjunto de nanopartículas, dispersas en un medio adecuado, forman un sistema coloidal. Entre las nanopartículas metálicas más usadas y estudiadas se encuentran las de oro (AuNPs). Estas partículas presentan cuatro propiedades fundamentales; tales como: su estabilidad química, sus reacciones de superficie, y sus propiedades ópticas y electrónicas, que las convierten en excelentes materiales para aplicaciones biomédicas.

#### 1.1. Propiedades ópticas de las AuNPs

##### *Resonancia Plasmónica Superficial Localizada*

Cuando una nanopartícula metálica esférica interactúa con una radiación electromagnética, el campo eléctrico oscilante puede provocar que los electrones de conducción se desplacen con respecto a los núcleos. A este desplazamiento de carga se le opone la atracción electrostática, entre los electrones y los núcleos, que actúa

como una fuerza restauradora generando así oscilaciones de la nube electrónica alrededor de los núcleos como se muestra en la **Figura 1**. La frecuencia de la oscilación depende de 5 factores: la densidad electrónica, la masa efectiva del electrón, y el tamaño, la forma y la polarizabilidad de la partícula. Cuando la frecuencia de la oscilación de la nube de electrones coincide con la frecuencia de la radiación electromagnética se produce el fenómeno de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR por sus siglas en inglés). En estas condiciones la nube electrónica de la partícula realiza los mayores desplazamientos respecto a los núcleos (oscilaciones de máxima amplitud) o, lo que es lo mismo, la partícula sufre la máxima polarización de su nube electrónica. Como resultado del fenómeno de resonancia plasmónica superficial localizada, las partículas muestran una banda característica en el espectro Vis-NIR con coeficientes de extinción (absorción + dispersión de luz) entre los  $10^8$ - $10^{12}$   $M^{-1} cm^{-1}$  que evidencia la fuerte interacción con la radiación incidente.<sup>[31]</sup>



**Figura 1.** Interacción del campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética con la nube electrónica de la nanopartícula metálica.

Típicamente para AuNPs esféricas entre 3-100 nm (menores de 2 nm no poseen LSPR) se produce la LSPR cuando son irradiadas con radiaciones de longitud de onda ( $\lambda$ ) entre 510-600 nm. Para el caso de partículas más grandes o con geometrías diferentes a la esférica, la frecuencia de resonancia plasmónica puede incluso llegar a la zona del infrarrojo cercano (700-1100 nm). En el caso en que las nanopartículas sean mucho menores que las longitudes de onda a las que se produce la resonancia

plasmónica, típicamente para partículas de diámetro  $d_{\text{AuNP}} < 40$  nm, se puede decir que la partícula entera está inmersa en una sola de las crestas ( $\lambda/2$ ) del campo eléctrico oscilante de la radiación incidente. En este caso, puede decirse que la partícula interactúa con un campo eléctrico continuo formando un dipolo oscilante (resonancia plasmónica dipolar) (**Figura 1a**). Para el caso de nanopartículas mayores, pueden producirse modos superiores de excitación plasmónica, como es el caso del modo cuadrupolar: al interactuar una AuNP con diámetro  $d_{\text{AuNP}} > 40$  nm, más cercanos al valor de la “ $\lambda$ ” de la radiación incidente, es más probable encontrar una situación en la que una parte del volumen de la partícula esté interactuando con una parte del campo eléctrico incidente orientado en un sentido mientras que la otra porción de la AuNP esté interactuando con el campo eléctrico orientado en sentido contrario (**Figura 1b**).<sup>[32]</sup>

Producto de la oscilación electrónica de la partícula durante su interacción con la radiación incidente, en su superficie se genera un campo eléctrico oscilante muy intenso. La energía de los electrones oscilantes puede a su vez ser transformada en energía luminosa emitida (producto de procesos de dispersión) o puede ser transformada en calor (proceso de absorción). Por tal razón, al coeficiente de extinción de la banda LSPR pueden contribuir un coeficiente de absorción ( $C_{\text{abs}}$ ) y uno de dispersión ( $C_{\text{scat}}$ , de scattering en inglés).<sup>[31-33]</sup>

Gustav Mie<sup>[34]</sup> fue el primero en describir cuantitativamente la resonancia plasmónica mediante la resolución de las ecuaciones de Maxwell, empleando condiciones de contorno apropiadas para partículas esféricas. El coeficiente de extinción total que involucra la absorción y la dispersión está dado por la suma de todas las oscilaciones de multipolos eléctricos y magnéticos. La teoría de Mie tiene la ventaja de ser conceptualmente simple y ha encontrado una amplia aplicación en la explicación de los resultados experimentales.<sup>[35]</sup>

Para nanopartículas pequeñas comparadas con la longitud de onda de la luz excitante, sólo la absorción dipolar de la ecuación de Mie contribuye al coeficiente de extinción ( $C_{\text{ext}}$ ) de las nanopartículas. La teoría de Mie se reduce entonces a la

siguiente relación para el coeficiente de extinción por partícula (aproximación dipolar o cuasi-estática):

$$C_{ext} = \frac{24 \cdot \pi^2 \cdot R^2 \cdot \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \cdot \frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + 2 \cdot \epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2} \quad (1)$$

Donde  $R$  es el radio de la partícula esférica,  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz incidente,  $\epsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio que está relacionada con el índice de refracción según  $\epsilon_m = \eta_m^2$ . Los términos  $\epsilon_r(\omega)$  y  $\epsilon_i(\omega)$  denotan la parte real e imaginaria de la función dieléctrica del material de la partícula ( $\epsilon(\omega) = \epsilon_r(\omega) + i\epsilon_i(\omega)$ ), que a su vez son funciones dependientes de la frecuencia angular de la oscilación “ $\omega$ ” (aunque estos términos también pueden ser expresados en función de “ $\lambda$ ” o “ $\nu$ ”). Estos términos  $\epsilon_r(\omega)$  y  $\epsilon_i(\omega)$  determinan la posición y el ancho de la banda LSPR, respectivamente. El fenómeno de resonancia ocurre cuando se cumple la condición:

$$\epsilon_r(\omega) = -2 \cdot \epsilon_m \quad (2)$$

y cuando además, “ $\epsilon_i$ ” sea pequeño o dependa débilmente de  $\omega$ .<sup>[33]</sup>

El coeficiente de extinción por partícula se relaciona con el coeficiente de extinción molar según la ecuación:

$$\epsilon \text{ (} M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{)} = \frac{10^{-3} \cdot N_A \cdot C_{ext} \text{ (cm}^2 \text{)}}{2.303} \quad (3)$$

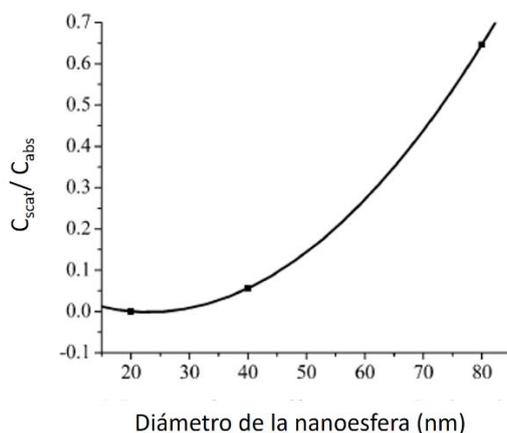
donde  $N_A$  representa el número de Avogadro.

Del análisis de las ecuaciones 1 y 2 puede deducirse que la posición de la banda LSPR sólo depende de la función dieléctrica del metal y de la constante dieléctrica del medio y, contrariamente a lo reportado, no depende del radio de la partícula. En esta ecuación, el radio de la partícula solo afecta al coeficiente de extinción de la banda. Este comportamiento se corresponde con los datos experimentales para partículas de  $d < 10$  nm. No obstante, para partículas de dimensiones de 10-25 nm se ha observado que la posición de la banda se desplaza ligeramente al rojo a medida que la partícula crece. Para este intervalo de dimensiones, las propiedades ópticas de las partículas se pueden describir usando una corrección a la teoría de Mie que incluya la dependencia de la función dieléctrica del metal con el diámetro de la partícula. En nanopartículas mayores ( $d > 25$  nm), la dependencia de la posición de la

---

banda LSPR con el tamaño se describe usando la ecuación de Mie completa. En esta ecuación, al coeficiente de extinción contribuyen además de  $\epsilon$  y  $\epsilon_m$ , los modos de oscilación multipolares y estos dependen explícitamente del tamaño de las partículas.<sup>[35]</sup> De forma cualitativa, la dependencia de la posición de la banda LSPR con el tamaño se puede analizar como que, al aumentar el tamaño de las nanopartículas la frecuencia de LSPR es menor debido a que, en estas condiciones, la nube electrónica debe realizar un mayor desplazamiento con respecto a los núcleos y, con ello, se producen menos oscilaciones en el mismo tiempo o lo que es lo mismo la resonancia ocurre a menores frecuencias (mayores  $\lambda$ ).

Como se dijo anteriormente, al término  $C_{\text{ext}}$ , contribuyen los coeficientes  $C_{\text{abs}}$  y  $C_{\text{scat}}$  según la expresión:  $C_{\text{ext}} = C_{\text{abs}} + C_{\text{scat}}$ . Para nanopartículas mayores, se considera la contribución de la dispersión al coeficiente de extinción empleando la teoría de Mie completa producto de las oscilaciones electrónicas de orden superior (**Figura 2**).

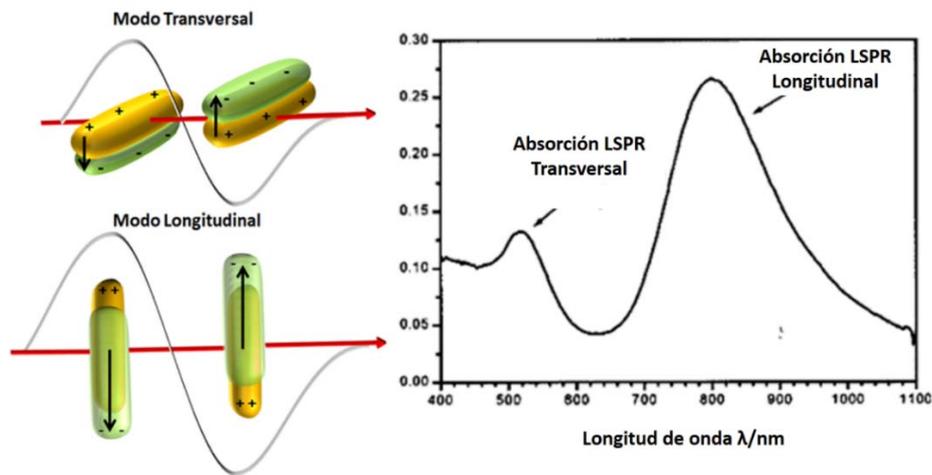


**Figura 2.** Dependencia de la relación entre el coeficiente de dispersión y absorción con el tamaño de la nanopartícula. Adaptado con permiso de *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238-7248. Copyright 2006 American Chemical Society.

Para el caso de nanopartículas con geometrías diferentes a la esférica, es posible que posean varias bandas LSPR. La posición de dichas bandas depende de los

---

distintos modos de oscilación electrónica. Así, por ejemplo, una partícula con forma de varilla cilíndrica (o semejante) mostrará dos modos fundamentales de oscilación electrónica: uno transversal y otro longitudinal (**Figura 3**). La posición de ambas bandas dependerá de cuán gruesa y larga sea la nanovarilla. En ocasiones las varillas llegan a ser lo suficientemente largas para que la banda de resonancia plasmónica correspondiente al modo longitudinal esté en la zona del NIR (**Figura 3**). Este tipo de comportamiento, sucede también para otros tipos de partículas como los nanoplatos triangulares,<sup>[36]</sup> nanoesferas huecas, nanojaulas<sup>[37]</sup> y partículas ramificadas,<sup>[38]</sup> por solo mencionar unas pocas de las complejas formas que actualmente se pueden obtener. La interacción de estas partículas con radiaciones NIR resulta importante en aplicaciones biomédicas puesto que producto de la LSPR las AuNPs pueden generar calor y, con ello, realizar terapias localizadas en tumores internos (ver más abajo).<sup>[39-40]</sup>



**Figura 3.** Propiedades ópticas de partículas anisotrópicas en forma de varillas. Izquierda: modos de oscilación electrónica de una nanopartícula con forma de varilla cilíndrica: transversal y longitudinal. Derecha: bandas LSPR en el espectro Vis-NIR producto de los distintos modos de oscilación de la nube electrónica. En el modo transversal el desplazamiento de la nube electrónica es pequeño y por ello genera una banda LSPR que está en el intervalo 530-540 nm. El modo de oscilación longitudinal requiere un gran desplazamiento de la nube electrónica y, con ello, la LSPR se alcanza con radiaciones NIR.

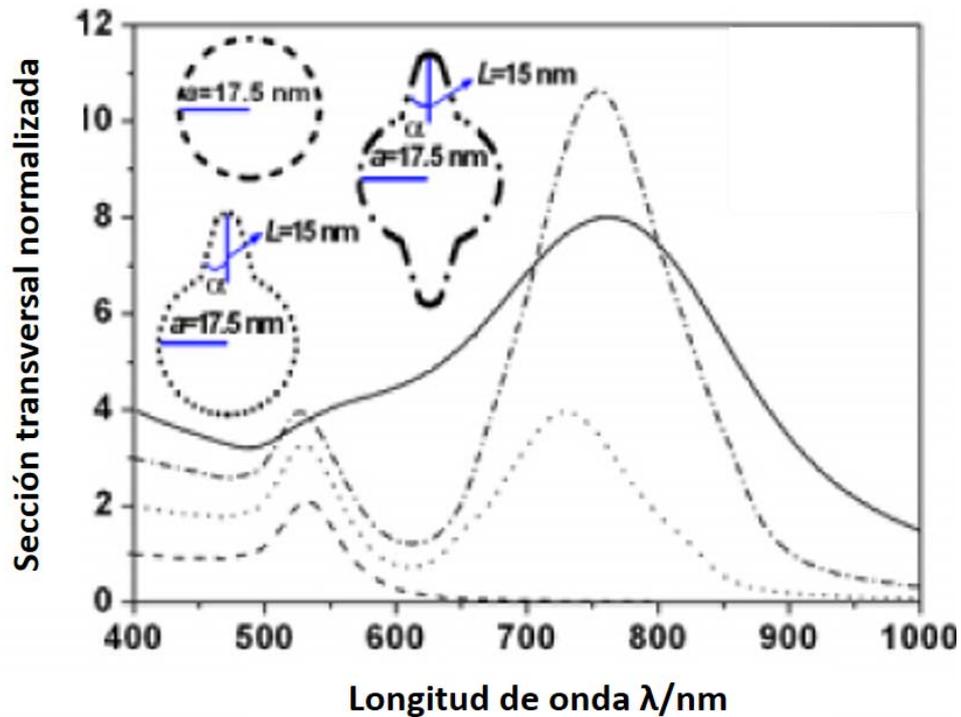
Otra propiedad interesante de la LSPR de las AuNPs (y de cualquier otra nanopartícula metálica) es que, si se produce un acercamiento notable entre estas, por ejemplo, durante un proceso de agregación, la posición de la banda se desplaza hacia valores mayores de longitud de onda. Producto de las interacciones electrostáticas de campo cercano, el movimiento oscilatorio de la nube electrónica de una nanopartícula tiende a polarizar la nube electrónica de la partícula vecina. Como resultado, el movimiento oscilatorio de los electrones de una partícula en un agregado es frenado y acoplado a los dipolos oscilantes de las partículas vecinas (acoplamiento plasmónico).<sup>[41-42]</sup> Dependiendo de la configuración y tamaño de los agregados estas interacciones pueden conducir a bandas LSPR bien definidas e intensas pero, si los agregados no son homogéneos, formarán bandas muy anchas y poco intensas. En el interior de estos agregados, producto de las oscilaciones electrónicas acopladas entre las partículas del agregado, podrán encontrarse campos eléctricos significativamente intensos o sitios calientes.<sup>[43]</sup>

### *Propiedades ópticas de las nanoestrellas de oro (AuNSts)*

Entre las partículas anisotrópicas con propiedades ópticas más interesantes que pueden ser empleadas en aplicaciones biomédicas, se encuentran las AuNSts. Para estas partículas se ha descrito que la localización y la intensidad de los campos electromagnéticos generados durante la LSPR pueden ser convenientemente moduladas controlando la morfología de las nanopartículas. De forma general, se ha predicho y comprobado que aquellas AuNPs cuyas formas contienen puntas agudas, como las AuNSts, y/o bordes, generan campos eléctricos más fuertes que aquellas con estructura esferoide.

Las AuNSts poseen modos LSPR que están desplazados hacia el rojo con respecto a aquellos de partículas esféricas de tamaños similares. Sin embargo, experimentalmente, debido a la inevitable polidispersión de formas, se obtiene un promedio de modos de oscilación y, con ello, la formación de dos bandas de extinción bastante anchas<sup>[44]</sup> que incluyen, una banda intensa centrada alrededor de

650-900 nm y una banda débil/hombro localizada alrededor de 500-600 nm (Figura 4).<sup>[19]</sup>

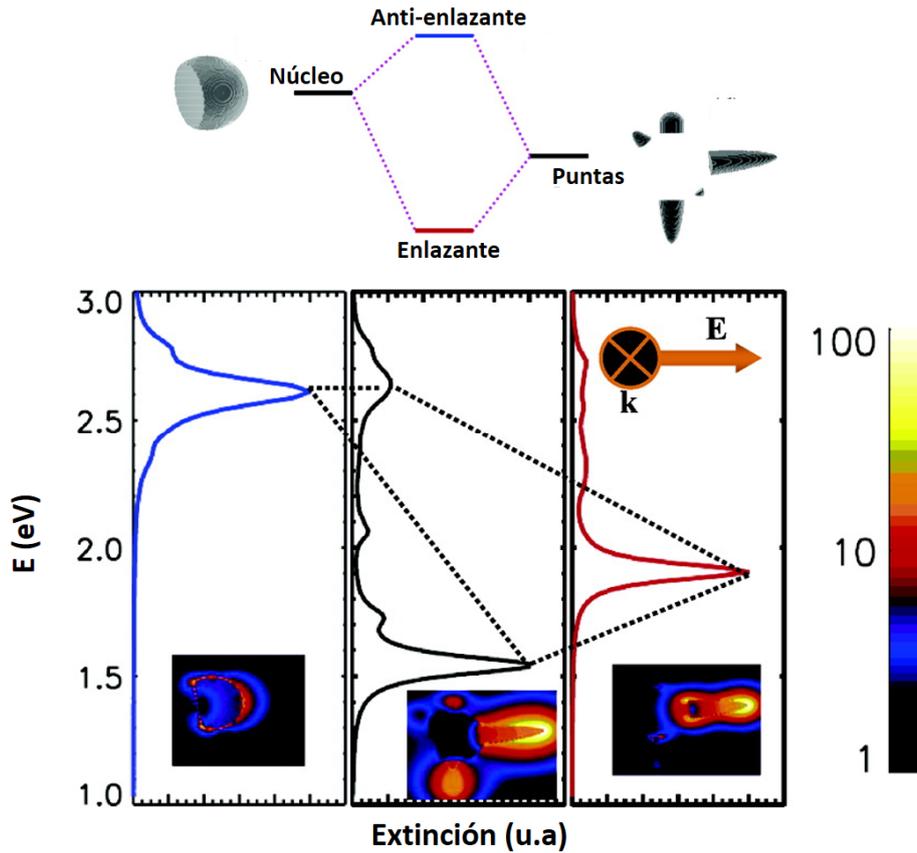


**Figura 4.** Espectros de extinción experimental (línea continua) y calculados por el método del elemento de contorno (BEM) (líneas discontinuas) de las AuNSTs. Adaptado con permiso de *Nanotechnology* **2008**, *19*, 015606-015612. Copyright 2008 IOP Publishing Ltd.

La asignación actual de las LSPRs en las nanoestrellas ha sido teóricamente elucidada mediante la resolución de las ecuaciones de Maxwell usando métodos numéricos, tales como: el método del elemento de contorno (BEM),<sup>[44]</sup> del dominio de tiempo de diferencias finitas (FDTD)<sup>[45-46]</sup> o usando la aproximación del dipolo discreto (plasmón).<sup>[47]</sup> Todos estos esfuerzos computacionales concuerdan en asignar la banda de menor energía observada experimentalmente, a resonancias dipolares localizadas en las puntas individuales, mientras, la banda débil/hombro a mayor energía ha sido asignada para modos de oscilación en el núcleo central de la

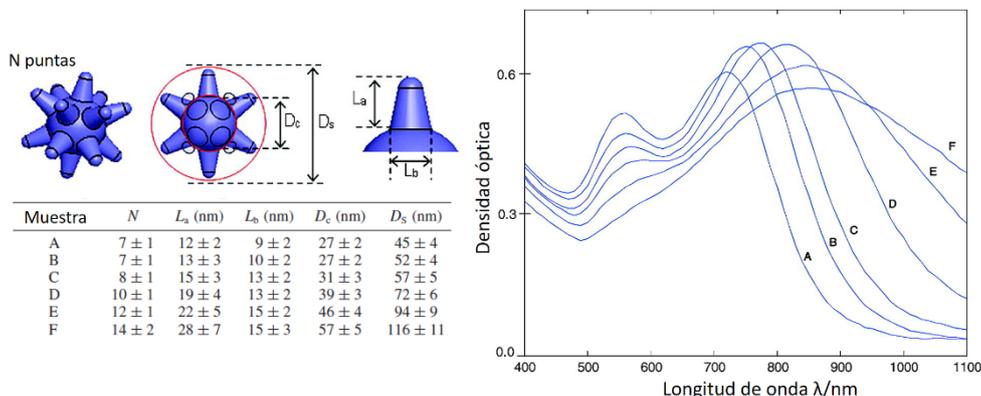
partícula. Interesantemente, empleando técnicas experimentales como la espectroscopía de dispersión para una sola partícula<sup>[48]</sup> se obtienen, para diferentes ángulos de polarización de la luz incidente, diferentes espectros<sup>[49]</sup> que muestran múltiples picos agudos, cada uno correspondiente a un modo de oscilación específico.<sup>[50]</sup> Usando técnicas avanzadas de microscopía electrónica, como la espectroscopía por pérdida de energía de los electrones (EELS), se realizó un mapeo del modo de oscilación de baja energía para las AuNSts que evidenció una alta localización del mismo en las puntas.<sup>[51]</sup>

Sin embargo, aunque la observación general de que la respuesta óptica de las AuNSts está dominada por los modos de oscilación de las puntas, y por tanto, de la forma y cantidad de estas,<sup>[52]</sup> ha sido propuesto una contribución finita del modo de oscilación del núcleo al modo de oscilación de las puntas.<sup>[53]</sup> Debido a que los modos de oscilación del núcleo poseen mayores frecuencias que los modos de oscilación de las puntas, los electrones de conducción del núcleo pueden seguir adiabáticamente las oscilaciones plasmónicas de las puntas. Esta contribución del núcleo ha sido descrita en términos de la hibridación entre los modos de oscilación de los electrones del núcleo y las puntas usando combinaciones constructivas y destructivas, donde la combinación constructiva (o enlazante) incrementa el momento dipolar efectivo de los modos de oscilación de las puntas (**Figura 5** panel superior). En la simulación representada en la **Figura 5** (panel inferior) puede verse como el núcleo sirve de antena, incrementando el coeficiente de extinción y el campo eléctrico de los modos de oscilación de las puntas de la nanoestrella.<sup>[47, 54-55]</sup>



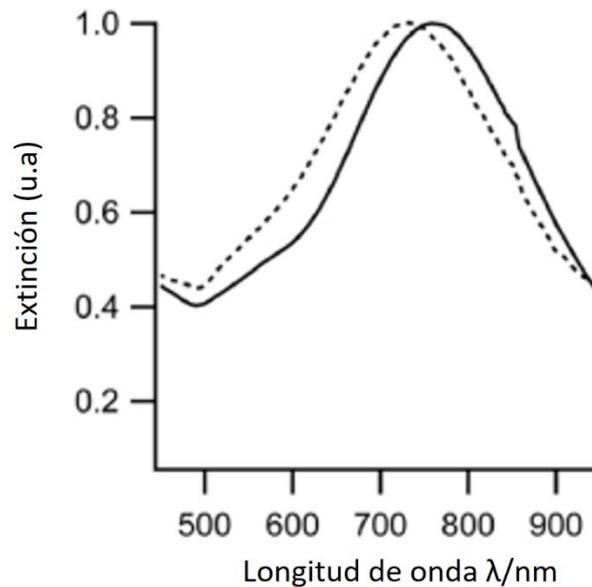
**Figura 5.** Contribución de los modos de oscilación del núcleo de una AuNSs a los modos de oscilación de las puntas. Panel superior: Esquema que ilustra el concepto de la hibridación de los modos de oscilación de la nube electrónica del núcleo y de las puntas de las AuNSs formando combinaciones constructivas (enlazantes) y destructivas (antienlazantes). Panel inferior: El panel izquierdo y derecho muestran los espectros de extinción del núcleo y las puntas, respectivamente (fueron multiplicados por un factor de 2 y 4, respectivamente). El panel central muestra el espectro de extinción de la AuNSs. Los gráficos de contorno muestran el incremento del campo eléctrico para los diferentes modos plasmónicos para el ángulo de polarización de la radiación indicado. Adaptado con permiso de *Nano Lett.* **2007**, 7, 729-732. Copyright 2007 American Chemical Society.

Con respecto a la influencia de las características morfológicas específicas de las AuNSts sobre sus propiedades ópticas, se ha encontrado que: 1) al aumentar la relación de la longitud de la punta respecto a la longitud de su base, la posición de la banda LSPR de menor energía se desplaza a mayores longitudes de onda, 2) el tamaño del núcleo tiene una menor influencia sobre la posición de la mencionada banda y 3) un aumento del número de puntas ensancha la banda de menor energía (**Figura 6**).<sup>[44, 56-58]</sup>



**Figura 6.** Variación de las propiedades ópticas de las AuNSts con la morfología. Adaptado con permiso de *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18849–18859. Copyright 2008 American Chemical Society.

Es importante destacar que, la constante dieléctrica del medio que rodea a las AuNSts, fundamentalmente a las puntas, puede cambiar drásticamente la posición de la banda LSPR de menor energía (**Figura 7**).<sup>[49]</sup> Este hecho permite monitorizar los procesos de modificación química superficial de las AuNSts. En este sentido, se ha utilizado esta propiedad para el desarrollo de sistemas muy sensibles de detección de biomoléculas.<sup>[59-60]</sup>



**Figura 7.** Espectros de las AuNSts antes (línea continua) y después (línea discontinua) de la modificación superficial con PEGSH en agua. Adaptado con permiso de *Nanotechnology* **2012**, 23, 1-7. Copyright 2012 IOP Publishing Ltd.

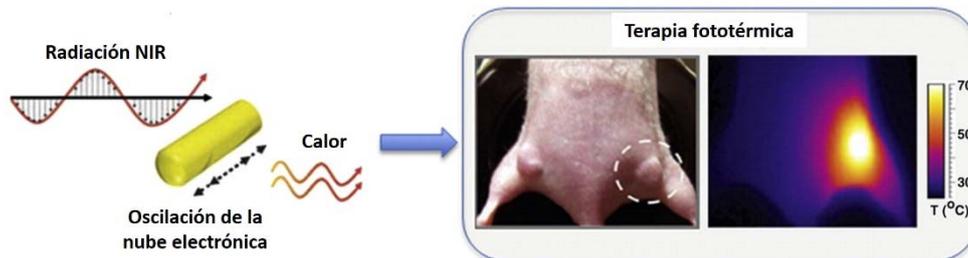
Por su parte, al igual que las AuNPs esféricas, las AuNSts que sufren procesos de agregación, cambian la forma de sus espectros Vis-NIR producto de la aparición de nuevos modos plasmónicos debido al acoplamiento de las oscilaciones electrónicas entre partículas cercanas.<sup>[26]</sup>

## 1.2. Aplicaciones de las propiedades ópticas de las AuNPs en sistemas de liberación de fármacos

Entre todas las propiedades de las AuNPs las que han encontrado mayor aplicabilidad en el campo de la biomedicina, específicamente en el diagnóstico y la terapia del cáncer, son sus propiedades ópticas. Producto de la LSPR las AuNPs pueden transformar la energía de la radiación electromagnética incidente en luz emitida (procesos de dispersión) o en calor. Esta última propiedad ha permitido su empleo como fotosensibilizadores en el tratamiento localizado de tumores.<sup>[13]</sup>

El proceso de transformación energética de luz en calor, en una AuNP durante la LSPR, comienza con la rápida pérdida de fase de los electrones excitados coherentemente mediante colisiones electrón-electrón (ocurre en femtosegundos). Estas colisiones producen electrones calientes con temperaturas tan altas como los 1000 K. Luego, los electrones calientes ceden la energía a los fonones (o lo que es lo mismo, hacen vibrar el retículo) mediante interacciones fonón-electrón, proceso que ocurre en el orden de 0.5-1 ps, resultando en un retículo caliente con temperaturas que pueden llegar a los cientos de grados. Los procesos de relajación electrón-fonón son independientes del tamaño y la forma de las nanopartículas. Por último, el retículo se enfría transfiriendo el calor a los alrededores mediante la relajación fonón-fonón, proceso que conduce al calentamiento del medio y que ocurre en el orden de los 100 ps.

Específicamente, la conversión y disipación de energía en forma de calor puede ser empleada para inducir el daño celular, provocando efectos tales como: la hipertermia, la coagulación y la evaporación (**Figura 8**).<sup>[32-33]</sup> Más recientemente se ha empleado esta propiedad para el desarrollo de sistemas que liberen agentes citotóxicos, unidos a la superficie de las nanopartículas, en tejidos tumorales y que se activen bajo estímulos externos. De esta forma se puede lograr incrementar las especificidades con las cuales los agentes biomédicos son liberados, potenciando su eficacia o disminuyendo sus efectos colaterales.<sup>[61-62]</sup>



**Figura 8.** Aplicación de las propiedades ópticas de las AuNPs en la terapia fototérmica del cáncer. Adaptado con permiso de *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62 1094–1124. Copyright 2010 Elsevier B.V.

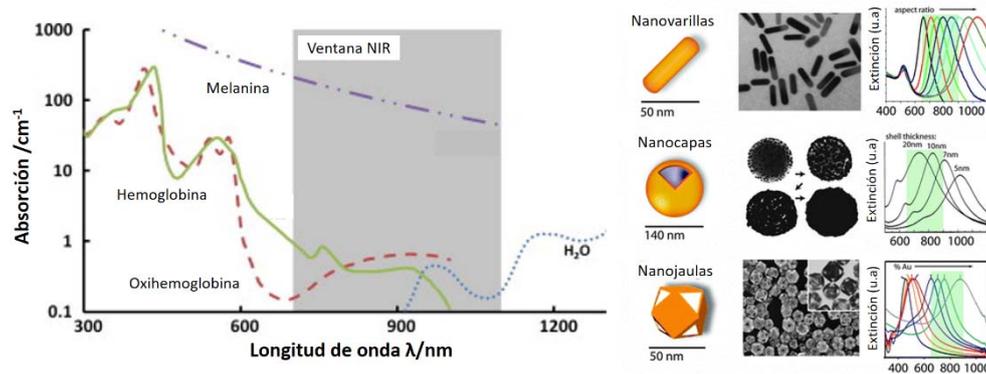
Las AuNPs exhiben otro conjunto de propiedades que las hacen particularmente adecuadas para aplicaciones de liberación localizada de fármacos.<sup>[10, 63]</sup> Debido a su tamaño comparable a las proteínas, estos materiales pueden acumularse preferencialmente en sitios tumorales debido al efecto de permeabilidad y retención incrementadas (EPR).<sup>[64-65]</sup> Otra propiedad importante es que debido a que los nanoconjugados basados en AuNPs son lo suficientemente grandes, pueden interactuar con varios sitios de unión celular que se encuentren adyacentes<sup>[66]</sup> y, de esta forma aumentar la afinidad y selectividad de su unión a un blanco.<sup>[67]</sup> Se ha planteado que la combinación de estas propiedades tiene ventajas tales como: proteger y facilitar la liberación localizada de agentes terapéuticos y de diagnóstico fisiológicamente inestables, de aquellos que exhiben una penetración intracelular pobre (agentes quimioterapéuticos hidrofóbicos)<sup>[68]</sup> y/o de aquellos que pueden resultar degradables enzimáticamente (ARNs).<sup>[69]</sup>

En este sentido, es necesario tener en cuenta varios aspectos para diseñar un sistema de fotoliberación de fármacos citotóxicos basados en AuNPs que permita una terapia efectiva con una dosis mínima de radiación láser:

1. Empleo de nanopartículas cuya banda LSPR se encuentre en la zona del espectro conocida como ventana de transparencia del tejido (700-1100 nm).
2. Empleo de nanopartículas con una elevada eficiencia fototérmica, es decir, aquella con un elevado coeficiente de absorción con pérdidas mínimas de energía por dispersión.
3. Empleo de nanopartículas capaces de asociar la mayor cantidad de fármaco posible y que posean un perfil de liberación controlada durante la irradiación del sistema.
4. Empleo de algún componente que le confiera estabilidad coloidal a las nanopartículas en el medio fisiológico.
5. Empleo de un componente vectorizante que permita dirigir, de forma específica, las nanopartículas al sitio a tratar.

## Tipos de radiaciones y AuNPs a emplear

Las radiaciones más penetrantes en el organismo son aquellas del infrarrojo cercano (NIR) entre 700 y 1100 nm, donde la absorción por parte de los componentes químicos mayoritarios de los tejidos es mínima, por lo que son las más adecuadas para aplicaciones biomédicas (**Figura 9**).<sup>[13, 70]</sup> Por esta razón, es necesario el empleo de AuNPs que absorban fuertemente estas radiaciones, es decir aquellas cuya banda de resonancia plasmónica este en la mencionada región del espectro (**Figura 9**).



**Figura 9.** Izquierda: Espectros de absorción de los principales componentes químicos de los tejidos. Derecha: AuNPs con diferentes morfologías cuyas bandas de resonancia plasmónica superficial están en el NIR. Adaptado con permiso de *International Journal of Heat and Mass Transfer* **2013**, *67*, 469–486. Copyright 2013 Elsevier Ltd. Adaptado con permiso de *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3391–3404. Copyright 2011 The Royal Society of Chemistry.

Además, se necesitan emplear nanopartículas con una elevada eficiencia fototérmica, que no es más que la eficiencia en la transformación de luz en calor y que puede determinarse mediante la relación entre el coeficiente de absorción y el coeficiente de extinción. Recientemente se ha determinado la eficiencia fototérmica de nanopartículas de oro con diferentes morfologías, tales como nanovarillas, nanojaulas, nanoesferas huecas y nanoestrellas, que poseen una intensa banda LSPR alrededor de los 800 nm. Para ello se empleó una técnica termométrica basada en la

variación de las propiedades fluorescentes de nanopartículas semiconductoras con la temperatura, y donde se demostró que las nanoestrellas son las estructuras que poseen los valores más elevados de eficiencia fototérmica (~100 %).<sup>[71]</sup>

Con respecto al tipo de láser a emplear, se conoce que el calentamiento utilizando láseres pulsados parece ser más controlable que los de onda continua en períodos de irradiación largos.<sup>[72]</sup> Por esta razón se prefiere el empleo de láseres pulsados para la liberación controlada de fármacos ya que el proceso ocurre en el orden de los minutos, en cambio para los láseres de onda continua ocurre en horas.<sup>[73-76]</sup>

### *Estabilidad coloidal de las AuNPs*

La prevención de la floculación de las AuNPs es uno de los aspectos más importantes en su uso en nanomedicina.<sup>[77-78]</sup> Este aspecto es de mayor importancia para el caso de las partículas anisótropas debido a que sus propiedades ópticas pueden afectarse debido a la agregación en el medio fisiológico. Un método universal de estabilizar las AuNPs es el que emplea las repulsiones electrostáticas entre estas, mediante la modificación de las partículas con ligandos cargados, tales como el citrato. Sin embargo, la estabilización de las AuNPs por estas interacciones se afecta por varios factores incluyendo el pH, la fuerza iónica y la temperatura. La carga sobre la superficie de las AuNPs puede también influir sobre la interacción entre las AuNPs y las moléculas utilizadas como agentes vectorizantes, lo cual limita sus aplicaciones.

Para lograr la estabilidad de las AuNPs bajo condiciones universales se emplea un método alternativo basado en la estabilización estérica mediante el recubrimiento superficial de las nanopartículas con diferentes polímeros. Entre estos polímeros el polietilenglicol (PEG) es uno de los más usados debido a su adecuada solubilidad y biocompatibilidad.<sup>[79]</sup> La modificación superficial de las nanopartículas transportadoras de fármacos con polietilenglicol/óxido de polietileno ha surgido como una estrategia para: 1) incrementar la solubilidad de fármacos hidrofóbicos, 2) prolongar el tiempo de circulación de las mismas, 3) minimizar la absorción no

específica y permitir la acumulación de las nanopartículas en el tejido tumoral a través del efecto de permeación y retención incrementada.<sup>[26, 49, 80]</sup>

### *Funcionalización de AuNPs con agentes vectorizantes*

La funcionalización de las nanopartículas con agentes vectorizantes es necesaria, fundamentalmente, para lograr la acumulación de las AuNPs preferentemente en zonas dañadas, previo a la irradiación con láseres.<sup>[32, 81]</sup> Además, en ocasiones la conjugación de biomoléculas a AuNPs incrementan su estabilidad coloidal, funcionalidad y biocompatibilidad.<sup>[82]</sup>

Por todo lo anterior, la biomolécula después de la conjugación debe ser estable y debe mantener sus propiedades para el bioreconocimiento. Además, luego de la conjugación, las nanopartículas deben mantener sus propiedades ópticas tales como: la fuerte absorción plasmónica y/o la dispersión de la luz.

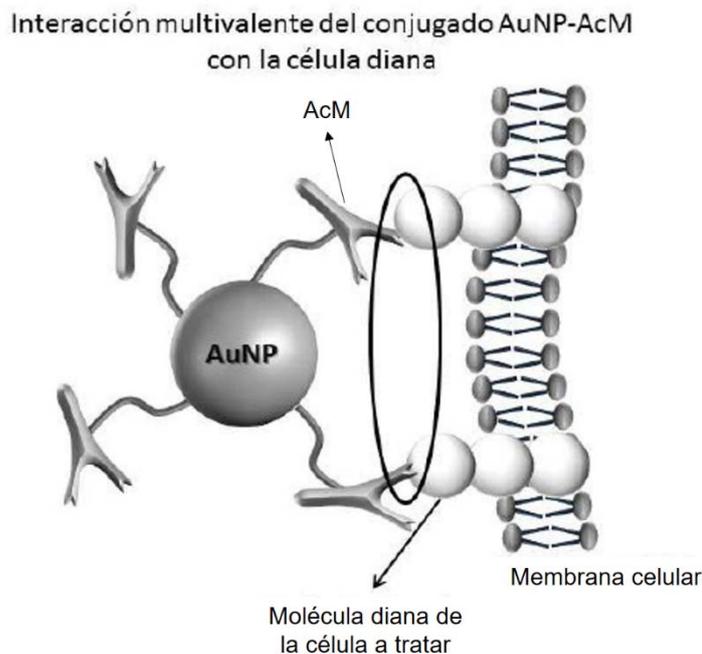
Se han empleado diferentes formas para funcionalizar las nanopartículas con las biomoléculas. Entre estas, aquellos métodos que se basan en la interacción electrostática entre las AuNPs y las biomoléculas constituyen la forma más fácil de funcionalizar y estabilizar los bioconjugados.<sup>[83]</sup> La masa molecular de la biomolécula y la carga total de sus grupos funcionales son factores importantes a considerar en este sentido. Las biomoléculas que poseen grupos ácidos o básicos son eficientes en la estabilización de las nanopartículas. En general, se acepta comúnmente que la estabilización ocurre mediante la adsorción pasiva de la biomolécula sobre la superficie de la nanopartícula por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. La ventaja de la adsorción física es que las nanopartículas tienen un efecto mínimo sobre la estructura y función de la biomolécula. Con la estructura nativa intacta, no se afecta la actividad, selectividad y especificidad de la biomolécula hacia su molécula blanco. Sin embargo, constituye una desventaja la posibilidad de la desorción de la biomolécula sobre la superficie de la nanopartícula.<sup>[84]</sup>

Alternativamente, las biomoléculas se pueden unir a una capa de moléculas estabilizadoras, previamente asociadas a través de sus grupos tioles o disulfuros a la

---

superficie de la nanopartícula, empleando los métodos de la química de bioconjugación. El protocolo más común es la unión covalente de los grupos aminos de la biomolécula con los grupos carboxilos en el extremo libre de las moléculas estabilizadoras empleando la reacción activada por la EDC.<sup>[85]</sup> Otros modos para unir las biomoléculas es mediante el recubrimiento superficial de las nanopartículas con capas alternantes de polielectrolitos catiónicos y aniónicos<sup>[86]</sup> o mediante asociaciones supramoleculares específicas.<sup>[59, 87]</sup>

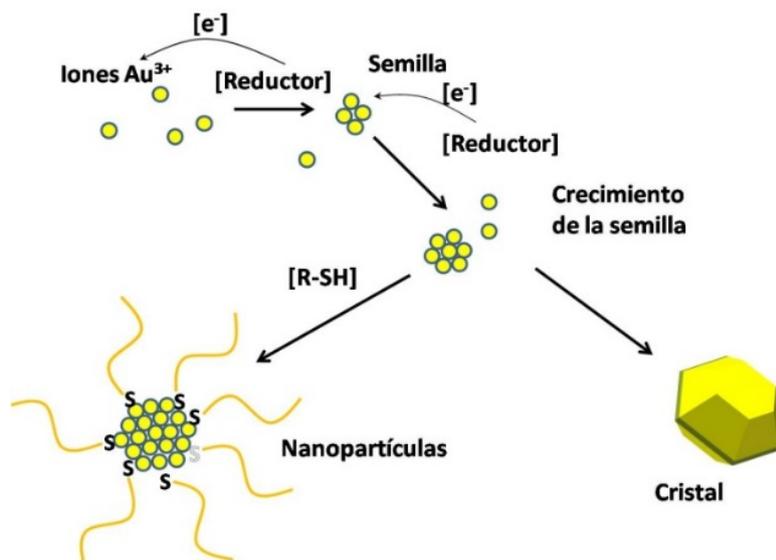
Para aplicaciones en terapia fototérmica del cáncer, una conjugación eficiente del agente vectorizante a las nanopartículas (alta eficiencia y poca pérdida de actividad) aumenta la acumulación de estas en las células dianas y, con ello, se reduce grandemente la potencia del láser requerida para la destrucción fototérmica del tejido blanco y se minimizan los daños a los tejidos sanos que lo rodean.<sup>[88-90]</sup> La funcionalización de las AuNPs con anticuerpos (AcM) permite su unión específica a las células diana (**Figura 10**).<sup>[91]</sup> Por ejemplo, ha sido descrito que las nanovarillas de Au conjugadas con un anticuerpo anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se enlazan específicamente a la superficie de células malignas con mucha mayor afinidad, debido a la sobre-expresión del EGFR sobre la membrana citoplasmática de las células cancerígenas.<sup>[76, 88]</sup>



**Figura 10.** Reconocimiento molecular específico entre el anticuerpo (AcM) asociado a la AuNP y la molécula diana de la célula a tratar.

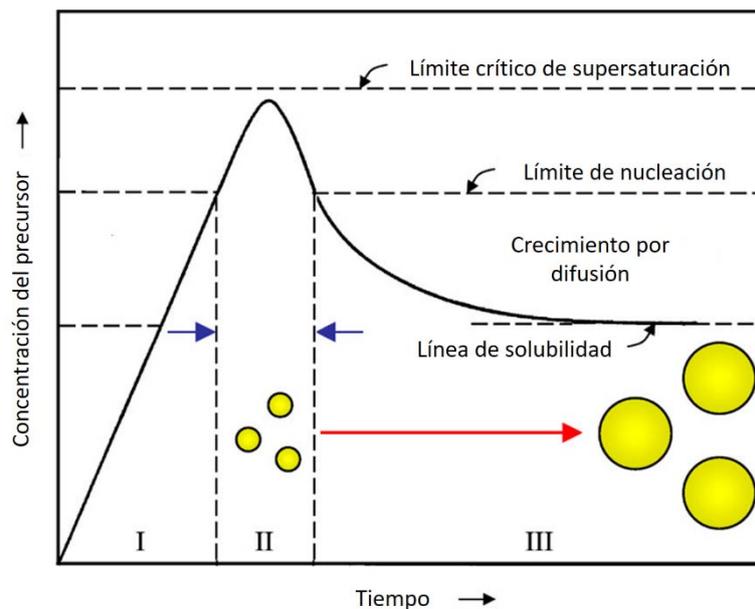
### 1.3. Métodos químicos para la obtención de AuNPs

De forma general, los métodos de síntesis de AuNPs involucran la formación de átomos de Au a partir de algún precursor de iones  $\text{Au}^{3+}$  (por ejemplo,  $\text{HAuCl}_4$ ) utilizando algún agente reductor, y que posteriormente se agrupan para formar pequeñas partículas, denominadas núcleos o semillas, que crecen a partir de la deposición de más átomos de Au sobre su superficie (**Figura 11**). El proceso puede llevarse a cabo en presencia de ligandos, como los tioles, fosfinas, aminas, polímeros, etc., que tienen afinidad por la superficie de la partícula y se enlazan inhibiendo su crecimiento y su agregación.<sup>[32]</sup>



**Figura 11.** Esquema que representa el proceso general de formación de AuNPs a partir de los iones metálicos en presencia de un agente reductor y un ligando tiolado que actúa como estabilizador.

Los estudios de los mecanismos de formación de las AuNPs comenzaron en 1951, aunque los estudios experimentales más extensos del crecimiento de nanocristales lo constituyen los estudios de LaMer-Dinegar<sup>[92]</sup> y de Ostwald.<sup>[93]</sup> El aspecto principal del mecanismo propuesto por LaMer y Dinegar consiste en que la nucleación está confinada temporalmente en un estadio temprano del proceso de formación de los nanocristales separado del crecimiento (**Figura 12**). En el mecanismo de Ostwald, el crecimiento de nanopartículas mayores se produce a expensas de nanocristales más pequeños los cuales se disuelven progresivamente y se depositan sobre los más grandes. Otros estudios mecanísticos han identificado la participación de la agregación de los nanocristales y la coalescencia en los procesos de crecimiento de nanocristales.<sup>[94]</sup>

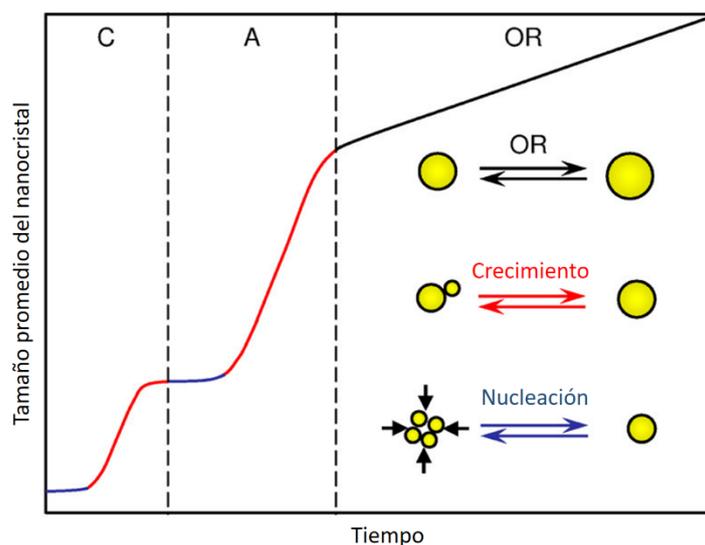


**Figura 12.** Representación esquemática del proceso de formación de nanocristales según el mecanismo de LaMer y Dinegar. Adaptado con permiso de *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5–21. Copyright 2014 American Chemical Society.

Recientemente, se ha propuesto un mecanismo de formación de nanocristales que incluye los procesos de nucleación y crecimiento clásicos propuestos por LaMer (C), los procesos de nucleación y crecimiento agregativos (A) y los procesos de maduración descritos por Ostwald (OR). Los 3 procesos pueden superponerse temporalmente (**Figura 13**).<sup>[95]</sup>

Con respecto a los procesos de crecimiento de nanocristales OR, se conoce que los procesos de oxidación de las especies cerivalentes incluyendo átomos, clusters y nanocristalitos, permiten el control sobre la cristalinidad, la morfología (tamaño y forma) y la cinética de crecimiento de los nanocristales.<sup>[96]</sup> Generalmente, los procesos de oxidación de nanocristales tienden a comenzar en sitios con puntas agudas en la superficie. Estos sitios son ricos en átomos con una baja coordinación por lo que la remoción de estos reduce la energía superficial total del nanocristal, resultando en una estructura final termodinámicamente más estable. Los precursores

de los metales nobles usualmente existen como complejos con haluros. Como resultado, los iones haluros liberados por los precursores pueden variar los potenciales redox de los iones metálicos<sup>[97]</sup> lo que promueve la reacción con el dióxígeno del aire para facilitar los procesos de oxidación durante la nucleación y el crecimiento.



**Figura 13.** Representación esquemática del proceso de formación de nanocristales que incluye 3 etapas. Los procesos de nucleación, crecimiento y maduración de Ostwald están representados con colores en el gráfico. Adaptado con permiso de *Chem. Mater.* **2014**, 26, 5–21. Copyright 2014 American Chemical Society.

### *Nanopartículas esféricas*

Los dos métodos más empleados para preparar AuNPs esféricas con diferentes tamaños son el método de Turkevich- Frens para nanopartículas entre 10 y 150 nm y el de Brust- Schiffrin para nanopartículas más pequeñas entre 1 y 5 nm.

El método más popular por mucho tiempo ha sido el de Turkevitch (reportado por primera vez en 1951). En este método se calienta a ebullición una disolución acuosa diluida de  $\text{HAuCl}_4$  y posteriormente se adiciona un volumen determinado de

una disolución acuosa de citrato de sodio al 1%, que actúa como agente reductor y ligando estabilizador de las partículas formadas.<sup>[98]</sup> En un esfuerzo posterior para obtener AuNPs con distintos tamaños (10-147 nm), Frens reportó en 1973 el mismo método, pero variando la relación entre la cantidad de citrato y del H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>.<sup>[99]</sup>

### *Crecimiento anisótropo de AuNPs*

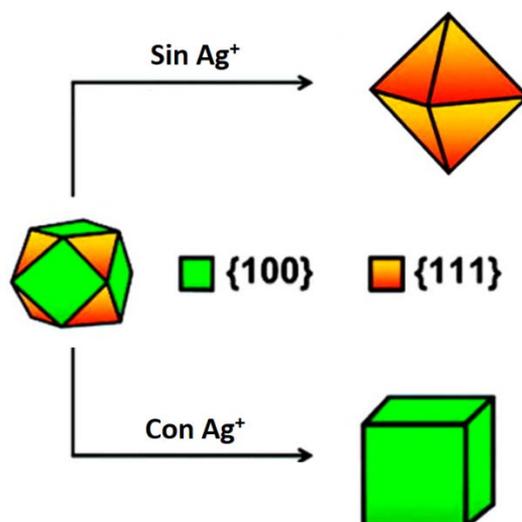
Debido a la fuerte correlación entre la morfología y las propiedades químicas, físicas, ópticas, electrónicas y catalíticas de las nanopartículas, el desarrollo de métodos de síntesis que permitan un control preciso de la morfología (forma y tamaño) es un paso clave para la fabricación de materiales funcionales en la escala nanométrica.<sup>[100]</sup> Desafortunadamente, en ocasiones, los métodos de síntesis descritos por LaMer-Dinegar-Ostwald no siempre permiten obtener AuNPs de todos los tamaños y formas y, para ello, se requieren de métodos de crecimiento de semillas. En estos métodos se busca separar la etapa de nucleación de la de crecimiento y, para ello, se utilizan reacciones de reducción catalizadas por superficies de metales blandos. Muchos de los métodos de síntesis de nanopartículas con diferentes morfologías se basan en el crecimiento de una semilla preformada para evitar la nucleación incontrolada y de esta forma dirigir el crecimiento de las partículas a los tamaños deseados. En estos casos se busca que la semilla actúe como catalizador de la oxidación del reductor permitiendo la adsorción y reducción de los iones metálicos sobre su superficie.<sup>[101-102]</sup> La mayoría de los reductores usados que cumplen estas condiciones son especies que posean insaturaciones como los aldehídos (formaldehído), ácido ascórbico, hidroquinona, o moléculas simples como el H<sub>2</sub> que interactúa con metales nobles.<sup>[103]</sup>

El crecimiento anisótropo de las partículas está directamente relacionado con las diferencias en la velocidad de adsorción de iones y/o átomos sobre las diferentes caras cristalográficas. Mientras, en general, los metales tienden a crecer para dar partículas termodinámicamente estables,<sup>[104]</sup> interesantemente, la presencia de ciertos agentes de recubrimiento superficial o aditivos, pueden alterar la energía superficial relativa de las caras (en el retículo cúbico centrado en las caras del Au:  $\gamma(110) > \gamma(100) > \gamma(111)$ )<sup>[104-105]</sup> y, con ello, se puede modificar la forma de la

---

partícula o, incluso, inducir la formación de nanopartículas con morfologías que en condiciones ordinarias no están favorecidas termodinámicamente.<sup>[106-107]</sup>

Por ejemplo, el crecimiento de partículas cubo-octaédricas preformadas produce octaedros o cubos dependiendo de si el proceso tiene lugar en ausencia o presencia de iones  $\text{Ag}^+$ , respectivamente.<sup>[107]</sup> Los iones  $\text{Ag}^+$  se depositan preferencialmente sobre las caras  $\{100\}$ , formando una capa de Ag que inhibe el crecimiento epitaxial de átomos de Au adicionales (**Figura 14**).



**Figura 14.** Esquema que representa el crecimiento anisotrópico de nanopartículas de oro en presencia de ciertos aditivos que conducen a partículas con diferentes morfologías. Adaptado con permiso de *J. Am. Chem.Soc.* **2012**, *134*, 1793–1801. Copyright 2012 American Chemical Society.

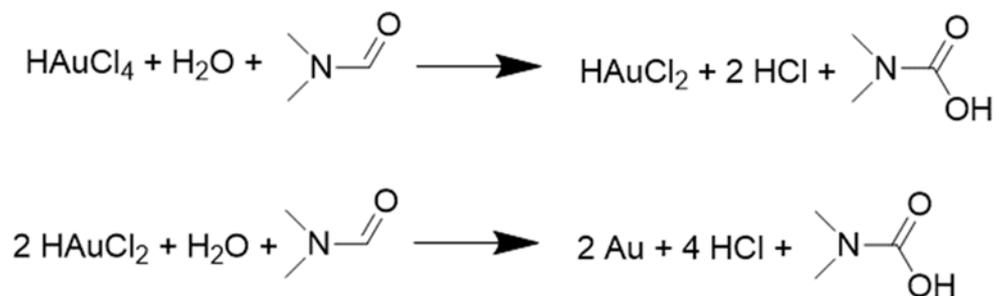
### *Nanopartículas ramificadas o nanoestrellas*

La utilización de semillas presintetizadas es una de las opciones más populares para la preparación de nanoestrellas metálicas monodispersas. En un procedimiento simple, las semillas de las nanopartículas metálicas monocristalinas o policristalinas constituidas por varios monocristales que comparten una cara, sirven como punto de

nucleación para el crecimiento de puntas o ramas, que crecen preferencialmente en una dirección cristalográfica determinada del núcleo metálico. En general, ya sea utilizando semillas mono o policristalinas,<sup>[44, 108]</sup> se observa que las nanoestructuras ramificadas resultantes son nanocristales policristalinos formados por un núcleo y un número de puntas cada una de ellas formada por un monocristal. Sin embargo, se han descrito otros ejemplos en los cuales se han obtenido nanoestrellas con puntas policristalinas.<sup>[109]</sup>

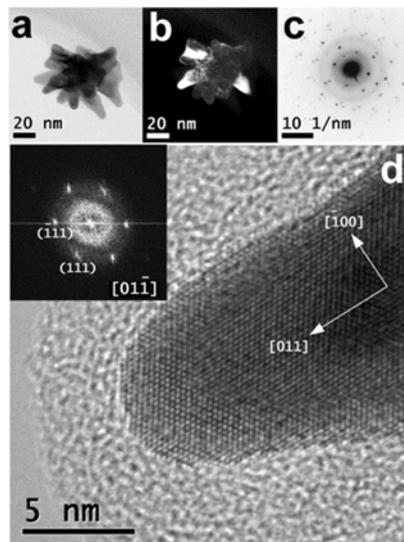
Uno de los métodos de síntesis de AuNSTs más populares ha sido inspirado en el muy conocido procedimiento de crecimiento de semillas empleado para la obtención de nanovarillas de Au.<sup>[110]</sup> Este método involucra la reducción del  $\text{HAuCl}_4$  con ácido ascórbico a temperatura ambiente sobre semillas de Au policristalinas estabilizadas con citrato y en presencia del surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio y de aditivos como el  $\text{AgNO}_3$  y el  $\text{HCl}$  (ac).<sup>[50, 111-112]</sup> Con este método se obtienen AuNSTs con numerosas puntas largas (poseen un núcleo de 38 nm rodeado de 17 puntas elongadas con un ancho de 9 nm y un largo de 46 nm).<sup>[71]</sup>

Un protocolo de reducción diferente, el cual ha demostrado tener un gran éxito en la producción de nanopartículas de Au ramificadas con altos rendimientos, fue propuesto sobre la base de resultados previos que demostraron la eficiencia de la DMF como agente reductor para la formación de nanopartículas metálicas (**Figura 15**).<sup>[113]</sup>



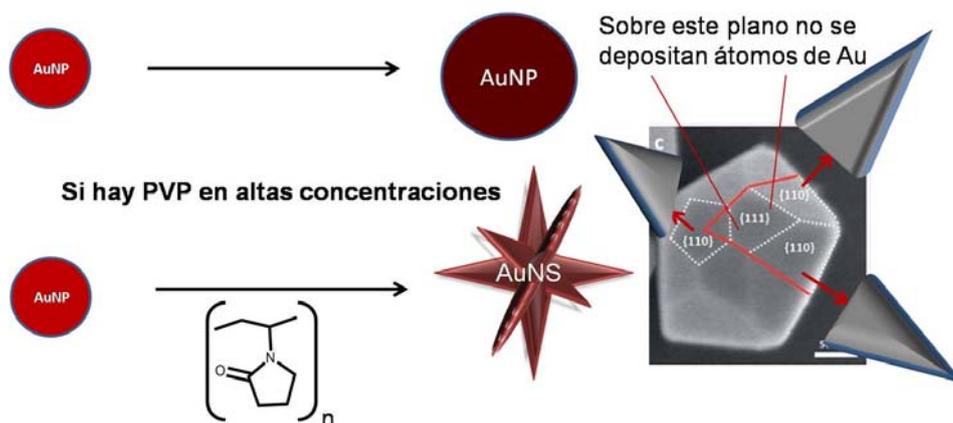
**Figura 15.** Ecuaciones químicas de la reducción del complejo  $\text{HAuCl}_4$  por la DMF que permite el crecimiento de AuNPs a partir de semillas preformadas.

Aunque los primeros trabajos usando este disolvente como reductor, se han enfocado principalmente en la producción de partículas con superficies lisas y geometrías bien definidas (esferas, alambres, decaedros y octaedros), en presencia de PVP como polímero protector a concentraciones elevadas, se ha descrito que pueden ser obtenidas nanoestructuras altamente ramificadas. Para ello, se añade  $\text{HAuCl}_4$  en presencia de semillas de Au de 15 nm cubiertas con PVP.<sup>[44, 114]</sup> Este procedimiento es muy eficiente ya que se pueden generar nanopartículas con múltiples pinchos agudos, en un tiempo muy corto y a temperatura ambiente. Un análisis de tales partículas, con un diámetro total de 80 nm, revela que cada punta es un monocristal con una dirección de crecimiento  $\{011\}$  (**Figura 16**). Se ha observado que el tamaño de las AuNSTs puede variarse entre 45 y 160 nm simplemente disminuyendo la concentración de las semillas de Au. Por otra parte, no se observan cambios significativos en el tamaño y la forma de las nanoestrellas cuando se utilizan PVP de diferentes masas moleculares.<sup>[58]</sup>



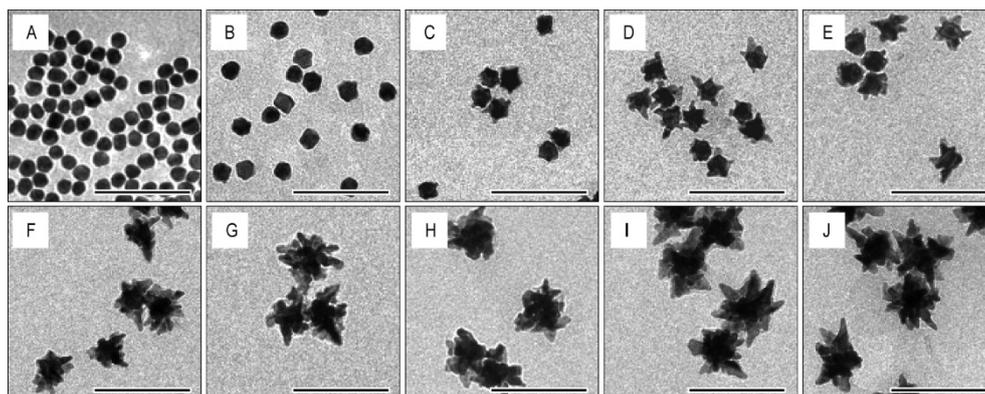
**Figura 16.** Arriba: Imágenes TEM de campo claro a) y oscuro b) de una nanoestrella, junto con su correspondiente patrón SAED c). Abajo: Imagen de HRTEM de una punta de la nanoestrella, donde la dirección de crecimiento 011 se identifica claramente. Adaptado con permiso de *Nanotechnology* **2008**, *19*, 015606-015612. Copyright 2008 IOP Publishing Ltd.

El PVP juega un papel importante en el proceso de crecimiento anisotrópico de las semillas de AuNP (15 nm) pues altera las energías superficiales relativas de las caras y por tanto sus velocidades de crecimiento (las cuales siguen el orden  $\{111\} < \{100\} < \{110\}$ ) (**Figura 17**). Para comprender el papel del PVP en el proceso se debe tener en cuenta además los siguientes aspectos: la interacción entre el PVP y la DMF y la interacción entre el complejo PVP-DMF con la disolución del  $\text{HAuCl}_4$ .<sup>[115-116]</sup>



**Figura 17.** Esquema que muestra el crecimiento anisotrópico de AuNPs en presencia de PVP que conduce a la formación de nanopartículas ramificadas.

El mecanismo de crecimiento de las nanoestrellas puede ser dividido en 2 etapas: primero se produce un rápido crecimiento después de la nucleación cuando el oro comienza a depositarse sobre las semillas y, con ello, incrementando su diámetro y formando protuberancias que sobresalen de su superficie y se desarrollan posteriormente para formar las puntas. En la segunda etapa se produce un crecimiento gradual mediante la deposición continua de oro que permite el crecimiento simultáneo de las puntas y el relleno del espacio fractal en sus bases que incrementa efectivamente el diámetro del núcleo de la estrella. Cuando el área superficial del núcleo se incrementa, genera espacio para que se puedan formar protuberancias adicionales que se desarrollan en puntas y, con ello incrementar la cantidad de puntas por partícula (**Figura 18**).



**Figura 18.** Imágenes de TEM tomadas en diferentes momentos durante la síntesis de AuNSts empleando una disolución de PVP en DMF. Adaptado con permiso de *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18849–18859. Copyright 2008 American Chemical Society.

Este proceso puede también conducir a la formación de nanoestructuras ramificadas en ausencia de semillas preformadas, pero con una polidispersión significativamente mayor y tamaños de partículas más grandes.<sup>[115-116]</sup> En este procedimiento es importante destacar la influencia de diferentes parámetros como: la pre-reducción controlada del Au(III) a Au(I), la relación molar  $\text{HAuCl}_4/\text{Au}(\text{semilla})$ , el tamaño de la semilla y la temperatura, sobre el tamaño, la morfología y la monodispersión de las nanoestrellas obtenidas. La pre-reducción del Au(III) a Au(I) influye sobre la monodispersión, mientras que la relación Au(III)/Au afecta la morfología. El tipo de semilla influye sobre la dimensión final de las nanoestrellas y el número de puntas. La temperatura de la síntesis influye sobre la morfología de las partículas, siendo más redondeadas cuando la temperatura está por encima de 60 °C.<sup>[114]</sup>

## 2. Materiales mesoporosos de sílice

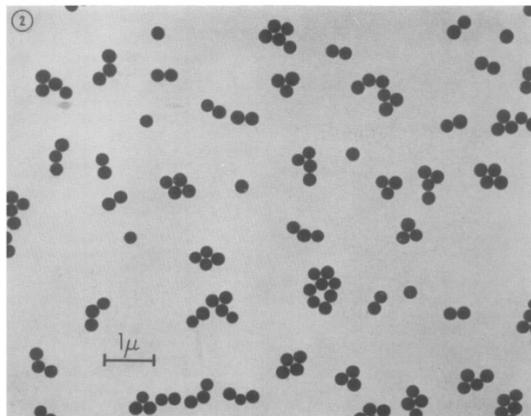
El desarrollo de sistemas de liberación de fármacos capaces de liberar las moléculas encapsuladas bajo determinados estímulos, constituye uno de los temas de investigación que se llevan a cabo con mayor auge en los últimos años, debido a su potencial aplicación en el campo de la biomedicina para el diagnóstico y

tratamiento de múltiples enfermedades.<sup>[117-118]</sup> En este sentido, se han desarrollado varios sistemas basados en liposomas, partículas poliméricas y soportes inorgánicos con diferentes tamaños, estructuras, propiedades superficiales y perfiles de liberación.<sup>[119-120]</sup> Entre estos sistemas, los materiales mesoporosos de sílice son especialmente interesantes y atractivos debido a que poseen propiedades únicas; tales como: su estabilidad química, biocompatibilidad, alta capacidad de carga de fármacos y una gran superficie, fácil y versátil de funcionalizar. Estos materiales se pueden obtener en forma de partículas con diferentes tamaños desde los micrómetros hasta los nanómetros, poseen poros de diámetros específicos entre 2 y 10 nm, una elevada área superficial específica (hasta 1200 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) y un gran volumen de poros (1 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>). Además, estos materiales se pueden funcionalizar con especies químicas, bioquímicas y entidades supramoleculares que actúan como puertas moleculares, controlando la difusión de los fármacos encapsulados desde el interior de los poros hacia el medio. Esta propiedad permite diseñar múltiples sistemas de liberación controlada por estímulos específicos de diferente naturaleza; como los estímulos físicos (radiación electromagnética, temperatura, campos magnéticos, ultrasonidos), químicos (aniones, cationes, moléculas neutras, agentes oxidantes y reductores, ácidos y bases) y bioquímicos (proteínas, enzimas, anticuerpos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos). Debido a la influencia de estos estímulos, se pueden producir cambios en las interacciones electrostáticas o supramoleculares, cambios en las propiedades físicas y/o la ruptura o formación de enlaces covalentes en las especies químicas unidas a la superficie externa de los materiales mesoporosos, que provocan en último caso, la difusión de los fármacos encapsulados desde el interior de los poros hacia el exterior.<sup>[27]</sup>

### 2.1. Métodos de síntesis

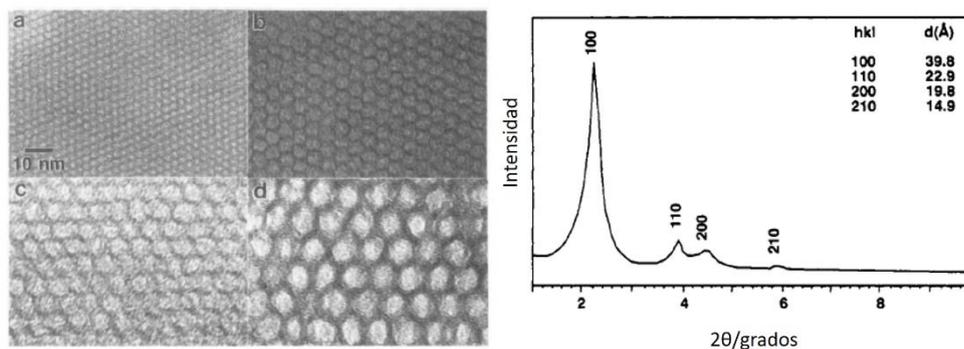
La síntesis de partículas de sílice mediante hidrólisis y condensación de alcoxilanos en disoluciones alcohólicas en presencia de amoníaco fue reportada en 1968 por Stober y col.<sup>[121]</sup> Con este método se obtienen partículas monodispersas con tamaños entre 50 nm y 2 μm utilizando alcoholes y alcoxilanos con diferentes

longitudes de las cadenas alquílicas y ajustando la concentración de agua y amoníaco en la mezcla (**Figura 19**).



**Figura 19.** Imágenes de TEM de las partículas de sílice obtenidas por hidrólisis del tetraetoxisilano en etanol. Adaptado con permiso de *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, 62-69. Copyright 1968 Elsevier.

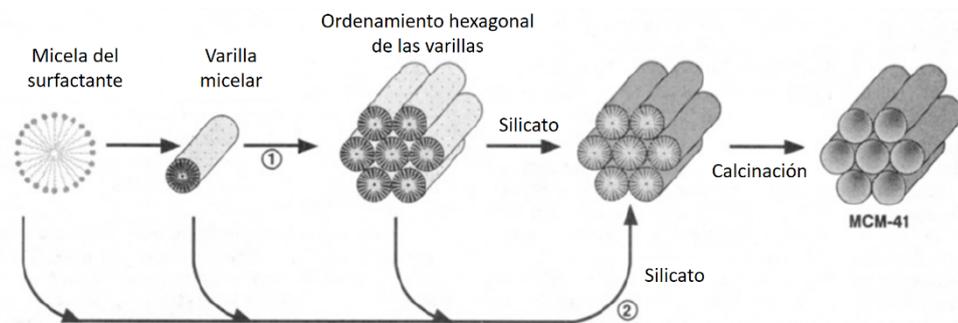
Por otro lado, en 1992 se describió la síntesis de una familia de materiales mesoporosos de sílice (M41S) utilizando diferentes surfactantes (sales de amonio cuaternario). Uno de los materiales de esta familia (MCM-41) posee un ordenamiento hexagonal de mesoporos uniformes cuyas dimensiones pueden variar entre 2 y 10 nm (**Figura 20**), mientras que los otros materiales poseen ordenamiento cúbico y laminar. El material MCM-41 posee una elevada área superficial superior a  $700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y una capacidad de adsorción de  $0.7 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , después de la calcinación, que permite eliminar el surfactante del interior de los poros.



**Figura 20.** Imágenes de TEM de diferentes materiales MCM-41 con tamaños de poro de 2, 4, 6.5 y 10 nm. Patrón de difracción de rayos-X en polvo del material MCM-41 con tamaño de poros de 4 nm. Adaptado con permiso de *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834-10843. Copyright 1992 American Chemical Society.

Para la formación de estos materiales, se ha propuesto un mecanismo en el cual, las estructuras de cristales líquidos que forman las moléculas de surfactante en la disolución, actúan como plantillas orgánicas sobre las cuales se condensan los oligómeros de sílice, debido a la atracción electrostática entre las especies aniónicas de sílice y la superficie hidrofílica catiónica de las micelas, produciéndose luego un crecimiento controlado del material (**Figura 21**).<sup>[122]</sup> La estructura y las dimensiones de los poros de estos materiales están estrechamente relacionadas con las propiedades del surfactante empleado, incluyendo el tamaño de la cadena alquílica; con el empleo de moléculas que actúan como co-surfactantes; con la concentración de agua y con la relación molar entre el surfactante y el precursor de silicio. La estructura de los cristales líquidos formados en la disolución del surfactante es altamente sensible a la composición de la mezcla. Además, la temperatura, la fuerza iónica, la concentración del surfactante, la carga y la polarizabilidad del contra-ión y la adición de co-surfactantes o aditivos como alcoholes e hidrocarburos, son factores que provocan un cambio del ordenamiento de las moléculas del surfactante en la disolución (micelas y varias fases cristalinas líquidas).<sup>[123]</sup> Por ejemplo, el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), uno de los surfactantes más utilizado en la síntesis de materiales mesoporosos de sílice, tiende a formar micelas en forma

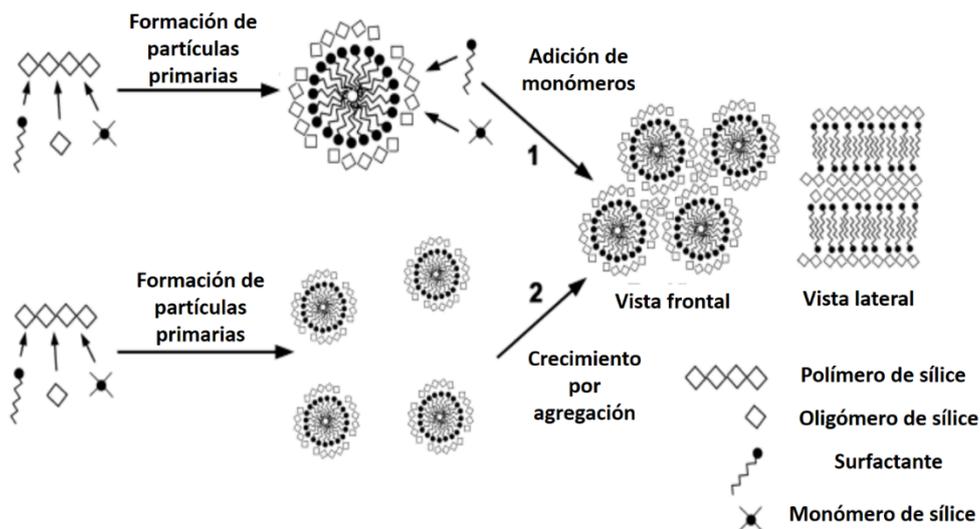
de cilindros en sistemas acuosos por encima de la segunda concentración micelar crítica ( $CMC_2 = 0.3 \text{ M}$ ), que se ensamblan en cristales líquidos hexagonales cuando la concentración es mayor que  $1.1 \text{ M}$ .<sup>[124]</sup> A pesar del elevado ordenamiento de los poros y la gran área superficial que poseen, los materiales obtenidos por este procedimiento están formados por láminas con morfología y tamaño heterogéneos.<sup>[125]</sup>



**Figura 21.** Posibles mecanismos para la formación del material MCM-41. Iniciado con la formación de los cristales líquidos del surfactante (1), o con la condensación de los oligómeros de sílice sobre las micelas del surfactante (2). Adaptado con permiso de *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834-10843. Copyright 1992 American Chemical Society.

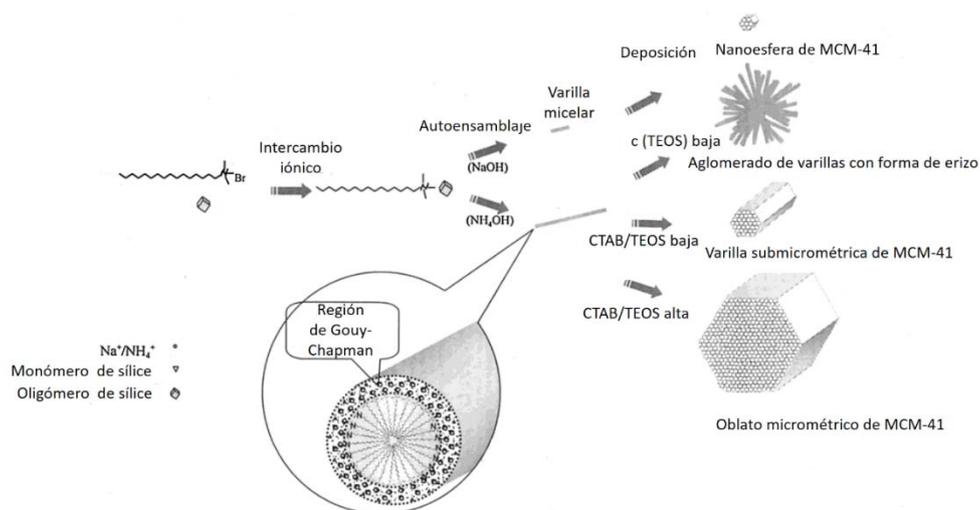
La síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice con una estructura de poros similar a la del material MCM-41 puede llevarse a cabo usando procedimientos similares al de Stober, al adicionar un surfactante catiónico a la mezcla de reacción.<sup>[126-127]</sup> La obtención de las nanopartículas sigue un mecanismo de autoensamblaje de partículas primarias formadas por condensación de oligómeros de sílice sobre las micelas del surfactante (**Figura 22**). La formación de estas partículas apantalla la repulsión electrostática entre las micelas adyacentes y permite el autoensamblaje de estas, produciéndose el crecimiento controlado del material. Mediante estos procedimientos se puede controlar las propiedades estructurales y el tamaño de las nanopartículas variando las condiciones de síntesis. Los procedimientos de síntesis se clasifican en función del medio empleado para la formación de las partículas. En sistemas acuosos, el tiempo de disolución de la sílice es mayor que el

tiempo de gelificación por lo cual la síntesis se lleva a cabo en condiciones heterogéneas; mientras que, utilizando mezclas de agua y alcoholes como co-disolventes, el tiempo de disolución de la sílice es menor que el tiempo de gelificación, siendo en este caso el sistema homogéneo.<sup>[124]</sup> Otros factores importantes son el tipo y la concentración del surfactante, el precursor de silicio y la base empleados, así como el empleo de otros aditivos que limitan el crecimiento y la agregación de las partículas. El tamaño de las nanopartículas aumenta con el incremento de las concentraciones de surfactante y precursor de silicio, lo que indica que en todos los casos el número de sitios de nucleación es constante desde los primeros instantes de la reacción. Cuando se utilizan condiciones heterogéneas y surfactantes catiónicos, se obtienen partículas cuasi-esféricas irregulares con mesoporos ordenados, creciendo las partículas en la dirección paralela a los canales de los poros. Por otro lado, cuando se emplean condiciones homogéneas y surfactantes catiónicos, se obtienen partículas esféricas con mesoporos ordenados que se orientan radialmente desde el centro hacia la superficie externa de la nanopartícula. En este caso, al aumentar la cantidad de etanol en el medio, disminuye la velocidad de hidrólisis y condensación de la sílice, formándose partículas más grandes. En condiciones homogéneas y con surfactantes neutros, se obtienen partículas esféricas con mesoporos desordenados.<sup>[15, 124, 128]</sup>



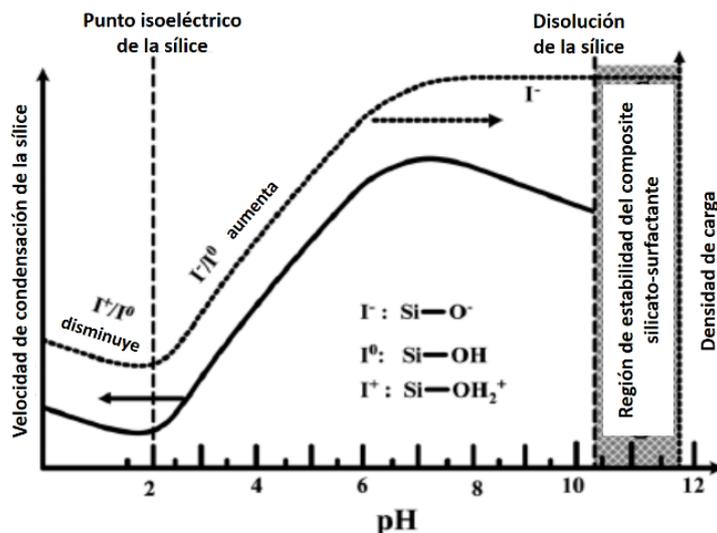
**Figura 22.** Posibles mecanismos para la formación de nanopartículas mesoporosas de sílice mediante un proceso controlado por la hidrólisis del precursor de silicio y posterior condensación de los oligómeros de sílice sobre las micelas del surfactante. Adaptado con permiso de *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 4721-4728. Copyright 2002 American Chemical Society.

El tamaño y la morfología de las nanopartículas, así como la organización de los poros, están también relacionados con el tipo y la concentración de base. Cuando se utilizan condiciones heterogéneas al emplear NaOH en lugar de amoníaco, se producen micelas cilíndricas de menor tamaño conduciendo a la formación de partículas más pequeñas (**Figura 23**).<sup>[129]</sup> En este sistema el tamaño de las nanopartículas también puede controlarse utilizando tiempos de reacción cortos y variando el tiempo entre la dilución y la neutralización de la mezcla.<sup>[130]</sup> También se ha determinado que existe una mayor influencia del pH sobre el tamaño de las partículas y la organización de los poros que la influencia de la concentración de TEOS y el tiempo de síntesis.<sup>[131]</sup>



**Figura 23.** Morfología de las partículas mesoporosas de sílice sintetizadas en condiciones heterogéneas en función del tipo de base utilizada y de la concentración de reactivos. Adaptado con permiso de *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 258-263. Copyright 2001 American Chemical Society.

Por otro lado, cuando se utiliza un procedimiento en dos etapas separadas en el tiempo: una de nucleación utilizando una concentración baja de TEOS y luego una de crecimiento donde se adiciona el resto del precursor de silicio, el tamaño de las partículas aumenta al aumentar la concentración de amoníaco en el intervalo de pH entre 10.86 y 11.52.<sup>[132]</sup> En la etapa de nucleación la etapa limitante de la velocidad es la condensación de la sílice. La dependencia de la velocidad de condensación de la sílice con el pH no es monótona en todo el intervalo de pH, siendo creciente por debajo de 7 y decreciente a valores mayores de pH (**Figura 24**).<sup>[133]</sup> Por eso, en el intervalo de 10.86 a 11.52 al incrementarse el pH disminuye la velocidad de condensación formándose un menor número de núcleos que producen partículas más grandes.<sup>[134]</sup>



**Figura 24.** Efecto del pH sobre la velocidad de condensación de la sílice y la densidad de carga superficial de las especies de sílice. Adaptado con permiso de *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3862-387. Copyright 2013 The Royal Society of Chemistry.

Sin embargo, cuando se emplean aditivos inorgánicos para ajustar el pH entre 6 y 10, disminuye el tamaño de las nanopartículas al aumentar el pH, debido a que al aumentar la velocidad de condensación de la sílice se forman un mayor número de núcleos y la etapa de crecimiento es la que determina el tamaño final de las nanopartículas. Durante el crecimiento se produce la agregación de más partículas primarias produciendo el crecimiento de los núcleos y la agregación de estos que en ambos casos provocan el incremento del tamaño de las nanopartículas. Al aumentar el pH se incrementa la densidad de carga superficial sobre las partículas en crecimiento que impide la posterior agregación de más partículas primarias por repulsión electrostática, disminuyendo la velocidad de crecimiento y conduciendo a la formación de partículas más pequeñas.<sup>[128]</sup>

### 2.2. Eliminación del surfactante y funcionalización superficial

Finalmente, para poder utilizar estas partículas como sistemas de liberación de fármacos, es necesario la eliminación del surfactante y la funcionalización de la superficie. La eliminación del surfactante puede realizarse mediante la calcinación al aire de las partículas a altas temperaturas, proceso que permite la oxidación de toda la materia orgánica en el material.<sup>[129]</sup> Durante este proceso, las partículas en contacto pueden agregarse irreversiblemente debido a la formación de enlaces Si-O-Si por la deshidratación de los grupos silanoles de la superficie externa de partículas adyacentes.<sup>[134]</sup> Se ha desarrollado un método de calcinación en fase líquida para eliminar surfactantes a altas temperaturas utilizando disolventes que poseen una elevada temperatura de ebullición que evita la agregación de las nanopartículas.<sup>[135]</sup> La eliminación del surfactante mediante extracción utilizando disoluciones etanólicas de HCl o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, es un método que se utiliza con preferencia sobre la calcinación al aire.<sup>[127, 134, 136]</sup> En este caso, el surfactante se solubiliza en etanol favoreciéndose su difusión hacia el medio por intercambio iónico con el catión. También se utiliza el proceso de diálisis para extraer el surfactante que evita la agregación de las partículas durante los procesos de sedimentación y redispersión manteniendo el estado coloidal original.<sup>[137]</sup>

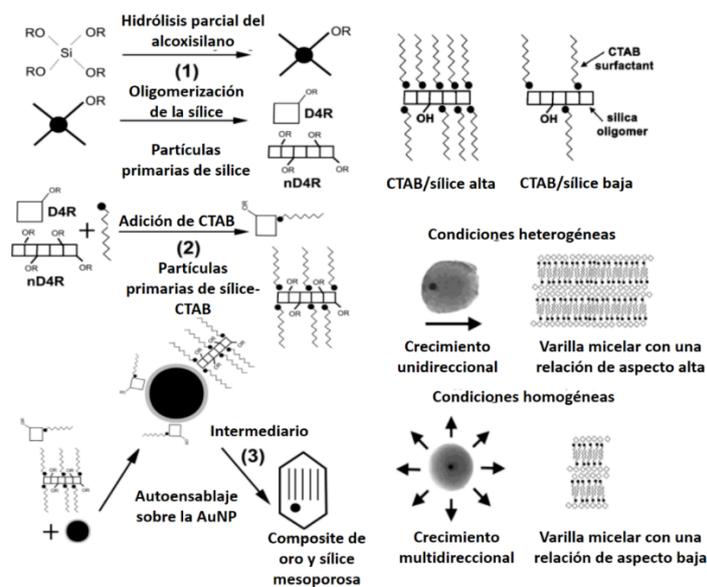
La superficie externa de las nanopartículas mesoporosas de sílice posee una elevada densidad de grupos silanoles que pueden reaccionar con un gran número de derivados organotrialkoxisilanos X-R-Si(OR)<sub>3</sub> en los cuales el átomo de Si está unido covalentemente a un fragmento orgánico (X-R-) que puede tener diversos grupos funcionales (X) como aminos, tioles, halógenos, isocianato. Esta primera modificación de la superficie de las nanopartículas permite su posterior funcionalización con un gran número de especies químicas, bioquímicas y entidades supramoleculares. La primera modificación puede producirse durante el proceso de formación de las nanopartículas al adicionar el derivado en la misma mezcla de reacción junto al precursor de silicio y el surfactante, en un proceso conocido como co-condensación.<sup>[138]</sup> En este proceso no sólo se modifican los grupos silanoles de la superficie externa del material, sino que además, se pueden modificar en mayor o

menor grado la superficie interna de los poros en dependencia del momento en el cual se adiciona el derivado en la mezcla de reacción. Cuando las partículas se modifican utilizando este procedimiento no puede emplearse el método de calcinación para eliminar el surfactante ya que se oxidarían los grupos orgánicos enlazados en la superficie. Utilizando este procedimiento se puede reducir las posibilidades de agregación de las nanopartículas después de extraer el surfactante durante los procesos de sedimentación y redispersión, al transformar los grupos silanoles reactivos de la superficie por otros grupos ionizables, que además pueden incrementar la estabilidad coloidal de las suspensiones de nanopartículas al incrementar la carga eléctrica superficial. La funcionalización de la superficie y la extracción del surfactante usando disoluciones etanólicas pueden realizarse simultáneamente.<sup>[133]</sup> El proceso de funcionalización de la superficie de las nanopartículas también puede realizarse después de la eliminación del surfactante. A diferencia del proceso de co-condensación, con este método se modifica principalmente la superficie externa que está más expuesta al medio de reacción. Además de la asociación covalente, pueden unirse entidades químicas a la superficie de la nanopartícula mediante adsorción por interacciones electrostáticas debido a que los grupos silanoles pueden ionizarse generando una elevada densidad de carga superficial negativa que permite la unión, por ejemplo, de polímeros catiónicos.<sup>[125]</sup>

### 3. Sistemas híbridos sílice-oro

Se han sintetizado nanopartículas híbridas sílice-oro con diferentes morfologías que se han utilizado en numerosas aplicaciones como catalizadores, sensores y sistemas de liberación de fármacos, pues incorporan en un único sistema las propiedades favorables de ambos materiales. Uno de los sistemas híbridos más utilizados está formado por un núcleo constituido por una nanopartícula de oro con diferentes morfologías (nanoesfera, nanovarilla, nanojaula) que se encuentra rodeado por una capa mesoporosa de sílice con diferentes dimensiones y ordenamiento de los poros.<sup>[5, 139-140]</sup> La síntesis de estas nanopartículas se produce mediante un procedimiento similar a la síntesis de nanopartículas mesoporosas de

sílice, añadiendo al medio de reacción las nanopartículas de oro junto al surfactante y la base, antes de añadir el precursor de silicio. De esta forma se produce el crecimiento controlado de la sílice sobre las nanopartículas de oro.<sup>[141]</sup> De forma similar a la síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice, el mecanismo para la formación de estas nanopartículas híbridas tiene tres etapas: la hidrólisis y condensación del precursor de silicio para formar oligómeros de sílice, la posterior formación de partículas primarias por asociación electrostática entre los oligómeros de sílice y la moléculas de surfactantes y finalmente el crecimiento controlado y preferencial de la sílice sobre las nanopartículas de oro, que actúan como centros de nucleación permitiendo la deposición de las partículas primarias (**Figura 25**).



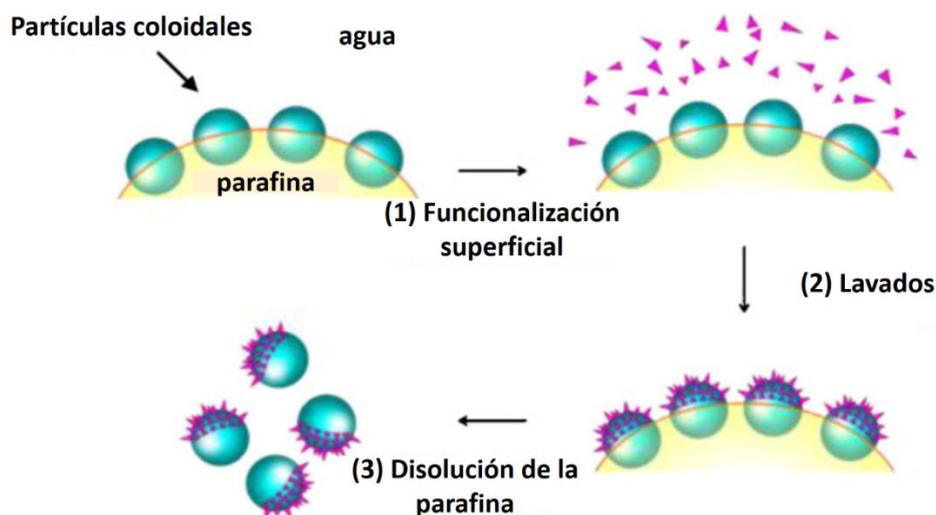
**Figura 25.** Mecanismo de formación de nanopartículas híbridas formadas por un núcleo de oro y una capa mesoporosa de sílice. Estructura de las partículas primarias formadas cuando se utilizan diferentes relaciones molares entre el surfactante y el precursor de silicio. Efecto del medio sobre la relación de aspecto de las varillas micelares formadas mediante el proceso de auto-ensamblaje de las partículas primarias y por consiguiente sobre la dirección de crecimiento de las nanopartículas. Adaptado con permiso de *Langmuir* **2003**, *19*, 7628-7637. Copyright 2003 American Chemical Society.

El tamaño de la capa de sílice, el ordenamiento de los poros y la morfología de las nanopartículas depende del medio, la solubilidad y la velocidad de hidrólisis del precursor de silicio, el pH y la relación molar entre el surfactante y el precursor de silicio. Estos factores determinan, además, el grado de ocupación y la posición de las nanopartículas de oro dentro de la matriz mesoporosa de sílice, obteniéndose nanopartículas que no poseen ningún núcleo de oro, otras con múltiples núcleos de oro o con un núcleo de oro pero que no está localizado en el centro de la partícula, sino más cercano a la superficie. Cuando se emplean relaciones molares bajas entre el surfactante y el precursor de silicio, se forman partículas primarias pequeñas con pocas cadenas de surfactante asociadas que poseen un débil potencial de dispersión y una reactividad química baja para auto-ensamblarse, lo que provoca que las nanopartículas de oro puedan flocular obteniéndose sistemas híbridos con varios núcleos. Por el contrario, al emplear relaciones molares altas, se forman partículas primarias grandes con una gran densidad de cadenas de surfactante asociadas, incrementándose su potencial de dispersión y su reactividad. En estas condiciones las partículas primarias se auto-ensamblan con mayor velocidad y se depositan sobre las nanopartículas de oro evitando que floculen, lo que permite obtener nanopartículas híbridas con un solo núcleo. Sin embargo, en estas condiciones se incrementa el número de partículas sin núcleos debido también a la elevada reactividad de las partículas primarias. La utilización de alcoholes como co-disolventes reduce la constante dieléctrica del medio, lo que provoca la formación de micelas en forma de varilla con menor longitud, lo cual incrementa la frecuencia de defectos en el ensamblaje de estas micelas a larga distancia, obteniéndose partículas con mesoporos desordenados al estar poco alineados con respecto a las partículas. El elevado número de defectos y el auto-ensamblaje no direccional de las micelas también determinan la formación de nanopartículas con morfología esférica.

Las nanopartículas Janus son otro tipo de sistema híbrido que se han preparado para su empleo en aplicaciones como la comunicación química, y el desarrollo de sensores y sistemas de liberación de fármacos.<sup>[142-144]</sup> Las partículas Janus son sistemas con una morfología anisotrópica en los cuales las nanopartículas de oro y de sílice están unidas y situadas en posiciones opuestas, de forma que ambas

---

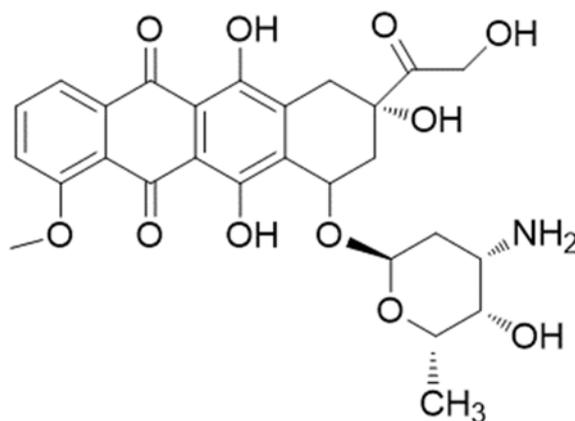
superficies están expuestas, lo cual permite su funcionalización diferenciada. Estas nanopartículas pueden sintetizarse utilizando una emulsión de parafina en agua, de forma que las partículas mesoporosas de sílice previamente sintetizadas, se confinan en la interfase de la emulsión, quedando expuesta al medio sólo una parte de su superficie, la cual puede ser funcionalizada con el derivado (3-mercaptopropil)trimetoxisilano como se describió anteriormente (**Figura 26**).<sup>[145-147]</sup> Este procedimiento de funcionalización parcial de la superficie de las nanopartículas de sílice permite su posterior unión con las nanopartículas de oro mediante el ensamblaje del ligando tiolado unido a la partícula de sílice sobre la superficie de la nanopartícula de oro. Ajustando la cantidad de parafina y de nanopartículas de sílice se puede controlar el área superficial de las partículas que queda expuesta en la emulsión y por consiguiente que pueda ser funcionalizada.<sup>[148]</sup> Controlando las proporciones mezcladas de las nanopartículas de oro y de sílice se puede controlar la composición de las nanopartículas híbridas resultantes.



**Figura 26.** Síntesis de nanopartículas Janus utilizando una emulsión de parafina en agua. Adaptado con permiso de *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2009**, 332, 57–62. Copyright 2009 Elsevier B.V.

#### 4. Sistemas empleados para la fotoliberación de fármacos

Las antraciclinas son antibióticos anticancerígenos que exhiben una actividad quimioterapéutica producto de su unión a la doble hélice del ADN que impide su replicación y la transcripción del ARN. Un ejemplo común de antraciclina es la doxorubicina (Dox), la cual es muy efectiva contra varios tipos de tumores humanos. La doxorubicina es una molécula tetracíclica, que contiene tres anillos hidroxiantraquinónicos planos y un anillo no aromático y no plano el cual tiene una cadena lateral aminoglicosídica (**Figura 27**). Debido a la presencia de varios grupos hidroxilos y carbonilos, así como del grupo amino de la unidad oligosacárida, la doxorubicina puede estar en varias formas prototrópicas a diferentes pH.<sup>[149-150]</sup>

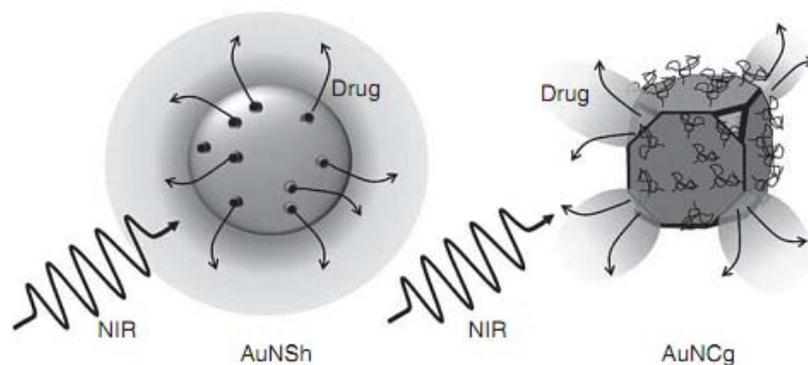


**Figura 27.** Estructura química de la doxorubicina.

Algunas investigaciones que han sido llevadas a cabo para determinar la dosis efectiva de este agente anticancerígeno, han revelado que este fármaco tiene un efecto tóxico hacia el tejido cardíaco.<sup>[151]</sup> Debido a esto, se han realizado numerosos esfuerzos por lograr un tratamiento específico de la doxorubicina hacia las células cancerígenas.<sup>[152-153]</sup> El conocimiento detallado del microentorno de la doxorubicina en diferentes medios constituye un pre-requisito para desarrollar un sistema transportador efectivo del fármaco.<sup>[149]</sup>

Se han propuesto numerosas estrategias para la carga y la liberación de la doxorubicina utilizando las AuNPs: 1) modificando la superficie de las AuNPs de forma que se establezcan interacciones electrostáticas y/o supramoleculares con el fármaco, 2) creando nanoestructuras huecas como las nanocapas y nanojaulas de oro que almacenan el fármaco en su interior, 3) introduciendo las nanopartículas dentro de estructuras termosensibles como liposomas e hidrogeles y 4) uniendo el fármaco a la superficie de la nanopartícula a través de un espaciador que puede fotodescomponerse.<sup>[153]</sup>

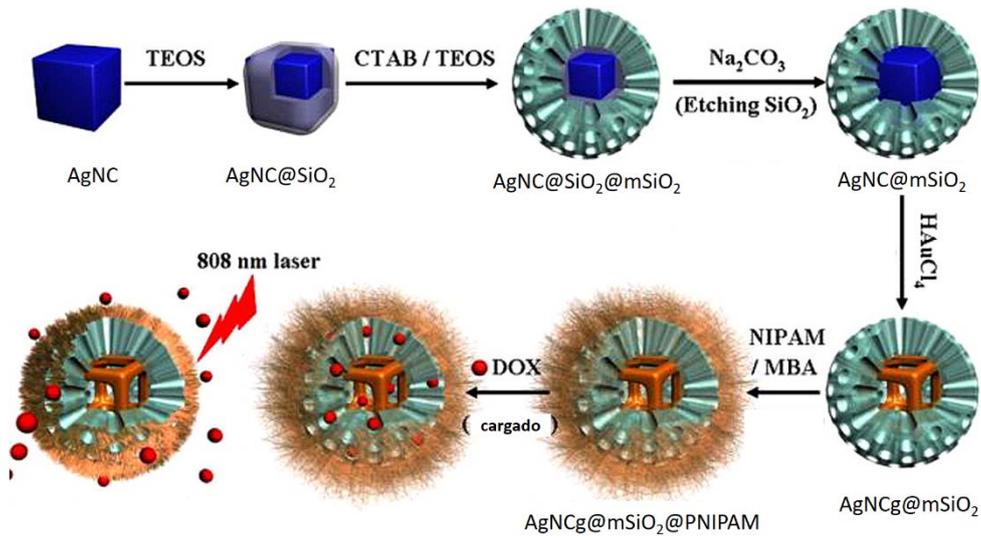
En general, los sistemas basados en AuNPs recubiertas con una monocapa, usualmente tienen una baja capacidad de carga del fármaco y falta de sensibilidad para el control de la liberación en respuesta a los cambios del entorno local.<sup>[154]</sup> Probablemente, los sistemas más eficientes reportados en la literatura para la fotoliberación de doxorubicina basados en AuNPs son aquellos que emplean nanopartículas huecas y porosas<sup>[155-157]</sup> y nanojaulas recubiertas con un polímero termosensible (**Figura 28**).<sup>[76, 158]</sup> Ambos sistemas se activan con radiaciones NIR, poseen tamaños que le permiten acumularse en el tumor debido al efecto EPR, son inertes y capaces de almacenar grandes cantidades del fármaco. Sin embargo, empleando las nanopartículas huecas y porosas el fármaco se libera por el calentamiento de toda la partícula empleando un láser con una potencia de  $2 \text{ W cm}^{-2}$  mientras que, con el empleo de las nanojaulas, el calor generado afecta principalmente al polímero termosensible, localizado en los vértices del cubo donde se encuentra los espacios vacíos por donde puede escapar el fármaco almacenado. Además, hay que destacar que estos sitios son los más calientes cuando se irradia la partícula y, por ello, con menos potencia se activa la liberación del fármaco (se emplean láseres con una potencia de  $20\text{-}40 \text{ mW cm}^{-2}$ ).



**Figura 28.** Sistemas eficientes de fotoliberación de fármacos basados en AuNPs. Izquierda: Nanopartículas huecas y porosas. Derecha: Nanojaula recubierta con un polímero termosensible.

Resulta importante destacar que, no se han descrito sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en AuNSTs aunque, si se han reportado otros donde la liberación es provocada por otro estímulo externo<sup>[159]</sup> o donde solo emplean las partículas en terapia fototérmica.<sup>[7, 26, 160]</sup>

En la literatura han sido descritos varios sistemas de fotoliberación de fármacos que combinan las nanopartículas plasmónicas de oro (nanovarillas y nanocajas) y materiales mesoporosos de sílice modificados con puertas moleculares, que pueden ser empleados en la terapia y el diagnóstico del cáncer (**Figura 29**).<sup>[5, 14, 27, 161-162]</sup> Se han utilizado varias entidades moleculares como puertas termosensibles en estos materiales tales como: polímeros,<sup>[5, 163]</sup> materiales que cambian de fase,<sup>[14]</sup> oligonucleótidos<sup>[161, 164-165]</sup> y válvulas supramoleculares.<sup>[162]</sup> Sin embargo, las nanoestrellas de oro combinadas con materiales mesoporosos de sílice con puertas moleculares no han sido empleadas en aplicaciones de fotoliberación de fármacos usando radiaciones del infrarrojo cercano, a pesar de tener propiedades plasmónicas superiores<sup>[22, 71]</sup> y de ser utilizadas actualmente con mayor auge en aplicaciones de imagenología intracelular y terapia fototérmica.<sup>[1-2, 23-24, 159, 166]</sup>



**Figura 29.** Sistema de fotoliberación de doxorubicina basado en nanojaulas de oro recubiertas de una capa mesoporosa de sílice funcionalizadas con un polímero termosensible. Adaptado con permiso de *Chem. Mater.* **2013**, 25, 3030–3037. Copyright 2013 American Chemical Society.

### Objetivos

El objetivo principal de la tesis es el desarrollo de nanodispositivos basados en nanoestrellas de oro y nanopartículas mesoporosas de sílice para la fotoliberación de fármacos empleando radiaciones del infrarrojo cercano que puedan ser utilizados en nanomedicina para el diagnóstico y la terapia del cáncer.

Con este propósito pueden ser sintetizadas nanopartículas con diferente composición y morfología, que tienen la capacidad de transformar eficientemente la energía de las radiaciones del infrarrojo cercano. Esta transformación puede ser empleada como una señal para la activación remota de la liberación controlada de los fármacos en las células tumorales dentro del organismo. Estas nanopartículas son capaces de almacenar el fármaco eficientemente evitando su acción en las células no tumorales y permitiendo su liberación controlada en las células diana después de la irradiación de las partículas.

Los objetivos específicos de la tesis son:

- 1- Sintetizar nanoestrellas de oro con diferentes tamaños y morfologías.
- 2- Evaluar la capacidad de calentamiento de una sola nanoestrella y de la suspensión de estas nanopartículas al irradiarlas con un láser NIR.
- 3- Sintetizar nanoestrellas de oro recubiertas con una capa de sílice mesoporosa cargadas con doxorubicina y funcionalizadas en la superficie externa con moléculas de parafina que actúan como puertas moleculares termosensibles.
- 4- Sintetizar dos profármacos de la doxorubicina con un espaciador fotolábil 2-nitrobencílico.
- 5- Sintetizar una molécula fotolábil con un espaciador 2-nitrobencílico con grupos tiol y carboxilo.
- 6- Sintetizar un polietilenglicol con un espaciador fotolábil 2-nitrobencílico y un grupo carboxilo terminal.

## Objetivos

---

7- Sintetizar nanopartículas Janus basadas en nanoestrellas de oro funcionalizadas con moléculas fotolábiles con un espaciador 2-nitrobencílico y grupos tiol y carboxilo y nanopartículas mesoporosas de sílice cargadas con doxorubicina y funcionalizadas en la superficie externa con un complejo supramolecular entre el benzimidazol y la  $\beta$ -ciclodextrina que actúa como una puerta molecular sensible al pH.

8- Sintetizar nanoestrellas de oro recubiertas con una capa de sílice mesoporosa cargadas con doxorubicina y funcionalizadas en la superficie externa con moléculas de polietilenglicol con un espaciador 2-nitrobencílico que actúa como puerta molecular fotosensible.

9- Caracterizar las nanopartículas sintetizadas por microscopía electrónica, espectroscopía de emisión de rayos X, espectroscopía UV-Vis-NIR y FT-IR, dispersión dinámica de la luz, difracción de rayos X, porosimetría y análisis termogravimétrico.

10- Caracterizar las moléculas sintetizadas por espectroscopía RMN, FTIR y UV-Visible, espectrometría de masas, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y espectroscopía de fluorescencia.

11- Realizar experimentos *in vitro* de fotoliberación de doxorubicina con un láser de 808 nm empleando las nanopartículas sintetizadas.

12- Evaluar la citotoxicidad de los profármacos de doxorubicina y las nanopartículas sintetizadas.

13- Realizar experimentos *in vitro* de fotoliberación de doxorubicina en células con un láser de 808 nm empleando las nanopartículas sintetizadas.

### **Capítulo 1. Nanoestrellas de oro recubiertas de una capa mesoporosa de sílice como agentes fototérmicos efectivos y no tóxicos con capacidad para la liberación de fármacos inducida por un láser**

En este trabajo se describe el desarrollo de un sistema de fotoliberación de doxorubicina basado en nanoestrellas de oro recubiertas de una capa mesoporosa de sílice (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>) que se funcionaliza con moléculas de parafina que actúan como puertas moleculares termosensibles. Se midió utilizando una matriz biológica termosensible, la temperatura superficial de una AuNSt irradiada con un láser ajustadamente enfocado. La temperatura de la superficie de la nanopartícula se incrementa en cientos de grados Celcius, incluso cuando se irradia a bajas potencias del láser. Las AuNSts se recubrieron con una capa mesoporosa de sílice utilizando un surfactante como plantilla para el crecimiento de la capa mesoporosa. Los parámetros de la síntesis se optimizaron para evitar la oxidación de las AuNSt y de esa forma obtener nanopartículas híbridas con propiedades ópticas adecuadas para la liberación del fármaco inducida por la irradiación con un láser NIR. Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> se cargaron con doxorubicina, se funcionalizó la superficie externa con octadeciltrimetoxisilano y se recubrieron con heneicosano. Las moléculas de parafina forman una capa hidrófoba que bloquea los poros impidiendo la liberación de la carga. Este sistema exhibió un perfil de fotoliberación de doxorubicina bien definido usando radiaciones NIR, mientras que la muestra no irradiada no mostró una liberación apreciable del fármaco. Estas nanopartículas no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, hasta que se irradiaron con un láser de 808 nm que provoca la fusión de la parafina y la liberación del fármaco. El método empleado en este trabajo permite obtener nanopartículas híbridas con propiedades ópticas adecuadas para la liberación de fármacos en aplicaciones potenciales relacionadas con la terapia del cáncer.

#### **1.1. Introducción**

Las nanoestrellas de oro absorben fuertemente las radiaciones NIR transformando eficientemente la energía electromagnética en calor,<sup>[11-13]</sup> debido a su intensa resonancia plasmónica superficial que genera una gran intensificación del

---

campo electromagnético en las puntas agudas de las partículas actuando como múltiples puntos calientes.<sup>[22, 41]</sup> En la literatura se ha descrito que las nanoestrellas poseen propiedades plasmónicas superiores<sup>[1, 18-19, 167]</sup> y por tanto una mayor eficiencia de la conversión de la energía luminosa en calor comparadas con otras partículas anisótropas de oro.<sup>[21-22, 25, 71]</sup> Estas propiedades de las AuNSTs las convierten en excelentes plataformas para el diseño de sistemas de fotoliberación de fármacos con potenciales aplicaciones en la terapia del cáncer<sup>[7-10]</sup> ya que puede obtenerse un efecto sinérgico al combinar la quimioterapia y la hipertermia debido al efecto conjunto del citotóxico liberado y del calor generado.<sup>[14-17, 168-169]</sup>

Aunque el uso de las nanoestrellas en aplicaciones basadas en el calentamiento producido por la absorción de las radiaciones NIR parece ser una alternativa prometedora para la terapia del cáncer, tanto la generación del calor adecuado como el control de la temperatura del entorno constituyen algunos de los retos asociados con estas aplicaciones.<sup>[22, 159-160, 167, 170]</sup> La capacidad de calentamiento de las nanopartículas producido por la absorción de la radiación se define por la velocidad de absorción específica (SAR por sus siglas en inglés) que depende de la densidad de potencia del láser, de la sección transversal de absorción y de la concentración de las nanopartículas.<sup>[13]</sup> Se ha descrito que la eficiencia de calentamiento de las AuNSTs en suspensiones acuosas depende del tamaño de la partícula y de la longitud de onda del láser.<sup>[171]</sup> Sin embargo, cuando las partículas están presentes en un entorno tumoral esa dependencia se ve alterada, debido a la agregación o la degradación de las partículas *in vivo*.<sup>[24]</sup> Con el objetivo de evaluar y comparar la capacidad de calentamiento de las nanopartículas individuales y por lo tanto determinar sus aplicaciones potenciales en la terapia del cáncer (hipertermia y liberación fototermoestimulada de fármacos) es importante conocer el perfil de temperatura alrededor de una nanopartícula irradiada con un láser.<sup>[172-173]</sup> Para cuantificar el perfil de temperatura alrededor de una nanopartícula irradiada se puede utilizar una matriz biológica con una temperatura de transición de fase bien definida como sensor. Esta metodología se ha descrito en la literatura para varios tipos de nanopartículas,<sup>[174-177]</sup> sin embargo, no se ha utilizado para las nanoestrellas.

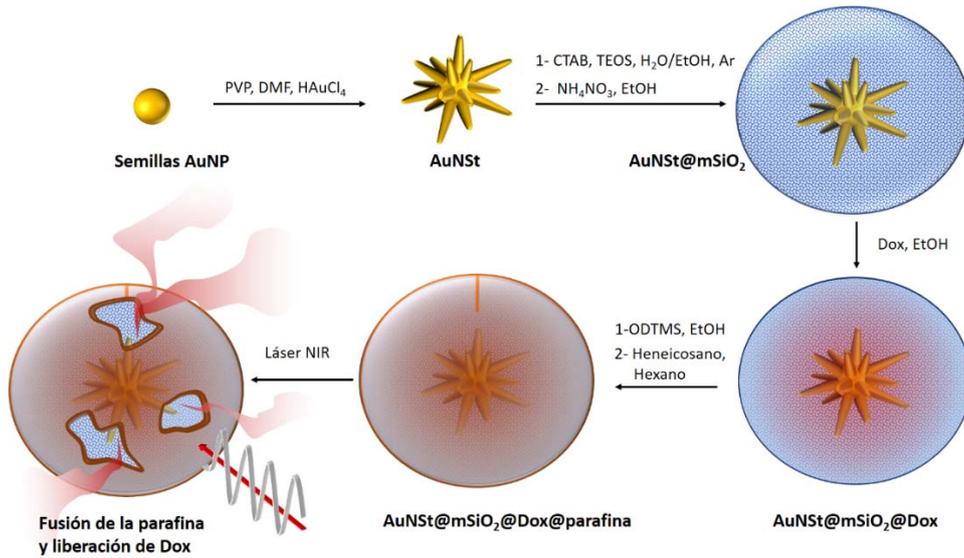
Por otro lado, las nanopartículas mesoporosas de sílice son excelentes candidatas para encapsular eficientemente el fármaco ya que poseen poros de tamaños definidos y elevados volúmenes y áreas específicas. Estas nanopartículas pueden funcionalizarse en la superficie externa de los poros con moléculas termosensibles que evitan la difusión del fármaco desde el interior de los poros hacia el medio.<sup>[27]</sup> Se han preparado varios sistemas de fotoliberación de fármacos basados en nanopartículas plasmónicas de oro cubiertas de una capa de sílice mesoporosa y funcionalizadas con diferentes puertas moleculares termosensibles. Las nanopartículas de oro empleadas con mayor frecuencia son las nanovarillas<sup>[14, 161-165]</sup> y las nanojaulas,<sup>[5]</sup> mientras que se han empleado como puertas moleculares termosensibles oligonucleótidos,<sup>[161, 164-165]</sup> polímeros,<sup>[5, 163]</sup> válvulas supramoleculares<sup>[162]</sup> y materiales que cambian de fase.<sup>[14]</sup> Sin embargo, no se han descrito sistemas similares utilizando las nanoestrellas de oro, a pesar de que se han utilizado extensamente en aplicaciones de terapia fototérmica<sup>[1, 26, 159, 178]</sup> e imagenología celular.<sup>[23, 166, 179-180]</sup>

En este trabajo, se desarrolló un sistema de fotoliberación de fármacos basado en nanoestrellas de oro cubiertas de una capa mesoporosa de sílice y funcionalizadas con moléculas de parafina que actúan como puertas moleculares termosensibles. También se cuantificó las capacidades de calentamiento y liberación de fármacos de las nanopartículas utilizando radiaciones NIR. Utilizando una matriz biológica, se determinó el perfil de temperatura alrededor de las nanoestrellas de oro. El calentamiento asociado con la irradiación de las nanopartículas depende de la potencia del láser y del recubrimiento de las AuNSts. Tanto para las AuNSts sin recubrimiento como para las AuNSts recubiertas con PVP (polivinilpirrolidona) se pueden alcanzar temperaturas sobre los 100 °C en la superficie de las nanopartículas utilizando potencias de láser relativamente bajas (50 mW), que son suficientemente elevadas para su empleo en la terapia del cáncer. Se optimizó la reacción de recubrimiento de las nanoestrellas con la capa mesoporosa de sílice con el objetivo de obtener sistemas híbridos con propiedades ópticas adecuadas. Las nanopartículas se cargaron con doxorubicina y se funcionalizaron en la superficie externa con octadeciltrimetoxisilano y heneicosano, que forman una capa de parafina en la

superficie que evita la difusión del fármaco. La liberación de la doxorubicina se produce al irradiar las nanopartículas con un láser de 808 nm debido a la fusión de la parafina por el calor generado producto de la absorción de la radiación por las nanoestrellas. Las nanopartículas híbridas cargadas con doxorubicina no mostraron toxicidad hacia las células HeLa hasta que se irradiaron con el láser, ya que se produce la liberación del citotóxico que provoca la disminución de la viabilidad celular.

### **1.2 Resultados y Discusión**

Aunque el empleo de las AuNSts recubiertas de una capa de sílice mesoporosa funcionalizada con moléculas de parafina parece ser una alternativa novedosa e interesante para aplicaciones de liberación de fármacos controlada por radiaciones NIR, la preparación de estas nanopartículas presenta una gran dificultad debido a que se producen procesos químicos competitivos durante las etapas de síntesis. Por ejemplo, el CTAB es un componente crucial para el crecimiento de la capa mesoporosa de sílice, sin embargo, la presencia de los iones  $\text{Br}^-$  puede favorecer la oxidación parcial de las puntas de las AuNSts produciéndose la consiguiente variación de sus propiedades ópticas. Por esta razón, se requiere de un control riguroso de cada etapa de síntesis para obtener nanopartículas con una capa de sílice y mesoporos homogéneos y con propiedades plasmónicas adecuadas. La preparación del sistema híbrido final requiere cinco etapas: 1-síntesis de las AuNSts; 2-recubrimiento con la capa mesoporosa de sílice; 3-eliminación del surfactante de los poros; 4-cargado de los poros con el fármaco y 5- recubrimiento de la superficie externa con la parafina. En la **Figura 1** se muestra la representación de las etapas de síntesis de las nanopartículas  $\text{AuNSt@mSiO}_2\text{@Dox@parafina}$ .



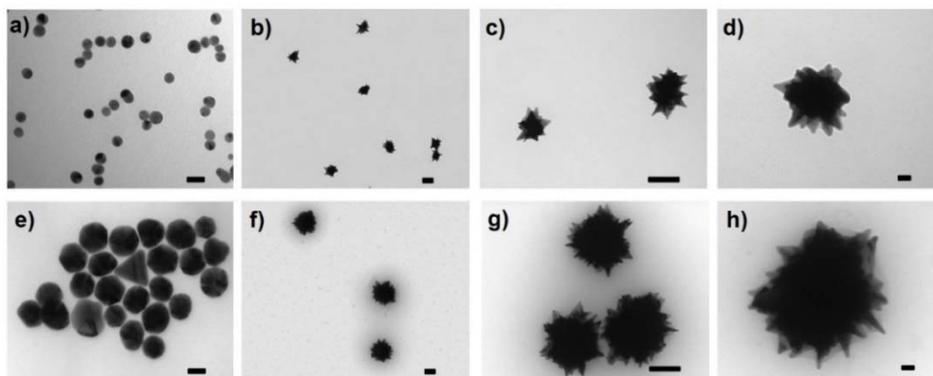
**Figura 1.** Representación del proceso de síntesis de las nanopartículas híbridas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina.

*Síntesis de las AuNSts y evaluación de la eficiencia fototérmica*

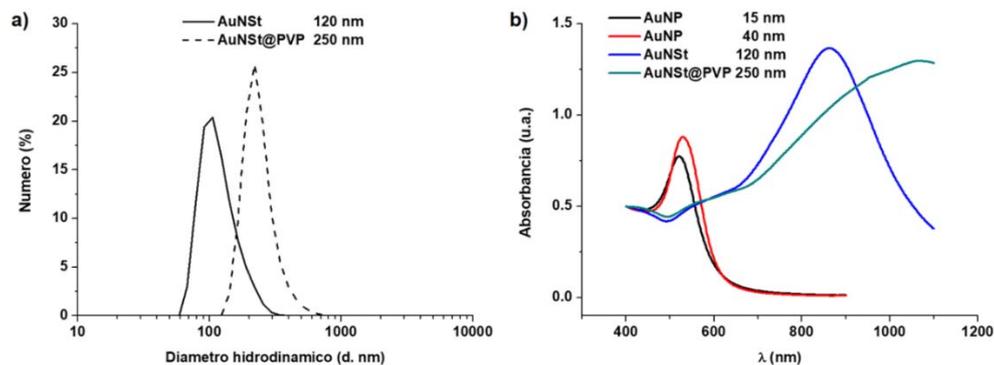
Las AuNSts se obtienen por un método de crecimiento de semillas utilizando una disolución concentrada de polivinilpirrolidona (PVP  $M_w = 10000$ ) en N,N-dimetilformamida (DMF).<sup>[44, 113]</sup> Este proceso se basa en la reducción del HAuCl<sub>4</sub> por la DMF y la consiguiente deposición de átomos de Au en presencia del PVP sobre nanopartículas de oro pre-sintetizadas que actúan como semillas o centros de nucleación. El polímero se adsorbe sobre la superficie de las nanopartículas de oro promoviendo el crecimiento preferencial en la dirección de ciertos planos cristalográficos y la formación de nanopartículas multiramificadas. La morfología de las nanopartículas y la posición de la banda de resonancia plasmónica se pueden modular variando la relación molar HAuCl<sub>4</sub>/Au(semilla) y el tamaño de las semillas.<sup>[114, 181]</sup>

Se sintetizaron dos muestras de nanoestrellas (AuNSt y AuNSt@PVP) con diámetros de 120 y 250 nm a partir de nanopartículas de oro esféricas de 15 y 40 nm,

respectivamente. Las AuNSts de 120 nm se lavaron varias veces con agua para eliminar el recubrimiento superficial de PVP, mientras que las AuNSt@PVP de 250 nm solo se lavaron una vez con agua, quedando un exceso de PVP asociado a la superficie de las partículas. En la **Figura 2** se muestran las imágenes de TEM de las nanopartículas de oro utilizadas como semillas y de las nanoestrellas obtenidas a partir de las primeras. Se puede observar la morfología anisótropa de estas partículas formada por un núcleo cuasi-esférico rodeado de múltiples puntas agudas. Los diámetros hidrodinámicos de estas partículas determinados por DLS son consistentes con los tamaños determinados por TEM (**Figura 3a**). Estas nanopartículas poseen diferentes propiedades ópticas. Las nanopartículas esféricas poseen una banda LSPR en la zona visible del espectro electromagnético cuya posición se desplaza ligeramente a mayores longitudes de onda al incrementarse el tamaño de la nanopartícula. Los espectros de las suspensiones acuosas de ambas muestras de nanoestrellas poseen una banda u hombro en la región visible asociada con la LSPR de los electrones de los núcleos y otra banda más intensa en la región NIR asociada con la LSPR de los electrones de las puntas.<sup>[182]</sup> La longitud de onda de esta banda varía desde 850 a 1050 nm cuando el tamaño de las nanoestrellas cambia de 120 a 250 nm (**Figura 3b**). La posición de esta banda depende del tamaño y la morfología de las partículas y del índice de refracción local cerca de la superficie.<sup>[26, 60, 183-184]</sup>



**Figura 2.** Imágenes de TEM de las semillas (AuNPs) con diferentes diámetros (15 nm (a), 40 nm (e)), y de las AuNSts de 120 nm sin recubrimiento (b,c,d) y AuNSt@PVP de 250 nm recubiertas de PVP (f,g,h). Barras de escala: 100 nm (b,c,f,g); 20 nm (a,d,e,h).

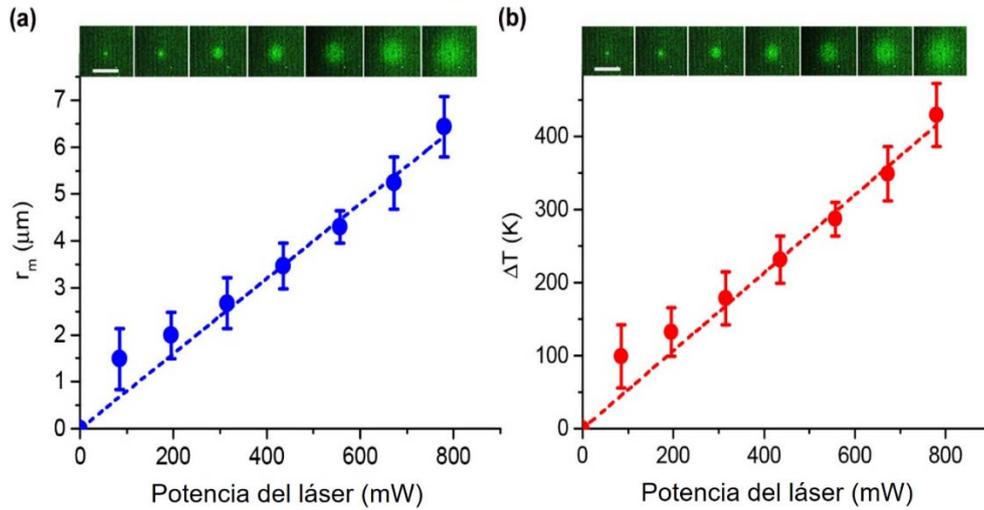


**Figura 3.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico de las AuNSt de 120 nm sin recubrimiento y de las AuNSt@PVP de 250 nm recubiertas de PVP (a). Espectros de absorción de las AuNPs de 15 y 40 nm utilizadas como semillas y de las AuNSt de 120 nm sin recubrimiento y de las AuNSt@PVP de 250 nm recubiertas de PVP (b).

Después de la síntesis se caracterizó la capacidad de calentamiento de las AuNSts cuantificando tanto el perfil de temperatura alrededor de una nanopartícula como el incremento de la temperatura de la suspensión asociados con la irradiación electromagnética.

Utilizando una matriz lipídica termosensible se realizaron mediciones directas del perfil de temperatura alrededor de una AuNSt de 120 nm sin recubrimiento y de una AuNSt@PVP de 250 nm recubierta de PVP, ambas irradiadas con un láser NIR.<sup>[174-175]</sup> En los experimentos se inmovilizó una partícula sobre una bicapa lipídica con una temperatura de transición de fase bien definida, a la cual se le incorpora un colorante fluorescente que posee una mayor afinidad por la fase líquida (FAST-DiO). La nanopartícula inmovilizada se irradia con un láser NIR ajustadamente enfocado (1064 nm). La temperatura de la cámara donde se realizaron las mediciones se mantuvo a 28 °C, mientras que la bicapa posee una transición de fase a 33 °C. Si la temperatura en la región alrededor de la nanopartícula se incrementa en 5 °C se produce una transición de fase en la bicapa y una difusión del fluoróforo hacia la fase líquida. De esta forma se puede determinar el área de la región fundida debido al incremento de la señal de fluorescencia.<sup>[176]</sup> Utilizando este sistema se puede medir

el calentamiento asociado con la radiación electromagnética visualizando la huella alrededor de la nanopartícula correspondiente a la región de la bicapa fundida. El contorno de la región fundida se determinó calculando el área sobre la superficie con mayor intensidad del color. Las imágenes tomadas se transformaron en imágenes binarias con un valor límite correspondiente a la intensidad del color de la bicapa sin fundir. Los píxeles por encima del valor límite se les asignó el valor de 1, mientras que los píxeles restantes se les asignó el valor 0. Se determinó el radio ( $r_m$ ) a partir del área de la región circular de la bicapa fundida.



**Figura 4.** Cuantificación de la temperatura superficial de la AuNSt de 120 nm sin recubrimiento. a) Los círculos muestran las mediciones experimentales del radio del área de la bicapa fundida alrededor de la AuNSt irradiada a diferentes potencias del láser. b) Incrementos de temperatura en la superficie de la AuNSt irradiada en función de la potencia del láser. Los paneles superiores muestran las imágenes confocales correspondientes al área fundida para cada potencia del láser. Las barras de escala miden  $10 \mu\text{m}$ . Las barras de error muestran la desviación estándar de las mediciones realizadas para 10 partículas diferentes y la línea discontinua representa el ajuste lineal a los datos experimentales.

Una descripción cuantitativa del incremento de temperatura alrededor de una partícula en un medio infinito en estado estacionario se obtiene a partir de la ecuación:<sup>[185]</sup>

$$\Delta T(r) = \frac{C \cdot P}{r} \quad (1)$$

Donde  $P$  es la potencia del láser y  $C$  es una constante que incluye el área del haz del láser, la sección transversal de absorción de las nanopartículas y la conductividad térmica del medio.<sup>[174-175]</sup> Basado en esta ecuación, existe una relación lineal entre  $r_m$  donde la temperatura es  $T_m = 33 \text{ °C}$  ( $\Delta T_m = 5 \text{ °C}$ ) y  $P$ . En la **Figura 4a** se muestra la dependencia entre  $r_m$  y  $P$  determinada experimentalmente a partir del análisis de las imágenes, verificándose la relación lineal que predice la ecuación 1. Ajustando esta ecuación a los datos experimentales se puede determinar el valor de  $C = 40 \text{ K nm mW}^{-1}$ . Utilizando este valor de  $C$ , es posible obtener el perfil de temperatura alrededor de la nanopartícula irradiada a diferentes potencias.

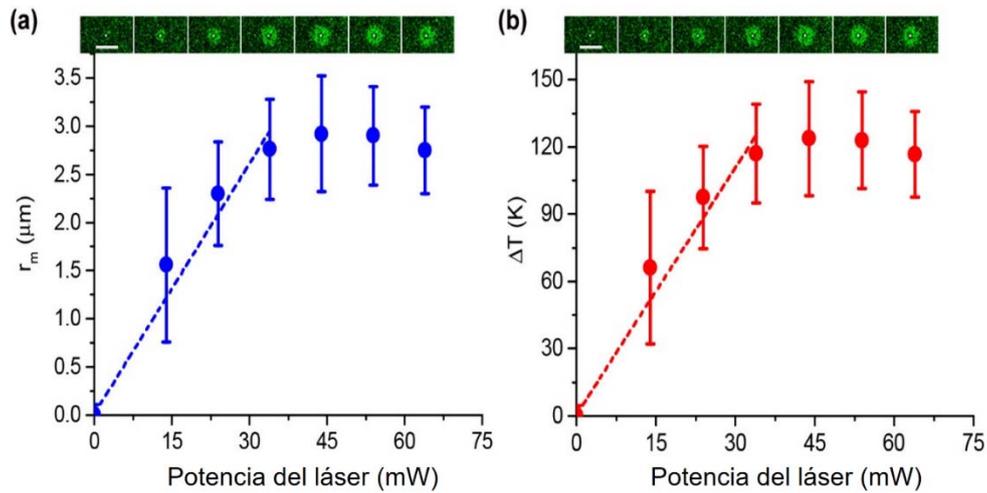
El incremento de temperatura en la superficie ( $\Delta T_s$ ) de la AuNSt de 120 nm sin recubrimiento en función de la potencia del láser se muestra en la **Figura 4b**. Para determinar el incremento de temperatura en la superficie de la partícula utilizamos como radio promedio de la nanopartícula 60 nm (**Figura 2 y 3**). Las barras de error muestran la desviación estándar de las mediciones realizadas para 10 nanopartículas. El incremento de temperatura en la superficie de la AuNSt alcanza valores en el orden de los cientos de grados Celsius, sin mostrar signos de deterioro. Este resultado indica que seleccionando cuidadosamente la potencia de irradiación se puede controlar el perfil de temperatura alrededor de la nanopartícula.<sup>[175]</sup> Por ejemplo, a 100 mW, el incremento de la temperatura en la superficie de la partícula alcanza un valor superior a 50 °C, suficiente para producir la fusión de la parafina y la liberación del fármaco encapsulado en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>.

Se puede realizar una determinación experimental de la sección transversal de absorción de las nanopartículas utilizando la siguiente ecuación:<sup>[186]</sup>

$$C_{abs} = \frac{4 \cdot \pi \cdot \bar{k} \cdot \Delta T_s \cdot R}{I} \quad (2)$$

Donde  $\Delta T_S$  es el incremento de temperatura en la superficie de la nanopartícula,  $R$  es el radio de la partícula,  $I$  es la densidad de potencia del laser y  $\bar{k}$  es la conductividad térmica del sistema agua-vidrio a 300 K que puede aproximarse al promedio de  $k_{\text{vidrio}} = 1.1 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  y  $k_{\text{agua}} = 0.61 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ <sup>[187]</sup> como se sugiere en la referencia.<sup>[186]</sup> Utilizando esta ecuación se determina  $C_{\text{abs}} = 1012 \text{ nm}^2$ . Este valor es menor que el reportado para las nanocapas de oro<sup>[177]</sup> debido a la menor absorción de las nanoestrellas a la longitud de onda del láser.

También se determinó el incremento de temperatura de las AuNSt@PVP de 250 nm recubiertas de PVP. Comparadas con las nanoestrellas de 120 nm sin recubrimiento superficial, las nanoestrellas de 250 nm se calientan más, a bajas potencias del laser (40 mW). Utilizando la ecuación 2 se puede calcular  $C_{\text{abs}} = 13763 \text{ nm}^2$  que es 14 y 2.5 veces mayor que los valores para las nanoestrellas de oro de 120 nm y las nanocapas,<sup>[177]</sup> respectivamente, debido a la mayor absorción de las nanoestrellas de 250 nm a 1064 nm (**Figura 3**). Este resultado esta en correspondencia con el hecho reportado en trabajos previos relacionado con la elevada eficiencia de la conversión energética de las AuNSts.<sup>[22,24,41,71]</sup> Sin embargo, para potencias mayores de 40 mW el incremento de temperatura en la superficie de las nanopartículas se mantiene constante. Este incremento de temperatura está en correspondencia con la temperatura de fusión del PVP. Por lo tanto, el plateau en la curva de  $\Delta T_S$  vs  $P$  indica probablemente la fusión del recubrimiento polimérico (**Figura 5**).



**Figura 5.** Cuantificación de la temperatura superficial de la AuNSt de 250 nm recubierta con PVP. a) Los círculos muestran las mediciones experimentales del radio del área de la bicapa fundida alrededor de la partícula irradiada a diferentes potencias del láser. b) Incrementos de temperatura en la superficie de la partícula irradiada en función de la potencia del láser. Los paneles superiores muestran las imágenes confocales correspondientes al área fundida para cada potencia del láser. Las barras de escala miden 10  $\mu\text{m}$ . Las barras de error muestran la desviación estándar de las mediciones realizadas para 10 partículas diferentes y la línea discontinua representa el ajuste lineal a los datos experimentales para  $P < 40$  mW.

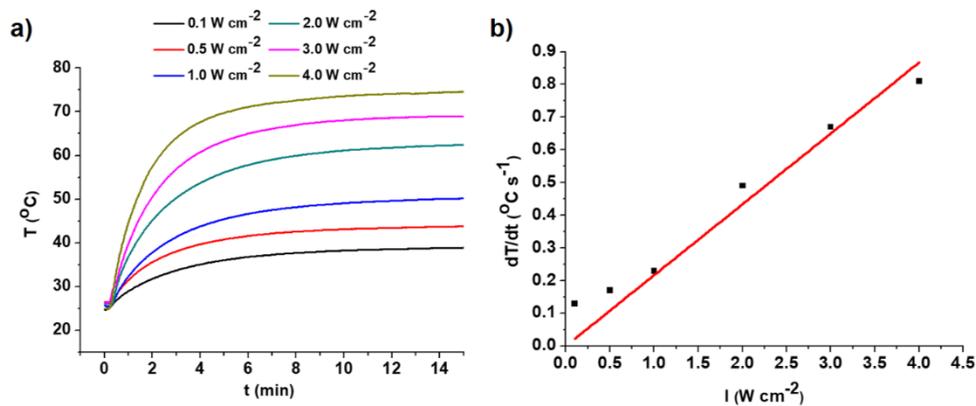
La capacidad de calentamiento macroscópico de las nanopartículas se evaluó irradiando las suspensiones acuosas de las AuNSts de 120 nm sin recubrimiento con un láser de 808 nm y midiendo la temperatura de la suspensión con un sensor de fibra óptica. Ambos equipos fueron diseñados en nuestro instituto. En la **Figura 6a** se muestra los valores de la temperatura de la suspensión de  $c = 5.7 \cdot 10^9$  nanopartículas  $\text{mL}^{-1}$  durante 15 min de irradiación a diferentes densidades de potencias del láser. A  $4 \text{ W cm}^{-2}$  la temperatura se incrementa rápidamente y alcanza los  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tanto la velocidad inicial de incremento de temperatura (pendiente inicial de la recta tangente a la curva de  $T$  vs  $t$ ,  $\frac{dT}{dt}$ ) como la máxima temperatura alcanzada, disminuyen al disminuir la densidad de potencia del láser. Además, la relación entre  $\frac{dT}{dt}$  y la densidad de potencia,  $I$ , es lineal (**Figura 6b**). La sección transversal de

absorción de las nanopartículas se puede calcular a partir de los datos experimentales y utilizando las ecuaciones 3 y 4:<sup>[13, 188]</sup>

$$SAR = C_s \cdot \rho_s \cdot \frac{dT}{dt} \quad (3)$$

$$SAR = \frac{N \cdot C_{abs} \cdot I}{V} \quad (4)$$

Donde,  $SAR$  representa la velocidad de absorción específica por unidad de volumen mientras que  $C_s$  y  $\rho_s$  representan el calor específico y la densidad de la suspensión, respectivamente.  $N$  es el número de nanopartículas y  $V$  es el volumen de la suspensión. Utilizando estas ecuaciones se determinó  $C_{abs} = 16000 \text{ nm}^2$ , valor superior a los reportados para otras nanopartículas anisótropas de oro a 808 nm, lo que también demuestra la mayor eficiencia de las nanoestrellas para la conversión fototérmica durante la irradiación con un láser a la longitud de onda de la LSPR.

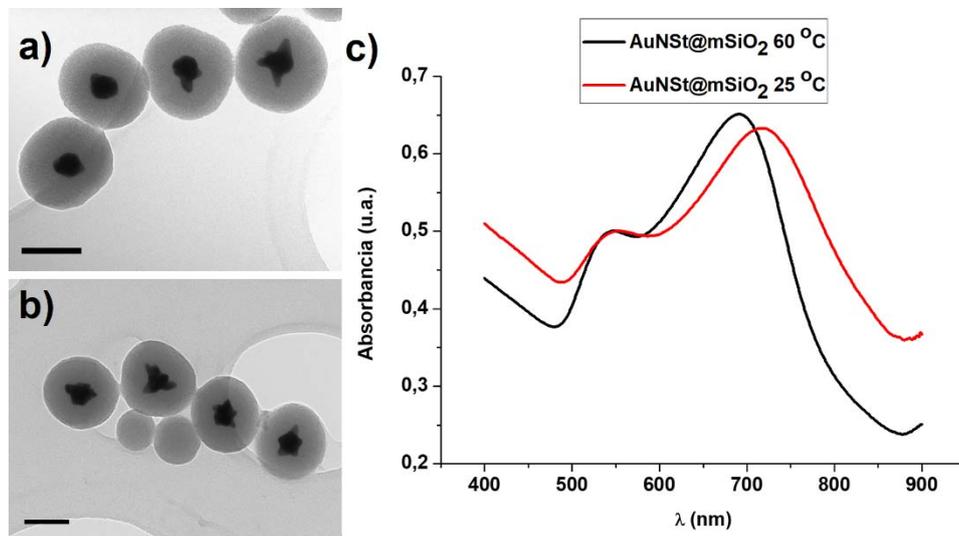


**Figura 6.** Variación de la temperatura de la suspensión de AuNSts de 120 nm durante la irradiación a 808 nm (a) y velocidad inicial de calentamiento de la suspensión (b) a diferentes densidades de potencia del láser.

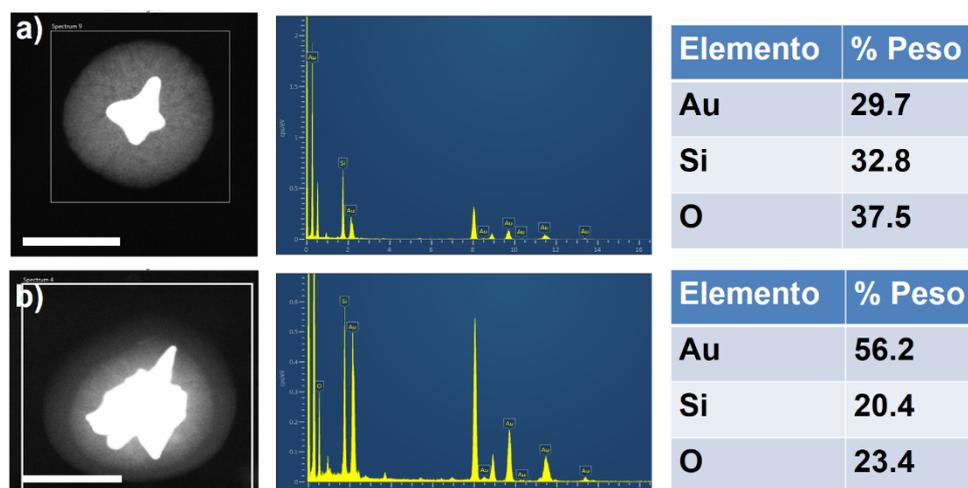
#### *Recubrimiento de las AuNSts con la capa mesoporosa de sílice*

Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> se sintetizan mediante el recubrimiento directo de las AuNSts de 120 nm con una capa de sílice mesoporosa. El método de síntesis se basa en la hidrólisis y condensación del tetraetoxisilano en presencia de

un surfactante que actúa como plantilla y de las nanopartículas de oro que actúan como centros de nucleación para el crecimiento de la capa mesoporosa.<sup>[121, 139, 189]</sup> La formación de la capa mesoporosa sobre las AuNSts tiene lugar en 4 etapas: 1- la adsorción del surfactante catiónico (CTAB) sobre la superficie de las nanopartículas de oro; 2- la hidrólisis del TEOS; 3- la consiguiente condensación del monómero de sílice para producir oligómeros; y 4- la deposición de los oligómeros de sílice sobre la superficie de las micelas que conducen al crecimiento controlado de la capa de sílice sobre las AuNSts. El proceso de recubrimiento de las AuNSts con la capa mesoporosa de sílice es uno de los más críticos para la preparación del sistema de fotoliberación, debido a que se produce un cambio en la morfología de las AuNSts por la oxidación del oro de las puntas en presencia del CTAB,<sup>[96-97, 114, 190-193]</sup> produciéndose una disminución de la absorción de las nanopartículas resultantes a 808 nm y de la eficiencia de la conversión energética (**Figura 7 y 8**).<sup>[178]</sup>



**Figure 7.** Imágenes de TEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> obtenidas mediante el recubrimiento directo de las AuNSts con la capa mesoporosa de sílice a 60 °C (a) y 25 °C sin emplear atmósfera inerte (b); barras de escala: 100 nm. Espectros de absorción correspondientes a las suspensiones acuosas de las nanopartículas (c).

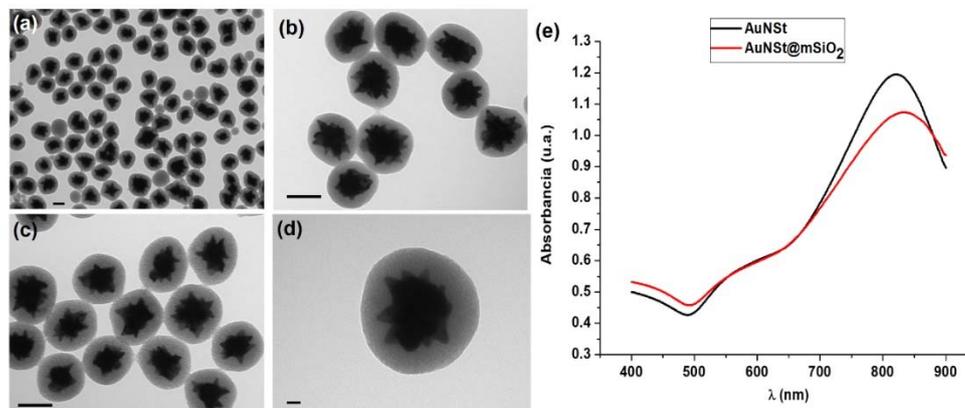


**Figura 8.** Análisis de EDXS a partir de las imágenes de STEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> obtenidas a 25 °C sin emplear (a) y empleando atmósfera inerte (b). Barras de escala: 100 nm.

En la síntesis se identificaron 5 parámetros cruciales para obtener nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> con una capa mesoporosa de sílice adecuada, en términos de tamaño y organización de los poros, minimizando también la oxidación del núcleo de oro:<sup>[14, 171, 194]</sup> 1- la reacción se llevó a cabo a 25 °C; 2- se utilizó como medio de reacción una mezcla de agua y etanol para lograr una velocidad de hidrólisis más controlada; 3- el medio de reacción se purgó con Ar para eliminar el dióxígeno y la reacción se llevó a cabo en atmósfera de Ar, 4- se utilizó amoníaco como catalizador básico en lugar de otras bases fuertes; 5- la relación molar CTAB/TEOS se ajustó en el intervalo de 1.8-2.5 y la concentración de AuNSts se fijó alrededor de  $7-14 \cdot 10^{-12}$  M ( $c(\text{Au})=1-2 \cdot 10^{-4}$  M).<sup>[128, 133, 140-141, 195]</sup>

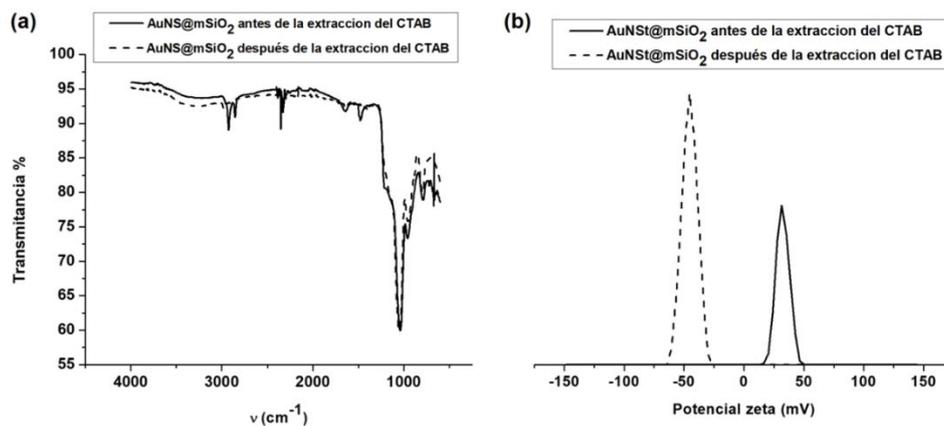
En la **Figura 9** se muestran las imágenes de TEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> obtenidas con diámetros que pueden variar entre 150-200 nm. El espesor de la capa de sílice puede controlarse ajustando la cantidad de TEOS en la mezcla de reacción. La capa de sílice en las nanopartículas híbridas tiene un espesor adecuado para lograr un incremento de temperatura en la superficie de la

nanopartícula suficiente para que se produzca la fusión de la parafina unida a la superficie al irradiar las partículas con el láser. El espectro de absorción de la suspensión acuosa de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> muestra que la banda LSPR asociada con los electrones de las puntas se desplaza ligeramente a mayores longitudes de onda debido a que la capa de sílice modifica el índice de refracción superficial (**Figura 9e**).<sup>[19, 168, 180, 196-198]</sup>



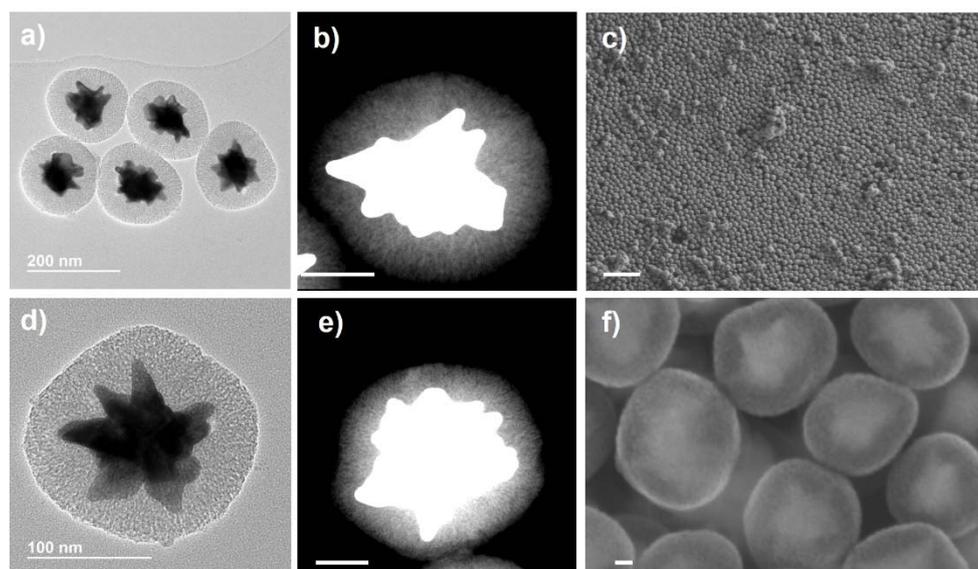
**Figura 9.** Imágenes de TEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> obtenidas utilizando las condiciones óptimas de síntesis. Barras de escala: 100 nm (a,b,c); 20 nm (d). Espectros de absorción de las AuNSts y AuNSt@mSiO<sub>2</sub> (e).

Las moléculas de surfactantes en las nanopartículas se eliminan completamente utilizando un proceso de extracción por intercambio iónico con una disolución de nitrato de amonio en etanol.<sup>[5, 14]</sup> La eliminación del CTAB de las nanopartículas se monitorizó por espectroscopía FTIR y mediciones del potencial zeta por DLS (**Figura 10**). Las bandas de absorción características del CTAB a 2923, 2853 ( $\nu_{C-H}$ , vibración de valencia) y 1478  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{C-H}$ , vibración de doblaje) no están presentes en el espectro de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> después del proceso de extracción. La variación del potencial zeta de las nanopartículas desde +32.5 mV a -45.3 mV, también confirmó la eliminación del CTAB.



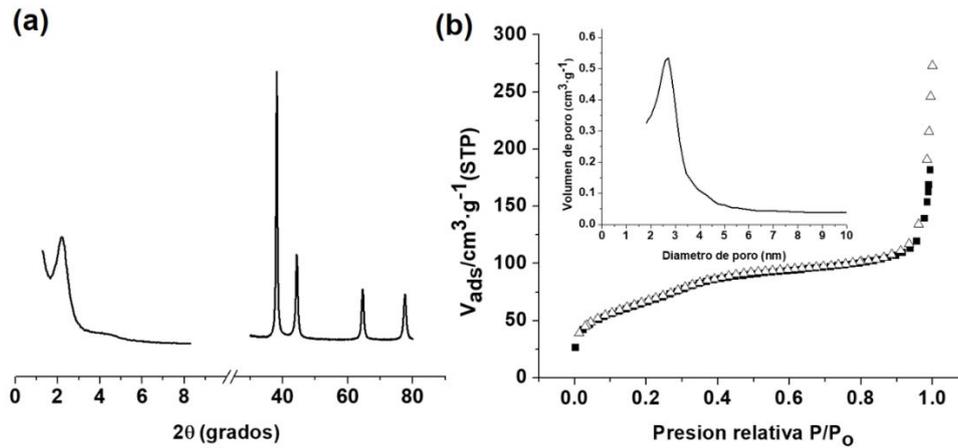
**Figura 10.** Espectros FT-IR (a) y distribuciones del potencial zeta por DLS (b) de las nanopartículas AuNS@mSiO<sub>2</sub> antes y después del proceso de extracción del CTAB.

Se llevó a cabo un análisis detallado de la morfología de las nanopartículas utilizando la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), de transmisión y barrido de campo oscuro (DF-STEM) y de barrido de emisión de campo (FE-SEM).<sup>[199]</sup> Las nanopartículas AuNS@mSiO<sub>2</sub> poseen un núcleo de oro multi-ramificado recubierto de una capa mesoporosa de sílice con poros que se extienden radialmente (**Figura 11**). La geometría de los canales mesoporosos de la capa de sílice es un parámetro importante que puede determinar la eficiencia del encapsulado del fármaco y el perfil de su liberación ya que influye sobre el proceso de difusión de las moléculas dentro de los canales mesoporosos.



**Figura 11.** Imágenes de HR-TEM (a,d), DF-STEM (b,e) and FE-SEM (c,f) de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. Barras de escala: 50 nm (b,e), 1 μm (c), 20 nm (f).

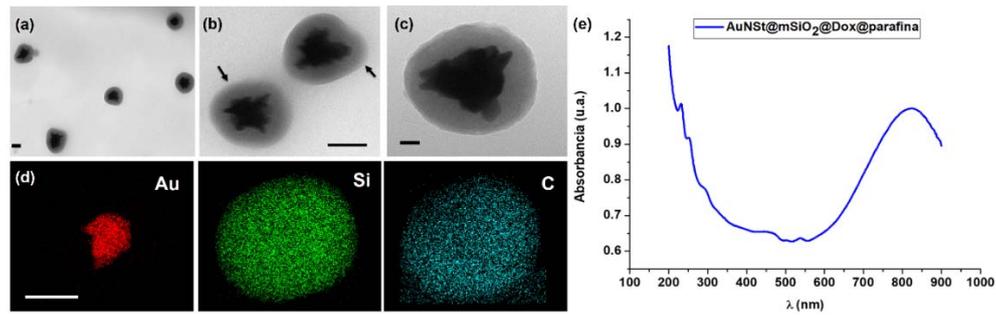
El patrón de difracción de rayos X en polvo a ángulos bajos muestra un máximo a  $2\theta = 2.20^\circ$  que puede indexarse al plano de difracción (100) de la celda unidad hexagonal.<sup>[141]</sup> Este máximo también sugiere la presencia de canales mesoporosos radiales y una mesoestructura ordenada.<sup>[124]</sup> En el patrón de difracción a ángulos altos se observan 4 máximos a  $2\theta = 38.16, 44.35, 64.60$  and  $77.61^\circ$ , que se indexan a los planos de difracción (111), (200), (220), and (311), respectivamente, del retículo cúbico centrado en las caras del Au (**Figura 12a**).<sup>[200]</sup> Además, se obtuvieron las isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de las nanopartículas que muestran la forma tipo IV, típica de materiales mesoporosos.<sup>[201]</sup> A partir de estas isotermas se determinó el área superficial BET, el tamaño promedio de los poros y el volumen específico cuyos valores son  $241 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ,  $2.6 \text{ nm}$  y  $0.25 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente (**Figura 12b**).<sup>[5, 161, 200]</sup>



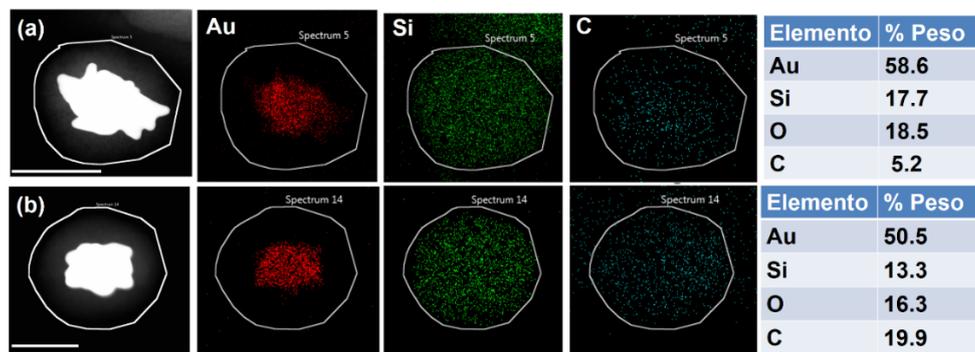
**Figura 12.** Patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) (a) e isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  (b) de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> (Recuadro: Distribución del tamaño de poros).

*Encapsulado del fármaco y funcionalización de la superficie externa con parafina*

Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> se cargaron con doxorrubicina, un fármaco anticancerígeno que puede detectarse fácilmente por espectroscopía de absorción ( $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ ) y de fluorescencia ( $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ). Luego, la superficie externa de las nanopartículas cargadas con doxorrubicina se funcionalizó con octadeciltrimetoxisilano (ODTMS) y finalmente se recubrió con heneicosano.<sup>[202]</sup> La superficie se funcionaliza con el ODTMS para facilitar el recubrimiento posterior con las moléculas de parafina que interactúan por fuerzas de van der Waals con las cadenas hidrocarbonadas unidas a la superficie. El recubrimiento de parafina forma una capa hidrófoba que bloquea los poros y evita las pérdidas de la doxorrubicina encapsulada. Los procesos de encapsulado del fármaco y de funcionalización superficial de las nanopartículas se optimizaron para obtener el sistema de fotoliberación final con propiedades ópticas adecuadas. La concentración de doxorrubicina y el tiempo de encapsulado y funcionalización superficial se ajustaron a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 12 h, respectivamente, para obtener nanopartículas con una banda LSPR centrada en 808 nm (**Figura 13 y 14**).



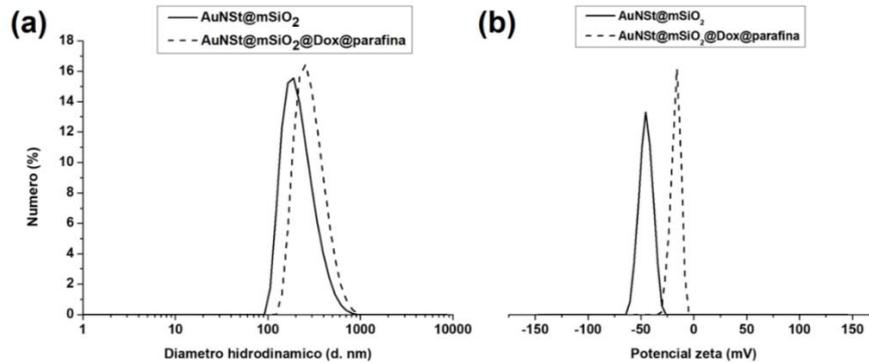
**Figura 13.** Imágenes de TEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina. Las flechas en (b) indican la capa de parafina formada sobre las nanopartículas. Análisis elemental por EDXS del Au, Si y C (d); barras de escala: 100 nm (a,b,d), 20 nm (c). Espectro de absorción de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina (e).



**Figura 14.** Análisis elemental de EDXS del Au, Si y C a partir de las imágenes de STEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> (a) y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina (b); barras de escala: 100 nm.

Se realizaron mediciones del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta de las nanopartículas por DLS que confirman la presencia de la parafina alrededor de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. El diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas se incrementa desde 228 hasta 300 nm después del proceso de encapsulado del fármaco y de recubrimiento con la parafina; mientras que, el potencial zeta varió desde -45.3 a -17.0 mV debido a la presencia del fármaco catiónico en el interior de los poros y de la funcionalización parcial de los grupos

silanos de la superficie externa con el ODTMS (**Figura 15**). Además, se determinó la fracción de materia orgánica total en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina por análisis termogravimétrico y la fracción de doxorubicina encapsulada por espectrofotometría, obteniéndose valores de 25 y 2.4 %, respectivamente.



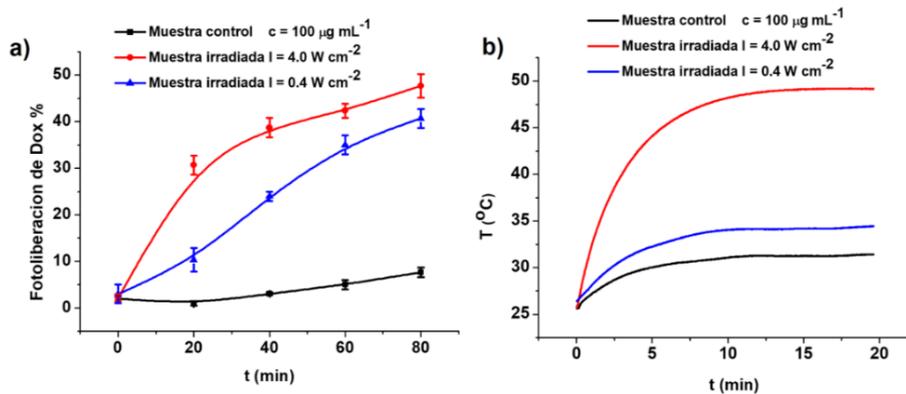
**Figura 15.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico (a) y del potencial zeta (b) de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina.

### *Experimentos de fotoliberación in vitro de doxorubicina*

Las suspensiones acuosas de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina se irradiaron con el láser de 808 nm desarrollado en el instituto de investigación IDM,<sup>[188]</sup> cuya longitud de onda coincide con la banda LSPR de las nanopartículas. La fotoliberación acumulativa de doxorubicina se determinó utilizando la espectroscopia de fluorescencia. Las nanopartículas muestran un perfil de liberación de doxorubicina bien definido (**Figura 16**). Alrededor de un 30 % de la doxorubicina encapsulada se liberó después de 20 minutos de irradiación con una densidad de potencia de 4 W cm<sup>-2</sup>, mientras que la muestra control no mostró una liberación apreciable de doxorubicina, corroborando la capacidad de la parafina para cerrar los poros y evitar la difusión de la doxorubicina y la eficiencia de la conversión fototérmica de las AuNSts. Utilizando estas condiciones experimentales, se observó un claro calentamiento de la suspensión de las nanopartículas durante la

irradiación. De hecho, la temperatura de la suspensión se incrementa hasta 49 °C después de 20 min de irradiación, mientras que la temperatura de la suspensión que no se irradió aumenta hasta 30 °C. El incremento de la temperatura por encima del punto de fusión de la parafina ( $T_m = 39$  °C) provoca la apertura de los poros y la difusión del fármaco desde el interior de los poros. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para sistemas de fotoliberación basados en otras nanopartículas plasmónicas de oro (nanovarillas y nanojaulas) recubiertas con una capa de sílice mesoporosa y funcionalizadas con diferentes puertas moleculares termosensibles (oligonucleótidos, polímeros, válvulas supramoleculares y materiales que cambian de fase).<sup>[5, 14, 161-165]</sup>

El perfil de calentamiento inducido por la radiación NIR y consecuentemente la liberación de la doxorrubicina pueden modularse empleando diferentes densidades de potencias del láser. Por ejemplo, el incremento de temperatura del medio después de 20 minutos de irradiación es menor al disminuir la densidad de potencia del láser (24 °C a 4 W cm<sup>-2</sup> y 8 °C a 0.4 W cm<sup>-2</sup>). Es importante destacar, que es posible inducir la fotoliberación de doxorrubicina, incluso cuando se utilizan densidades de potencias bajas que sólo provocan un ligero incremento de la temperatura de la suspensión.



**Figura 16.** Perfil de fotoliberación de doxorrubicina utilizando las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina (a) y variación de la temperatura de la suspensión de las nanopartículas durante la irradiación NIR (b) a diferentes densidades de potencia del láser.

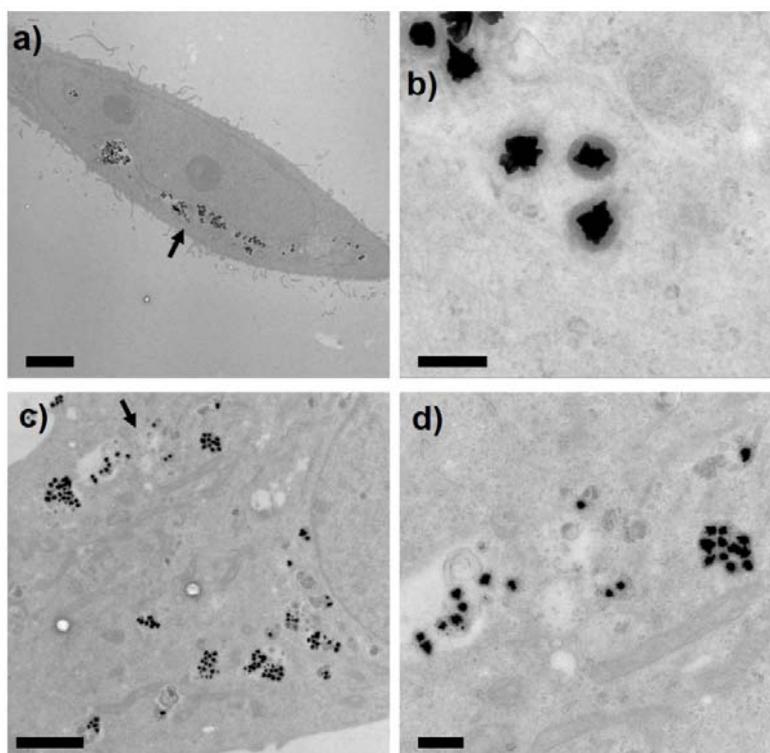
Este resultado sugiere que se debe producir un incremento de temperatura mayor en la superficie de las nanopartículas debido a la elevada eficiencia de la conversión fototérmica de las AuNSTs que provoca la fusión de la parafina y la liberación del fármaco. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en la medición del perfil de temperatura alrededor de una AuNST individual que demuestra que la temperatura superficial de la partícula se incrementa por encima del punto de fusión de la parafina incluso utilizando bajas potencias. Este resultado corrobora el hecho de que se produzca la fotoliberación de la doxorubicina cuando se utilizan bajas densidades de potencia, aunque la temperatura de la suspensión no se incrementa por encima del punto de fusión de la parafina.

### *Fotoliberación de doxorubicina en células.*

Se realizaron experimentos de fotoliberación de doxorubicina en células HeLa con el objetivo de evaluar la aplicación potencial de las nanopartículas en la terapia del cáncer. La interacción de las nanopartículas con las células se evaluó monitoreando la internalización celular de las nanopartículas por TEM (**Figura 17**). En las imágenes se puede observar que las nanopartículas se internalizan en las células eficientemente después de la incubación de las células con la suspensión de las nanopartículas en DMEM.

Las células se incubaron con las nanopartículas a diferentes concentraciones, luego se irradiaron a una densidad de potencia de  $4 \text{ W cm}^{-2}$  por 15 min y finalmente se incubaron por 24 y 48 horas. La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo WST-1 después del período de incubación (**Figura 18a**). Las nanopartículas no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, incluso a concentraciones altas y tiempos de incubación elevados, corroborando que la doxorubicina se encapsuló eficientemente dentro de la capa mesoporosa debido a que la parafina asociada a la superficie externa de las nanopartículas evita la pérdida del fármaco. Sin embargo, la viabilidad celular disminuye al irradiar las nanopartículas con el láser de 808 nm. Este efecto se acentúa al aumentar la concentración de nanopartículas y el tiempo de incubación. En este caso se produce la liberación de doxorubicina debido a que la irradiación NIR produce un incremento de la temperatura en la superficie de las

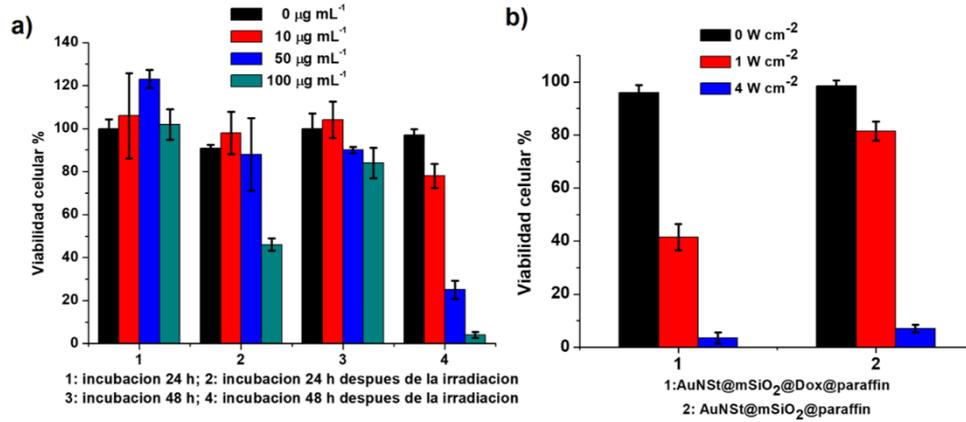
nanopartículas que provoca la fusión de la parafina. Se produce la liberación de una mayor cantidad de doxorubicina y por consiguiente una disminución de la viabilidad celular al utilizar mayores concentraciones de nanopartículas y tiempos de incubación.



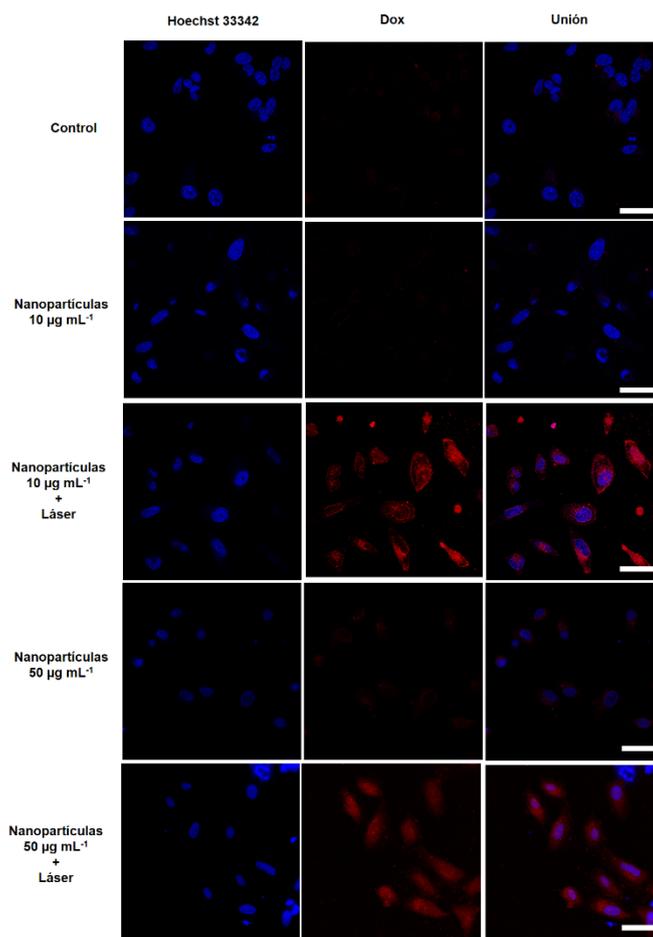
**Figura 17.** Imágenes de TEM de las células HeLa después de la incubación con las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina. Barras de escala: 5 μm (a), 2 μm (c), 500 nm (d), 200 nm (b).

Para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular tanto de la hipertermia como de la doxorubicina fotoliberada, se incubaron las células con las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina y con las nanopartículas sin el fármaco (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@parafina). Las células se irradiaron a diferentes densidades de potencia del láser y luego se incubaron por 48 h antes de medir la viabilidad celular. Se evidenció una diferencia significativa entre la eficiencia de ambas nanopartículas

para inducir la muerte celular después de la irradiación NIR a  $1 \text{ W cm}^{-2}$  (Figura 18b). La viabilidad de las células tratadas con las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@parafina disminuye después de la irradiación debido al efecto de la hipertermia siendo más acentuado a mayores densidades de potencia del láser. La disminución adicional de la viabilidad de las células tratadas con las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina después de la irradiación a  $1 \text{ W cm}^{-2}$  se debe al efecto de la fotoliberación de la doxorubicina que permite la combinación sinérgica de la hipertermia y la quimioterapia.



**Figura 18.** Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina a diferentes concentraciones y tiempos de incubación después de la irradiación con el láser a 808 nm a  $4 \text{ W cm}^{-2}$  por 15 min (a). Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@parafina después de la irradiación con el láser a 808 nm por 15 min a diferentes densidades de potencia del láser (b).



**Figura 19.** Fotoliberación de Dox activada por radiación NIR desde las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina en las células HeLa empleando la microscopía de barrido láser confocal. De izquierda a derecha: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De arriba a abajo: células control (Control), células no irradiadas después de la incubación con las nanopartículas a 10 µg mL<sup>-1</sup> (nanopartículas 10 µg mL<sup>-1</sup>), células irradiadas después de la incubación con las nanopartículas a 10 µg mL<sup>-1</sup> (Nanopartículas 10 µg mL<sup>-1</sup> + Láser), células no irradiadas después de la incubación con las nanopartículas a 50 µg mL<sup>-1</sup> (Nanopartículas 50 µg mL<sup>-1</sup>), células irradiadas después de la incubación con las nanopartículas a 50 µg mL<sup>-1</sup> (Nanopartículas 50 µg mL<sup>-1</sup> + Láser). Barras de escala: 50 µm.

También, se realizó un experimento de fotoliberación de doxorubicina en las células HeLa, utilizando la microscopía de barrido láser confocal. Las células se incubaron durante 2 h con las nanopartículas AuNst@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina a concentraciones de 10 y 50 µg mL<sup>-1</sup>, luego se irradiaron con un láser de 808 nm a 4 W cm<sup>-2</sup> por 10 min y se incubaron por 2 h. Los núcleos de las células se marcan con el fluoróforo Hoechst 33342 que se asocia específicamente al ADN y la fotoliberación intracelular de la doxorubicina después de la irradiación se monitorea midiendo las señales de fluorescencia de ambos fluoróforos en el microscopio confocal. En la **Figura 19** no se aprecia una señal significativa de fluorescencia de la doxorubicina en las muestras no irradiadas, sin embargo, si se evidencia un incremento de la fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación, siendo más acentuado cuando se utiliza una mayor concentración de nanopartículas. Estos resultados corroboran la liberación de la doxorubicina activada por la irradiación NIR de las nanopartículas híbridas en las células, que provoca la disminución de la viabilidad celular, confirmando los resultados reportados anteriormente.

Estos resultados demuestran que las nanopartículas AuNst@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina son excelentes plataformas para la liberación de doxorubicina inducida por la radiación NIR en la terapia del cáncer. El proceso de recubrimiento de las AuNSts con la capa mesoporosa de sílice constituye un gran reto debido a que las AuNSts se pueden oxidar en presencia del CTAB, lo cual requiere un estricto control de los parámetros de la síntesis. No obstante, el método empleado en este trabajo permite obtener estas nanopartículas con propiedades ópticas adecuadas para aplicaciones de fotoliberación de fármacos inducida por radiaciones NIR.

### 1.3 Conclusiones

En resumen, hemos descrito la preparación de un sistema de fotoliberación de fármacos basado en AuNSts recubiertas de una capa mesoporosa de sílice y funcionalizadas con moléculas de parafinas que actúan como puertas moleculares termosensibles. La temperatura alrededor de una AuNSt individual irradiada sobre una bicapa lipídica puede incrementarse por encima del punto de fusión de la

---

parafina incluso a potencias del láser relativamente bajas. Las AuNSts se recubrieron con una capa mesoporosa de sílice utilizando un método que emplea el surfactante CTAB como plantilla para el crecimiento de la capa mesoporosa a 25 °C. Se evaluaron diferentes condiciones de síntesis incluyendo la relación molar CTAB/TEOS, la temperatura y la atmósfera inerte con el objetivo de preparar finalmente las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> con un mínimo cambio en la morfología del núcleo de oro y en sus propiedades ópticas. Estas nanopartículas se cargaron con doxorubicina y se modificó su superficie externa con ODTMS y heneicosano. Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina no mostraron pérdidas apreciables de la carga en suspensiones acuosas, mientras que se observó una liberación significativa de doxorubicina después de la irradiación NIR incluso utilizando bajas densidades de potencia. Estas nanopartículas no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa hasta que se irradiaron con el láser de 808 nm que provoca la fusión de la parafina asociada a la superficie externa y la liberación de la doxorubicina desde el interior de los poros. Creemos que el método utilizado en este trabajo para la preparación de las nanopartículas híbridas puede ser utilizado para la síntesis de otros sistemas de fotoliberación con pérdidas mínimas del fármaco encapsulado y que requieren bajas densidades de potencia para la activación de la liberación, dos características necesarias para su implementación en la terapia del cáncer.

### **Capítulo 2. Fotoactivación con radiaciones NIR de profármacos de la doxorrubicina por disociación molecular multifotónica de un espaciador 2-nitrobencílico utilizando nanoestrellas de oro**

En este trabajo se describe un nuevo mecanismo para la fotoactivación de dos profármacos de la doxorrubicina basado en la disociación molecular multifotónica estimulada por las radiaciones NIR de un espaciador 2-nitrobencílico en presencia de las AuNSts. En este sentido, se sintetizó uno de los profármacos mediante la modificación de la doxorrubicina con el alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico a través de un enlace carbamato. La irradiación de esta molécula fotolábil con un láser de 808 nm en presencia de las AuNSts produce la fotorruptura del espaciador 2-nitrobencílico mediante la absorción multifotónica que provoca finalmente la formación del fármaco libre. Este proceso foto-redox se produce, aunque las moléculas fotolábiles no están unidas directamente a la superficie de las nanopartículas de oro. También se sintetizó otro profármaco modificando la doxorrubicina con un alcohol 2-nitrobencílico que posee un grupo disulfuro, lo que permite asociarlo a la superficie de las AuNSts. Las nanopartículas funcionalizadas con este profármaco se irradiaron con un láser NIR produciéndose también la disociación molecular multifotónica del espaciador 2-nitrobencílico y la liberación de la doxorrubicina. Ambos profármacos mostraron una citotoxicidad hacia las células HeLa dos órdenes de magnitud menor que la de la doxorrubicina. La viabilidad celular disminuye cuando las células se co-incubaron con los profármacos y las AuNSts y luego se irradiaron con un laser de 808 nm, que provoca la fotodisociación de ambos profármacos y la liberación de la doxorrubicina. El adecuado funcionamiento de estos materiales híbridos se basa en el empleo de las AuNSts, cuya resonancia plasmónica puede excitarse en la región NIR, lo que provoca una fuerte intensificación del campo electromagnético en la superficie de las nanopartículas que favorece la absorción multifotónica y la fotorruptura de los profármacos de la doxorrubicina durante la irradiación, produciendo finalmente la liberación del fármaco.

### 2.1. Introducción

Las moléculas fotolábiles se han utilizado recientemente para la activación remota y la liberación de fármacos asociados a diferentes nanomateriales.<sup>[27, 203-204]</sup> Las radiaciones utilizadas para la fotorruptura de las moléculas poseen una elevada energía lo que constituye una limitación para aplicaciones clínicas.<sup>[205]</sup> La absorción multifotónica constituye una alternativa interesante para utilizar radiaciones NIR en aplicaciones biológicas debido a que poseen una mayor penetración en los tejidos y no provocan daños sobre estos. Aunque se ha reportado el empleo de la absorción bifotónica de la radiación NIR en materiales poliméricos,<sup>[206]</sup> las foto-reacciones activadas por este proceso son muy lentas debido a que los cromóforos poseen bajas secciones transversales de absorción multifotónica. Debido a que la probabilidad de excitación para la absorción de dos fotones se incrementa cuadráticamente con la potencia de irradiación, el empleo de la intensificación del campo eléctrico producido por la oscilación cuantizada de los electrones de conducción en nanopartículas metálicas, permite superar la limitación asociada a las elevadas potencias requeridas para producir la absorción multifotónica en moléculas orgánicas.<sup>[207]</sup> En este sentido la excitación multifotónica del anillo 1,2,3-triazólico producida por la intensificación del campo electromagnético en nanopartículas de oro de 30 nm,<sup>[208]</sup> se ha utilizado para la fotoliberación de doxorrubicina en células a bajas potencias de irradiación.<sup>[209]</sup> Teniendo en cuenta los aspectos descritos anteriormente, es posible diseñar un sistema de fotoliberación de doxorrubicina activado por la irradiación NIR utilizando nanoestrellas de oro y moléculas fotolábiles que absorben la radiación en el intervalo 300-400 nm. Entre estas moléculas, los derivados 2-nitrobenzílicos se han utilizado ampliamente como grupos protectores fotosensibles de funciones amino, carboxilo y fosfato, en la síntesis de péptidos,<sup>[210-211]</sup> carbohidratos,<sup>[212]</sup> y oligonucleótidos<sup>[213]</sup> y en la modificación<sup>[214-215]</sup> y aislamiento<sup>[216]</sup> de proteínas, debido a que son estables a una gran variedad de tratamientos químicos y se descomponen rápidamente por irradiación a 365 nm. Los compuestos nitroaromáticos que poseen hidrógenos benzílicos en posición orto al grupo nitro son fotosensibles debido a que, después de la irradiación se produce una transferencia de hidrógeno desde el residuo benzílico

---

que provoca la ruptura del enlace que genera la molécula de interés.<sup>[217-218]</sup> Sin embargo, estas moléculas fotosensibles no han atraído una considerable atención en aplicaciones basadas en la excitación bifotónica debido a que poseen una pequeña sección transversal de absorción bifotónica.<sup>[219-220]</sup> Por otro lado, la doxorubicina se ha utilizado extensamente en el tratamiento de diferentes cánceres en humanos debido a que es uno de los agentes quimioterapéuticos más potentes. Sin embargo, su aplicación clínica está limitada por sus efectos secundarios nocivos<sup>[209]</sup> y porque posee un tiempo de circulación corto en el cuerpo lo que produce el efecto de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en las células tumorales.<sup>[221]</sup> Una alternativa para reducir la toxicidad y superar el efecto MDR, consiste en sintetizar profármacos mediante la modificación química de la estructura, que pueden ser transformados en la especie farmacológicamente activa de forma específica dentro de las células tumorales.<sup>[205, 222]</sup> Se ha demostrado que la modificación del grupo amino en el anillo sacarídico a través de enlaces amida<sup>[223]</sup> o carbamato,<sup>[224-225]</sup> reduce la toxicidad de las moléculas resultantes en comparación con la doxorubicina libre.<sup>[226]</sup>

Se ha descrito que la excitación de la resonancia plasmónica superficial localizada de las AuNSts en la región NIR produce una fuerte intensificación del campo electromagnético en sus puntas agudas<sup>[41]</sup> que puede favorecer la absorción multifotónica en las moléculas cercanas a la superficie de la nanopartícula. Sin embargo, las AuNSts no se han utilizado con este propósito. En este trabajo se describe un mecanismo de fotoactivación de dos profármacos de la doxorubicina que se basa en la disociación multifotónica activada por la radiación NIR de un espaciador 2-nitrobencílico utilizando AuNSts.

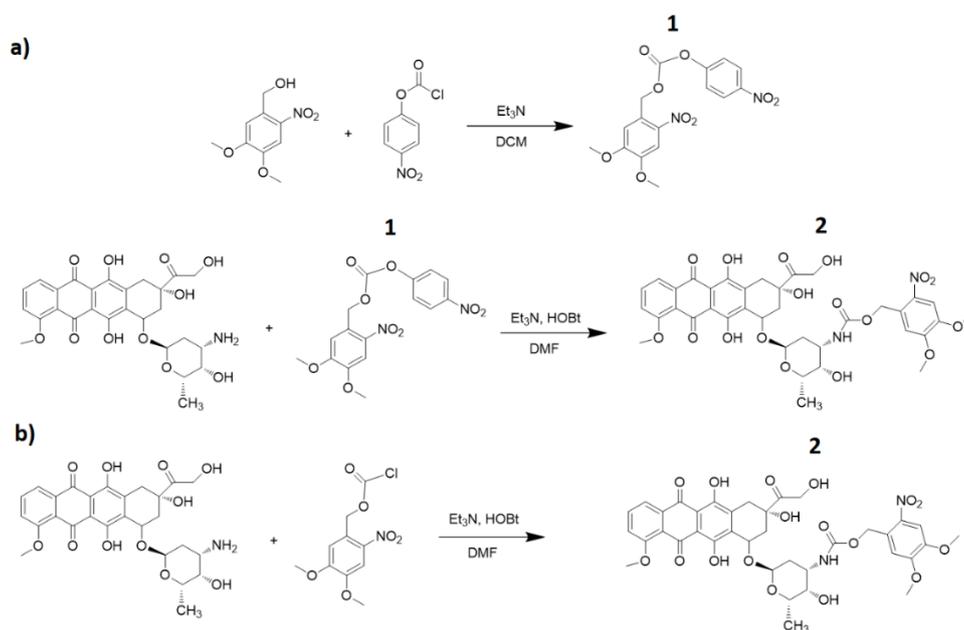
### 2.2. Resultados y Discusión

#### *Fotoactivación del profármaco de doxorubicina 2*

Uno de los profármacos se obtiene en dos etapas de síntesis, modificando la doxorubicina con el alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico a través de un enlace carbamato (**Figura 1a**) siguiendo un procedimiento similar a los reportados en la literatura.<sup>[222]</sup> El alcohol primario se activa utilizando el cloroformiato de 4-nitrofenilo produciendo el carbonato **1**, que se acopla luego con la doxorubicina

---

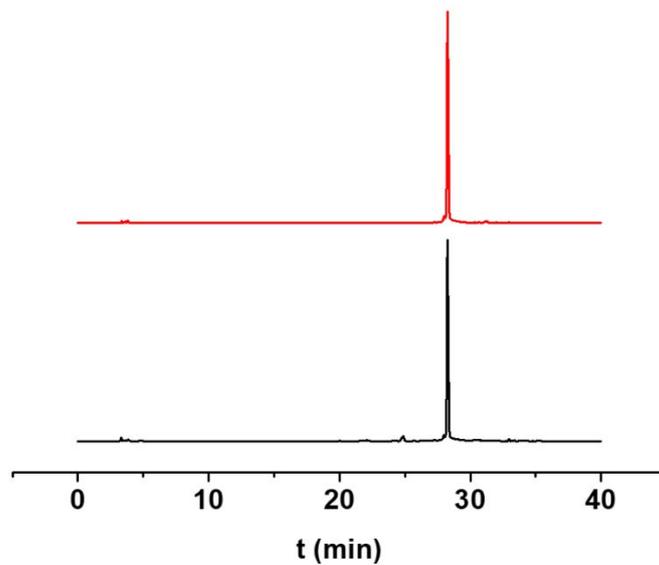
para formar el profármaco **2**. Este profármaco también se sintetiza utilizando un procedimiento de una etapa a partir del cloroformiato de 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo (**Figura 1b**).



**Figura 1.** Síntesis del profármaco **2** a partir del alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico (a) y del cloroformiato de 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo (b).

El compuesto **2** se caracterizó por HPLC, TLC, espectroscopía UV-Visible, RMN y espectrometría de masas, confirmándose su estructura química y su pureza. En el cromatograma se aprecia una única señal a un tiempo de elución de 28.5 min (**Figura 2**). En el espectro de masas se muestran tres señales a una relación  $m/z$  de 800.2478, 805.2028 y 821.1771 Da, correspondientes a los aductos formados entre el ión molecular con los iones  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , respectivamente (**Figura 3**). El compuesto posee dos bandas características en el espectro UV-Vis centradas en 350 nm y 475 nm correspondientes a las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  de los cromóforos del grupo 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo y de la doxorubicina, respectivamente (**Figura 4**). Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en los espectros de RMN se asignaron a la estructura química del profármaco utilizando los experimentos multipulsos y

bidimensionales tales como: DEPT-135, COSY, HSQC y HMBC (Materiales y Métodos).



**Figura 2.** Análisis por HPLC del compuesto **2** sintetizado a partir del alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobenílico (línea negra) y del cloroformiato de 4,5-dimetoxi-2-nitrobenilo (línea roja).

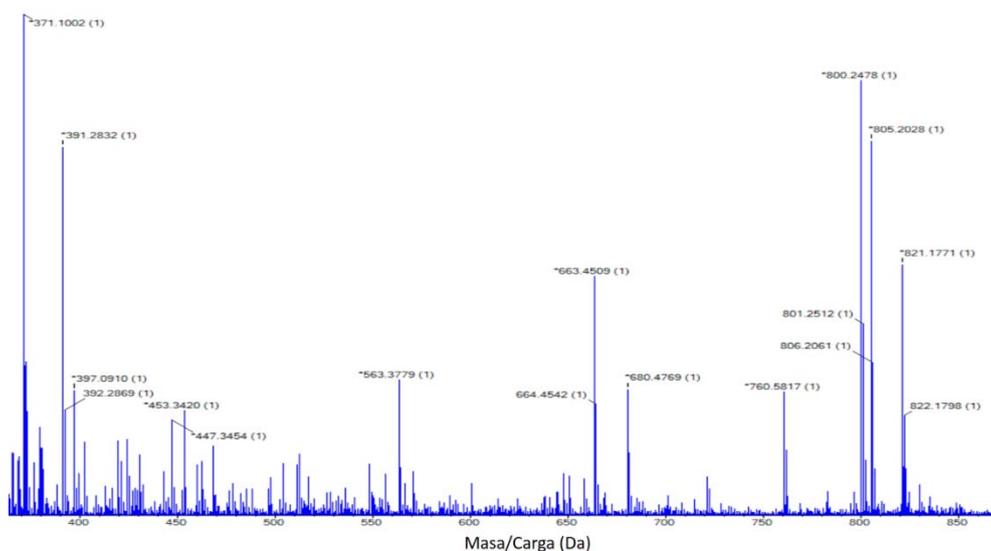


Figura 3. Espectro de masas ESI-TOF del compuesto 2

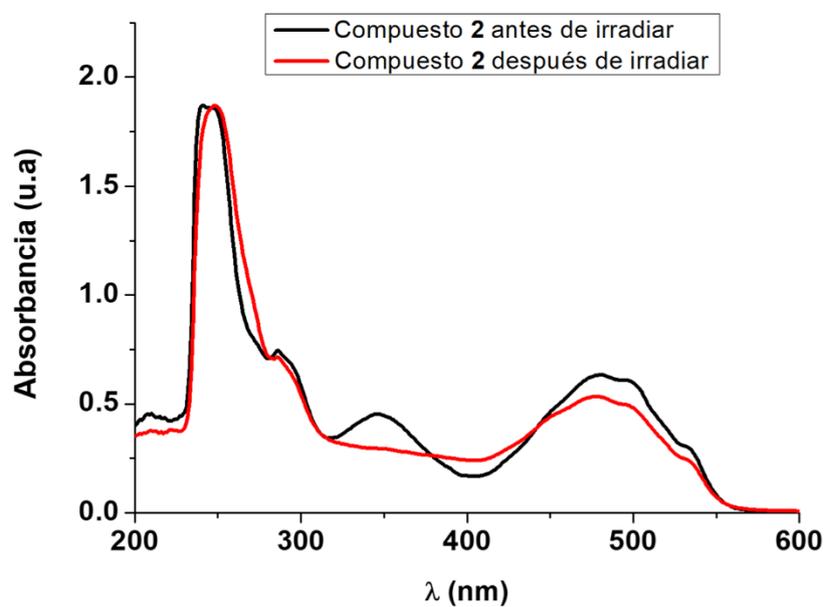
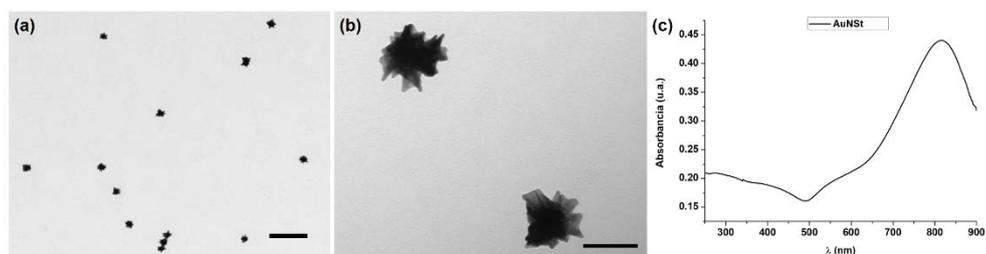


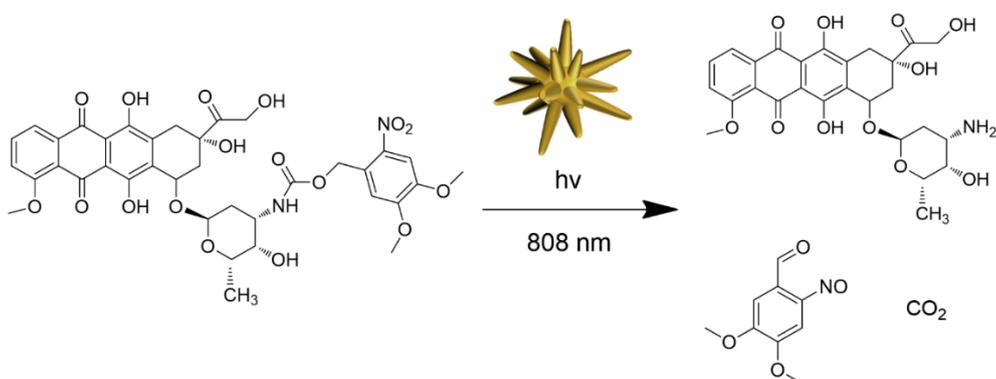
Figura 4. Espectros de absorción UV-Visible del compuesto 2 antes (línea negra) y después (línea roja) de la irradiación NIR en presencia de las AuNSts.

## Resultados y Discusión

Las AuNSTs se obtienen por el método de crecimiento de semillas utilizando una disolución de PVP en DMF.<sup>[44, 113]</sup> Este procedimiento se basa en la reducción del complejo  $\text{AuCl}_4^-$  por la DMF, y la consiguiente deposición de los átomos de Au sobre las AuNP que actúan como centros de nucleación. Se obtuvieron AuNSTs de 120 nm a partir de semillas de 15 nm. Las AuNSTs poseen una intensa absorción LSPR a 808 nm (Figura 5).



**Figura 5.** Imágenes de TEM (a,b) y espectro de absorción (c) de las AuNSTs. Barras de escala: 500 nm (a), 100 nm (b).

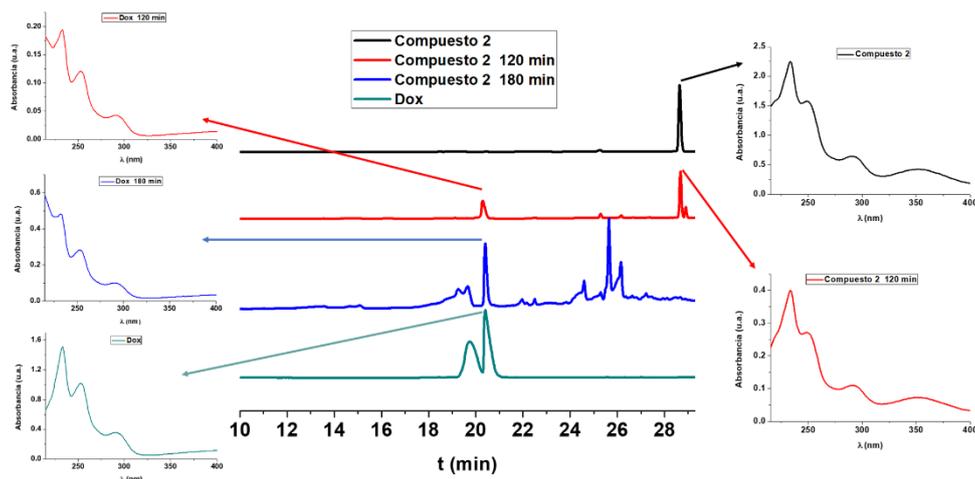


**Figura 6.** Fotoactivación NIR del profármaco **2** en presencia de las AuNSTs.

La suspensión de las AuNSTs en una disolución del profármaco **2** se irradió usando un láser de 808 nm a una densidad de potencia de  $1 \text{ W cm}^{-2}$ . Durante el proceso de irradiación, las moléculas fotolábiles cercanas a la superficie de las nanopartículas de oro pueden absorber dos fotones de baja energía que activan la reacción foto-redox en el anillo aromático provocando la reducción del grupo nitro,

## Resultados y Discusión

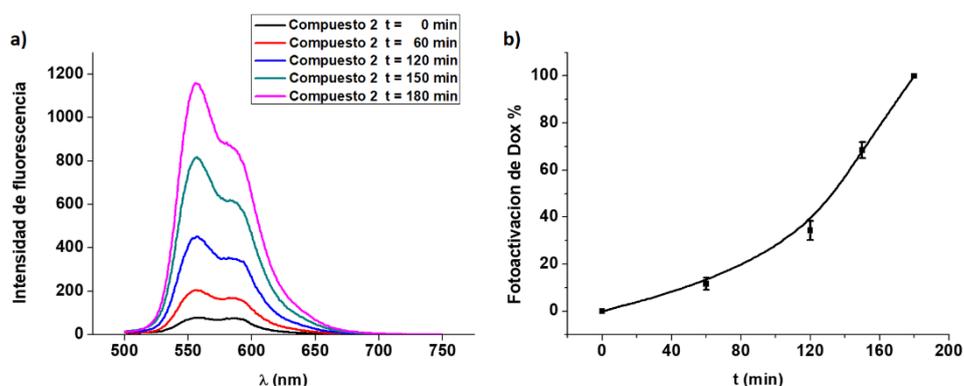
la oxidación del carbono bencílico y finalmente la disociación del enlace C-O y la liberación de la doxorubicina (**Figura 6**). El análisis por HPLC de la muestra irradiada durante 120 y 180 min evidenció la formación de la doxorubicina (curva roja y azul; tiempo de elución = 20.5 min), corroborándose la disociación molecular multifotónica del profármaco **2** en presencia de las AuNSts (**Figura 7**). El compuesto **2** se fotodisoció completamente después de 180 min de irradiación NIR ya que no se observa ninguna señal en el cromatograma en el tiempo de elución del profármaco (curva azul; tiempo de elución = 28.5 min).



**Figura 7.** Análisis por HPLC de la fotoactivación NIR del profármaco **2** en presencia de las AuNSts.

También se registraron los espectros de fluorescencia de la muestra irradiada a intervalos de tiempo predeterminados durante la irradiación. La intensidad de fluorescencia a 560 nm se incrementa cuando la doxorubicina se libera después de la irradiación del compuesto **2** (**Figura 8**). Basado en los resultados del análisis por HPLC y utilizando los espectros de fluorescencia de la muestra irradiada, se obtuvo el perfil de foto-activación de la doxorubicina. Utilizando una curva de calibrado, se determinó que la doxorubicina se foto-genera completamente a una concentración de 8.6  $\mu\text{M}$  durante 180 min de irradiación NIR. Comparada con la fotorruptura a 365 nm, se requiere un mayor tiempo de irradiación para producir la

absorción multifotónica de la radiación NIR y la consiguiente foto-disociación del profármaco en presencia de las AuNSts, debido a que este proceso es menos favorable que la absorción de un fotón de mayor energía. No obstante, es importante destacar que la activación del proceso foto-redox y la liberación del fármaco puede ocurrir incluso cuando las moléculas fotolábiles no están unidas directamente a la superficie de las AuNSts.

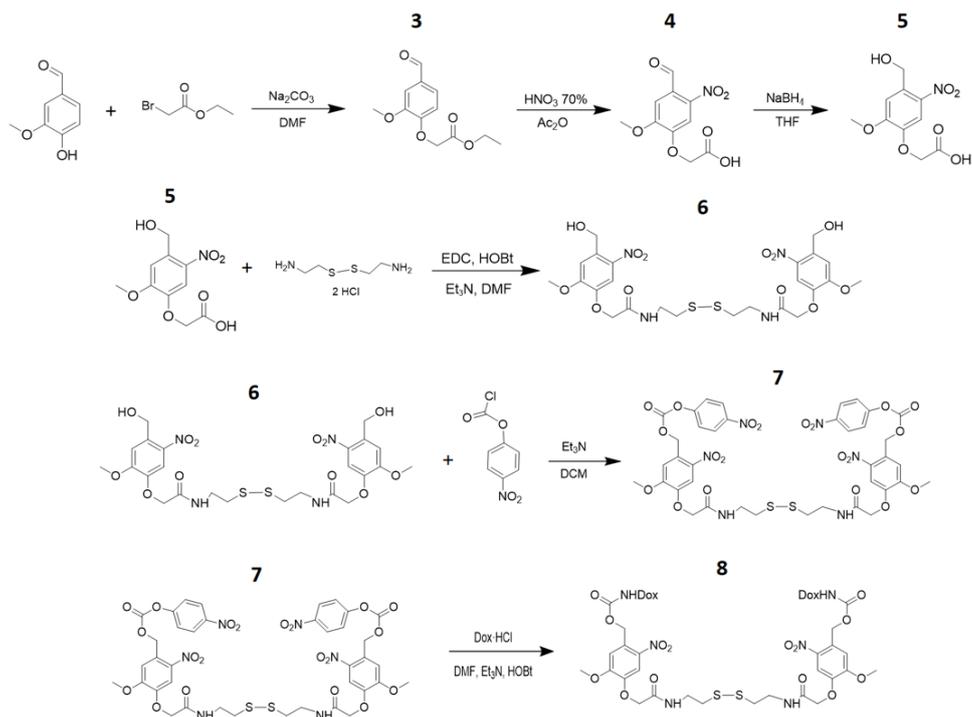


**Figura 8.** Espectros de fluorescencia del profármaco **2** en el sobrenadante a tiempos de irradiación predeterminados en presencia de las AuNSts (a) y perfil de fotoactivación de la doxorubicina (b).

### *Fotoactivación del profármaco de la doxorubicina **8***

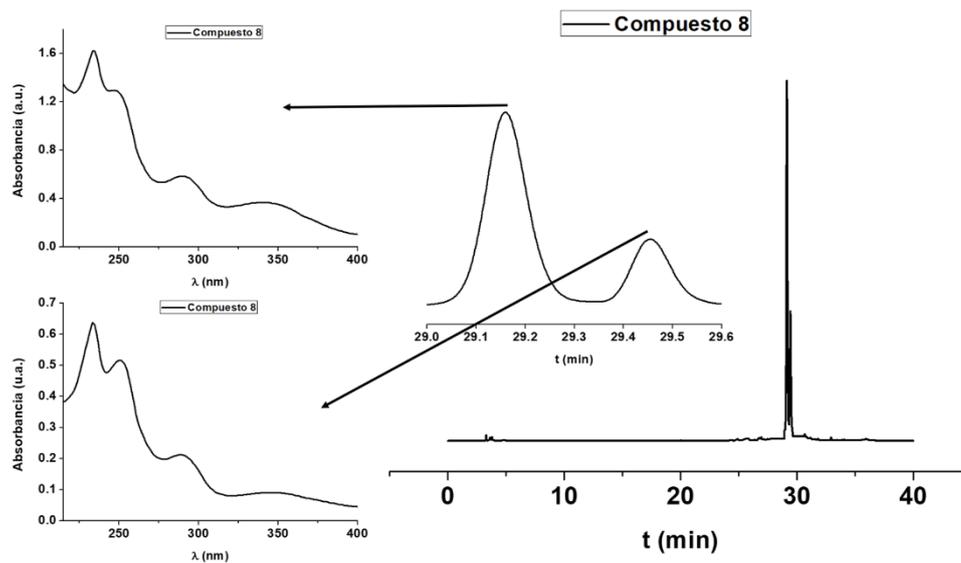
Por otro lado, se sintetizó a partir de la vainillina otro profármaco de la doxorubicina que tiene un grupo disulfuro que le permite asociarse a la superficie de las AuNSts (**Figura 9**), utilizando un procedimiento similar a los protocolos reportados en la literatura.<sup>[222, 227]</sup> La alquilación de la vainillina con el bromoacetato de etilo produce cuantitativamente el éster-aldehídico **3**. La reacción con el ácido nítrico y el subsiguiente tratamiento básico con NaOH produce la nitración del anillo aromático y la hidrólisis del éster, respectivamente, produciendo el ácido **4**. La reducción del grupo carbonilo aldehídico con el NaBH<sub>4</sub> produce el alcohol bencílico **5**. La amidación con el dihidrocloruro de cistamina produce el diol 2-nitrobencílico con un grupo disulfuro **6**, que se puede activar y acoplar con la doxorubicina de forma similar que el alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico.

## Resultados y Discusión



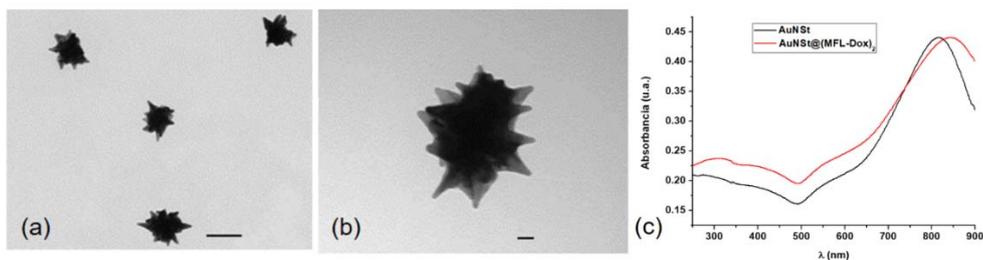
**Figura 9.** Síntesis del profármaco **8** a partir de la vainillina.

El compuesto **8** también se caracterizó por HPLC, TLC, espectroscopia UV-Visible y RMN, confirmándose su estructura química y su pureza. En el cromatograma se muestran dos señales a los tiempos de elución de 29.2 y 29.5 min correspondientes con los diastereoisómeros del compuesto **8** (**Figura 10**). Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en los espectros de RMN se asignaron a la estructura química del profármaco **8** y de los productos intermedios de la síntesis, utilizando también los experimentos multipulsos y bidimensionales (Materiales y Métodos).

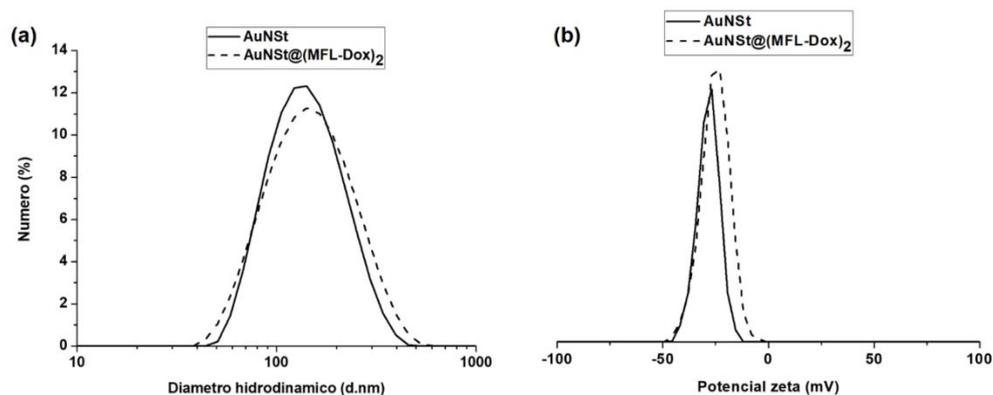


**Figura 10.** Análisis por HPLC del compuesto **8** sintetizado a partir de la vainillina.

Las AuNSts se funcionalizaron con el profármaco dispersándolas en una disolución del compuesto **8** en tetrahidrofurano (THF) y luego se lavaron para eliminar las moléculas que no se asociaron a la superficie de las nanopartículas (AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>). Las imágenes de TEM y los espectros de absorción de las nanopartículas antes y después de la modificación con el profármaco se muestran en la **Figura 11**. La banda LSPR de las AuNSts se desplaza ligeramente a mayores longitudes de onda,<sup>[182]</sup> después que las nanopartículas se modificaron con el compuesto **8**. La posición de la banda LSPR de los electrones de las puntas es altamente dependiente del tamaño y la morfología de las AuNSts y del índice de refracción local.<sup>[26, 60, 183-184]</sup> Las mediciones del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta de las nanopartículas por DLS también confirman la modificación superficial de las AuNSts con el profármaco **8**. El diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas se incrementa desde 152 a 163 nm, mientras que, el potencial zeta varía desde -28.5 a -24.6 mV, después del proceso de recubrimiento superficial (**Figura 12**).



**Figura 11.** Imágenes de TEM (a, b) y espectros de absorción (c) de las AuNSts y de las AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>. Barras de escala: 100 nm (a); 20 nm (b).



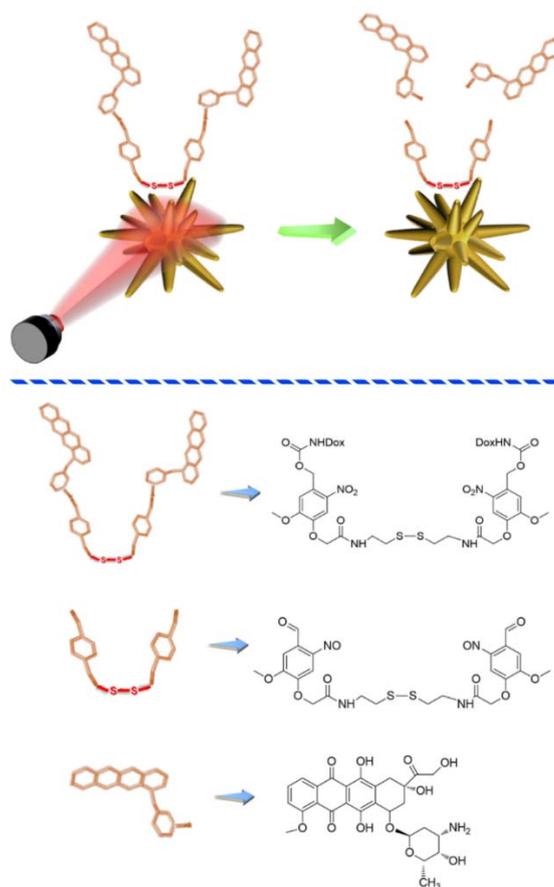
**Figura 12.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico (a) y del potencial zeta (b) de las AuNSts y AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>.

La suspensión de las nanopartículas funcionalizadas con el profármaco **8** (AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>) se irradió con un láser de 808 nm a  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , mientras que se utilizó una muestra control que no se irradió (**Figura 13**). A tiempos de irradiación predeterminados las muestras se centrifugan y se determina la doxorubicina fotoliberada en los sobrenadantes midiendo la intensidad de fluorescencia a 560 nm en el espectro de emisión.

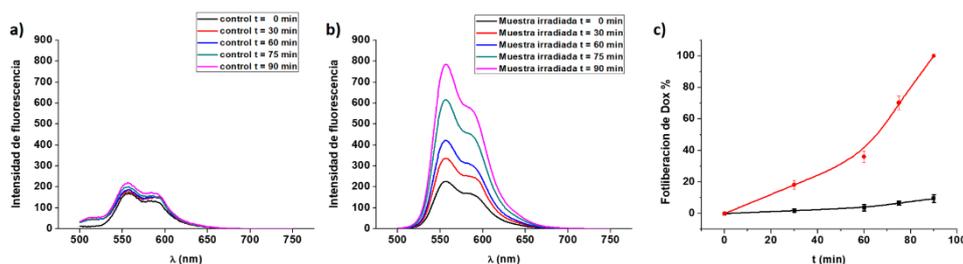
En este caso, la intensidad de fluorescencia a 560 nm también se incrementa cuando la doxorubicina se libera durante la irradiación de las nanopartículas, mientras que la intensidad de fluorescencia de la muestra control no varía considerablemente (**Figura 14**). Comparada con la fotoactivación del profármaco **2**,

## Resultados y Discusión

se obtiene un perfil de fotoliberación de la doxorrubicina similar. Sin embargo, utilizando este sistema se fotoliberó una cantidad de doxorrubicina menor ( $1.3 \mu\text{M}$ ), debido a que el número de moléculas del compuesto **8** unidas directamente a la superficie de las AuNSts y que pueden fotodescomponerse generando la doxorrubicina, está limitado por el tamaño de las moléculas y el área superficial de las partículas (**Figura 13**). En el caso de la activación del profármaco **2**, se puede generar mayor cantidad de doxorrubicina cuanto mayor número de moléculas hayan en la disolución.



**Figura 13.** Fotoliberación de doxorrubicina activada por la radiación NIR utilizando las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>.

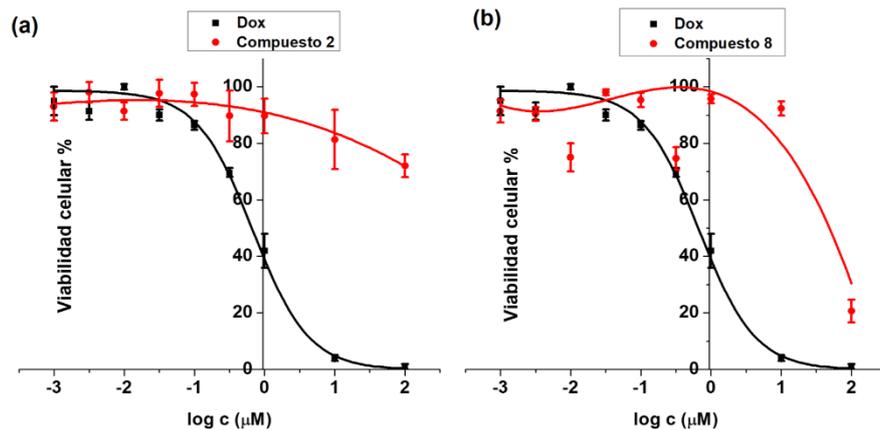


**Figura 14.** Espectros de fluorescencia de los sobrenadantes de las muestras control (a) e irradiada (b) a diferentes tiempos de irradiación de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> y perfil de fotoliberación de doxorubicina (c).

Estos resultados muestran que la absorción multifotónica de la radiación NIR y la foto-descomposición de los profármacos de la doxorubicina con un espaciador 2-nitrobencílico en presencia de las AuNSts, puede ocurrir incluso cuando las moléculas fotolábiles no están unidas directamente a la superficie de las nanopartículas, aunque es necesario que las moléculas estén cerca a la superficie de las AuNSts donde se produce una gran intensificación del campo electromagnético debido a la excitación de la LSPR.

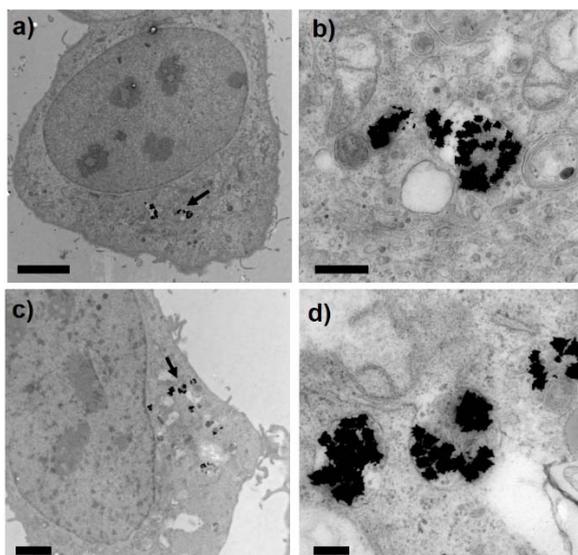
### *Fotoactivación de los profármacos de la doxorubicina en células*

Los experimentos de disociación molecular multifotónica con radiaciones NIR de los profármacos de la doxorubicina utilizando AuNSts en células HeLa se realizaron para evaluar la potencial aplicación de estos nanomateriales híbridos en la terapia del cáncer. Las células se incubaron por 48 h con la doxorubicina, el compuesto **2** y el compuesto **8** a diferentes concentraciones. La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo WST-1 después del período de incubación (**Figura 15**). El valor del IC<sub>50</sub> de la doxorubicina se determinó en 1 μM, mientras que los valores del IC<sub>50</sub> de los compuestos **2** y **8** son 100 veces mayores que el de la doxorubicina lo que indica un efecto significativo de los profármacos para su utilización farmacológica ya que muestran una reducción significativa de la toxicidad comparada con la doxorubicina.

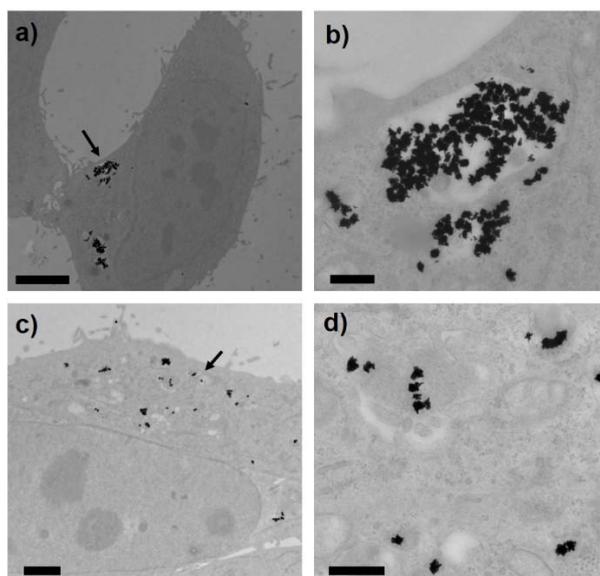


**Figura 15.** Viabilidad de las células HeLa en presencia de Dox, el compuesto **2** (a) y el compuesto **8** (b).

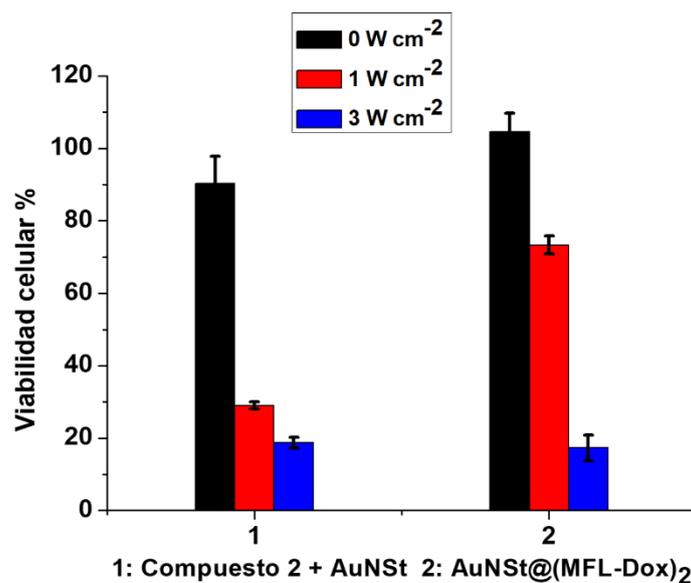
También, se evaluó la interacción de las nanopartículas con las células HeLa monitoreando la internalización celular de ambas nanopartículas por TEM (**Figura 16 y 17**). En las imágenes se puede observar que las nanopartículas se internalizan en las células eficientemente después de la incubación de las células con la suspensión de las nanopartículas en DMEM. Además, las células se co-incubaron con el compuesto **2** y las AuNSts o se incubaron con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>. Las AuNSts y las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, hasta que se irradian con un láser de 808 nm a diferentes densidades de potencia por 15 min y se incuban durante 48 h. En este caso, la viabilidad celular disminuye debido a que se produce la fotodisociación molecular de los profármacos en presencia de las AuNSts y la formación de la doxorubicina (**Figura 18**). A bajas potencias, la reducción de la viabilidad celular es más marcada cuando se irradia el profármaco **2** en presencia de las AuNSts, comparada con la irradiación de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>. Este comportamiento se debe a que la cantidad del profármaco **2** en disolución que se fotodescompone generando la doxorubicina es mayor que la cantidad del profármaco **8** unido a la superficie de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> que se descompone liberando la doxorubicina.



**Figura 16.** Imágenes de TEM de las células HeLa después de la incubación con las AuNSts. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  (a), 2  $\mu\text{m}$  (c), 500 nm (b), 200 nm (d).

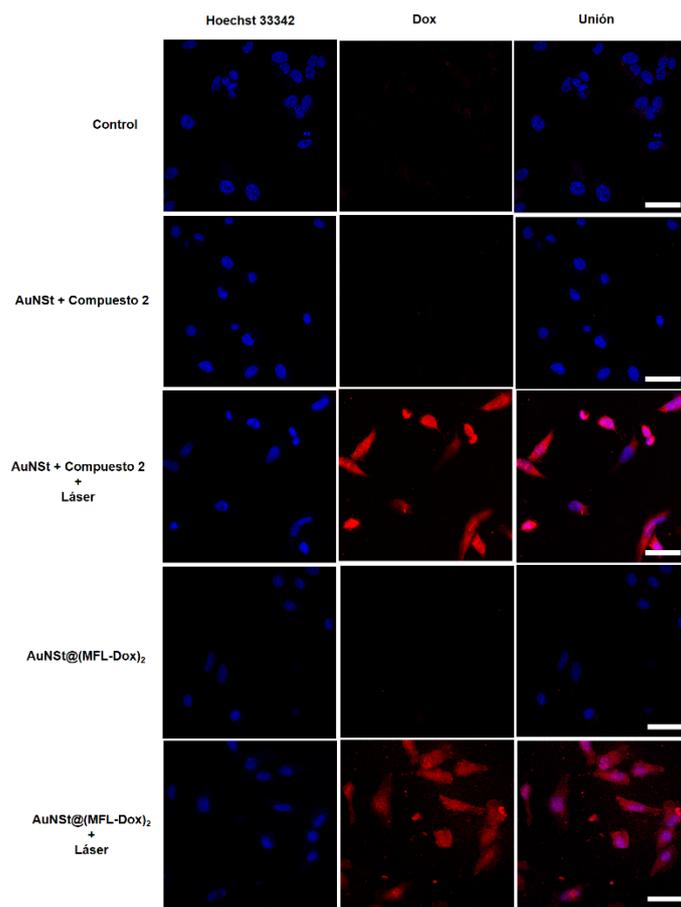


**Figura 17.** Imágenes de TEM de las células HeLa después de la incubación con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  (a), 2  $\mu\text{m}$  (c), 500 nm (b,d)

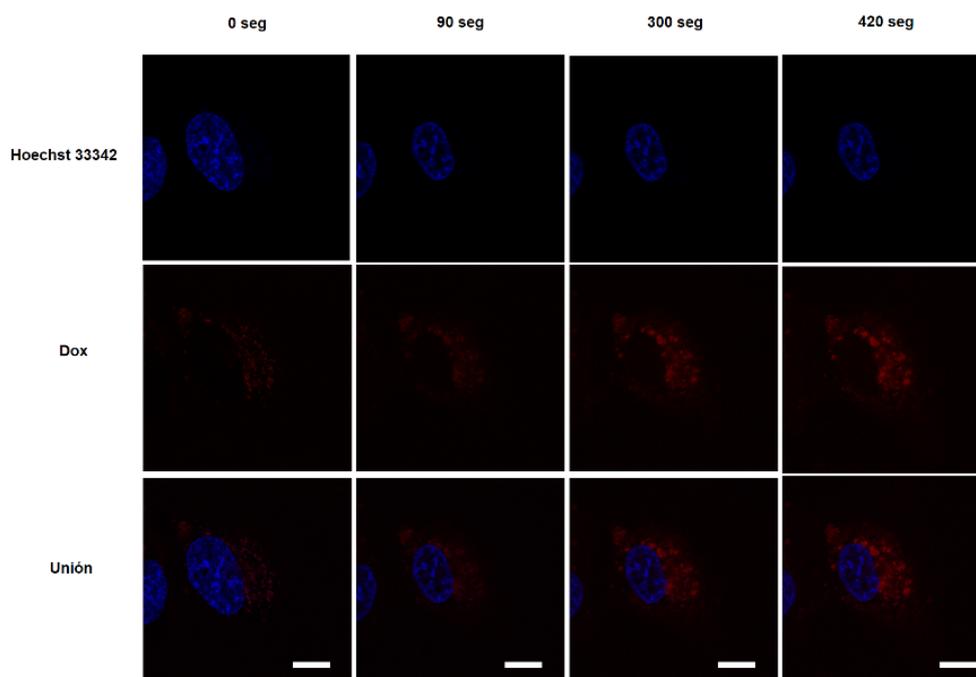


**Figura 18.** Viabilidad de las células HeLa co-incubadas con el compuesto **2** y las AuNSts o incubadas con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> después de la irradiación con un láser de 808 a diferentes potencias por 15 min.

También, se realizó un experimento de foto-activación de la doxorubicina en las células HeLa, utilizando la microscopía de barrido láser confocal. Las células se co-incubaron con el compuesto **2** y las AuNSts y con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> durante 2 h, luego se irradiaron con un láser de 808 nm y se incubaron por 2 h adicionales. Los núcleos de las células se marcan con el fluoróforo Hoechst 33342 y se monitorea la presencia intracelular de la doxorubicina midiendo las señales de fluorescencia de ambos fluoróforos en el microscopio confocal. En la **Figura 19** no se observa una señal de fluorescencia de la doxorubicina apreciable en las muestras no irradiadas. Por el contrario, se aprecia un aumento de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación de ambos sistemas. Estos resultados corroboran que se produce la foto-activación intracelular de la doxorubicina después la irradiación NIR de los profármacos en presencia de las nanoestrellas, provocando la disminución de la viabilidad celular, lo cual complementa los resultados discutidos con anterioridad.

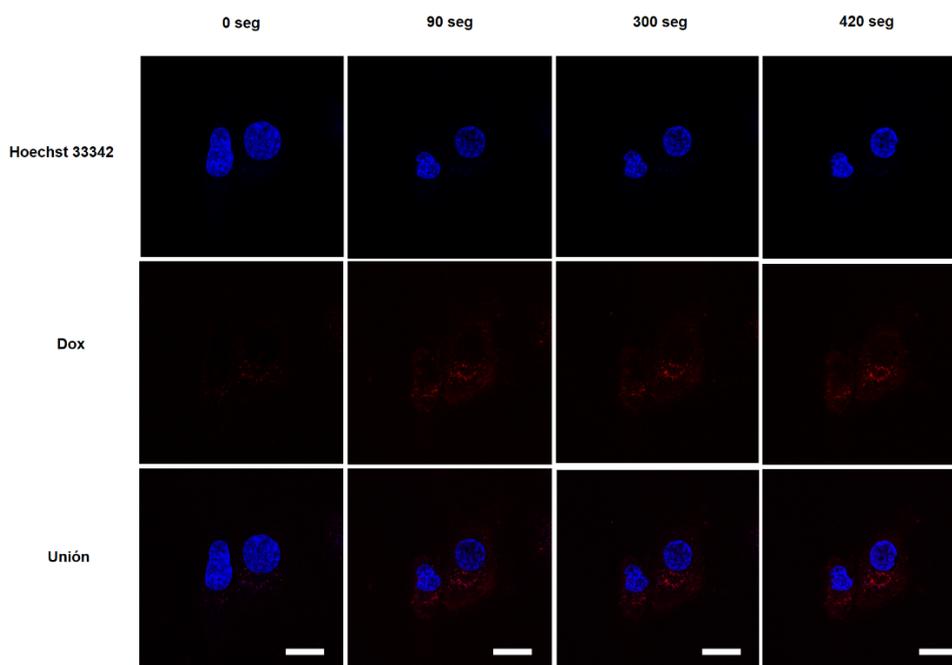


**Figura 19.** Fotoactivación de la Dox después de la irradiación NIR del compuesto **2** en presencia de las AuNSt y de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> en las células HeLa, empleando la microscopía de barrido láser confocal. De izquierda a derecha: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De arriba a abajo: células control (Control), células no irradiadas después de la co-incubación con el compuesto **2** y las AuNSt (AuNSt + compuesto **2**), células irradiadas después de la co-incubación con el compuesto **2** y las AuNSt (AuNSt + compuesto **2** + Láser), células no irradiadas después de la incubación con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> (AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>), células irradiadas después de la incubación con las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> (AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> + Láser). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 20.** Foto-activación de la Dox después de la irradiación *in situ* a 633 nm del compuesto **2** en presencia de las AuNSt en las células HeLa, empleando la microscopía de barrido láser confocal. De arriba a abajo: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De izquierda a derecha: antes de irradiar (0 seg), irradiación por 90 seg (90 seg) y después de irradiar (300, 420 seg). Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Por último, se realizaron experimentos de fotoactivación intracelular de la doxorubicina utilizando el láser del microscopio confocal para irradiar *in situ* las células incubadas con ambos sistemas a 633 nm. En la **Figura 20** se observa un incremento gradual de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación durante 90 seg de las células co-incubadas con las AuNSt y el compuesto **2**. Este resultado demuestra también, la fotoexcitación multifotónica del compuesto **2** en presencia de las AuNSts que conduce finalmente a la generación intracelular de la doxorubicina. Un comportamiento similar se observa en la **Figura 21** para las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>.



**Figura 21.** Foto-activación de la Dox después de la irradiación *in situ* a 633 nm de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> en las células HeLa, empleando la microscopía de barrido láser confocal. De arriba a abajo: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De izquierda a derecha: antes de irradiar (0 seg), irradiación por 90 seg (90 seg) y después de irradiar (300, 420 seg). Barras de escala: 20  $\mu$ m.

Estos resultados muestran que la utilización conjunta de las AuNSts, los profármacos de la doxorubicina con un espaciador 2-nitrobencílico y las radiaciones NIR, permite superar los inconvenientes asociados con las elevadas potencias de irradiación requeridas para producir la absorción multifotónica de las moléculas orgánicas y por lo tanto mejorar la quimioterapia basada en el tratamiento con doxorubicina del cáncer. Además, el empleo de nanosistemas similares puede extenderse en la terapia del cáncer, utilizando diferentes nanopartículas de oro anisotrópicas, longitudes de onda del láser NIR, agentes quimioterapéuticos y espaciadores fotolábiles.

### **2.3. Conclusiones**

En este trabajo se describió un nuevo mecanismo para la foto-activación de dos profármacos de la doxorrubicina basado en la disociación molecular multifotónica activada por radiaciones NIR de un espaciador 2-nitrobencílico en presencia de las AuNSts. Se sintetizó uno de los profármacos mediante la modificación química de la doxorrubicina con el alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico a través de un enlace carbamato. La absorción multifotónica y la disociación de este profármaco en presencia de las AuNSts durante la irradiación NIR produce la formación de la doxorrubicina, que se evidenció mediante el análisis por HPLC de la muestra irradiada. Se sintetizó otro profármaco con un espaciador 2-nitrobencílico y un grupo disulfuro a partir de la vainillina. Se modificaron las AuNSts con este compuesto y se irradiaron utilizando el láser de 808 nm. La fotoliberación de la doxorrubicina se demostró mediante espectroscopía de fluorescencia, debido también a la disociación multifotónica del espaciador 2-nitrobencílico. El proceso foto-redox en los profármacos activado por la radiación NIR en presencia de las AuNSts puede ocurrir incluso cuando las moléculas fotolábiles no están unidas directamente a la superficie de las nanopartículas. Tanto los profármacos de la doxorrubicina como las nanopartículas AuNSts y AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, hasta que se irradiaron con un láser de 808 nm que provoca la foto-ruptura de los profármacos en presencia de las AuNSts y la liberación de la doxorrubicina. El funcionamiento adecuado de estos materiales híbridos se basa en el empleo de las AuNSts que favorecen la absorción multifotónica de la radiación NIR y la foto-ruptura del espaciador 2-nitrobencílico que produce la liberación de la doxorrubicina. El uso de estos sistemas permite superar las limitaciones asociadas con las elevadas potencias de irradiación requeridas para producir la absorción multifotónica en moléculas orgánicas y mejorar la quimioterapia basada en el tratamiento con doxorrubicina.

### **Capítulo 3. Sistemas de fotoliberación de fármacos basados en nanopartículas Janus y nanoestrellas de oro cubiertas de una capa de sílice activada por la disociación molecular multifotónica de moléculas fotolábiles con un espaciador 2-nitrobencílico**

En este capítulo se desarrollan dos sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en la foto-ruptura de un espaciador 2-nitrobencílico activada por radiaciones NIR utilizando nanopartículas Janus formadas por nanoestrellas de oro y nanopartículas mesoporosas de sílice (AuNSt-MSNP) y AuNSts recubiertas de una capa mesoporosa de sílice. Se sintetizó a partir de la vainillina una molécula fotolábil con un grupo tiol y que tiene asociado el ácido succínico. Esta molécula se utilizó para la preparación de las nanopartículas Janus N1 (AuNSt-MSNP) funcionalizadas en la superficie de la sílice con un complejo supramolecular entre el benzimidazol y la  $\beta$ -ciclodextrina (Bzi-CD) que actúa como puerta molecular sensible a los cambios de pH. La irradiación NIR de estas nanopartículas híbridas produce la foto-ruptura de la molécula fotolábil sobre la superficie de las AuNSts y la generación del ácido succínico que a su vez provoca la disociación del complejo Bzi-CD y la liberación de la doxorubicina encapsulada en las MSNPs. Además, se acopló una molécula de polietilenglicol (PEG) con un espaciador 2-nitrobencílico y con un grupo carboxilo, previamente sintetizado a partir de la vainillina, a la superficie de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> modificada previamente con grupos aminos (nanopartículas N2). Este PEG modificado puede actuar como puerta molecular fotosensible que evita la liberación de la carga encapsulada en la capa de sílice. La irradiación NIR de estas nanopartículas N2 produce la fotodescomposición del espaciador 2-nitrobencílico y la liberación de las cadenas de PEG ancladas sobre la superficie externa de los poros, conduciendo finalmente a la difusión de la Dox encapsulada desde el interior de la capa mesoporosa hacia el medio. Ambas nanopartículas N1 y N2, no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa hasta que se irradiaron con un láser de 808 nm que produce en primer lugar la fotodescomposición de las moléculas fotolábiles que conduce en última instancia a la liberación del fármaco encapsulado.

### **3.1. Introducción**

El desarrollo de sistemas de liberación de fármacos capaces de liberar la carga debido a la aplicación de un estímulo específico ha atraído la atención en los últimos años debido a su potencial aplicación en biomedicina.<sup>[117-118]</sup> Entre los nanomateriales preparados con ese propósito,<sup>[119-120]</sup> las nanopartículas mesoporosas de sílice son excelentes candidatas para encapsular eficientemente el fármaco ya que poseen poros de tamaños definidos y elevados volúmenes específicos de poro y área específica superficial. Además, estas nanopartículas pueden funcionalizarse en la superficie externa con entidades químicas y supramoleculares que actúan como puertas moleculares evitando la difusión del fármaco desde el interior de los poros hacia el medio y permitiendo su posterior liberación en presencia de un estímulo predeterminado.<sup>[27]</sup>

El empleo de la irradiación con luz como estímulo para activar la liberación de fármacos encapsulados se ha descrito con frecuencia en la terapia del cáncer debido a que la liberación puede definirse espacial y temporalmente mediante un ajuste preciso del área y la duración del estímulo luminoso.<sup>[27]</sup> Se llevan a cabo numerosas investigaciones encaminadas a desarrollar nanopartículas híbridas que puedan simultáneamente, almacenar el fármaco eficientemente y activar un mecanismo para su fotoliberación. En este sentido, se han empleado recientemente moléculas fotolábiles para la activación remota y la liberación de ciertos fármacos asociados a diferentes nanopartículas.<sup>[203-204, 228-229]</sup> Sin embargo, la fotodisociación molecular requiere el empleo de radiaciones de alta energía que limitan su empleo en aplicaciones clínicas.<sup>[205]</sup> La absorción multifotónica de las radiaciones NIR constituye una alternativa atractiva para el empleo de las moléculas fotolábiles en aplicaciones biológicas debido a que las radiaciones NIR poseen una mayor penetración en los tejidos y no provocan daños en estos.<sup>[230-232]</sup> Aunque se ha descrito el empleo de materiales poliméricos y nanopartículas mesoporosas de sílice donde se produce la absorción de dos fotones de radiación NIR,<sup>[206, 233]</sup> las foto-reacciones activadas por este proceso son lentas debido a la pequeña sección transversal de absorción multifotónica de los cromóforos empleados.<sup>[219-220]</sup> La intensificación del

campo eléctrico producido por la resonancia plasmónica superficial localizada en las nanopartículas metálicas, permite superar los inconvenientes asociados con la elevada potencia de irradiación requerida para producir la absorción multifotónica en moléculas orgánicas.<sup>[207-209, 234]</sup> La excitación de la LSPR de las AuNSts en la region NIR produce una fuerte intensificación del campo electromagnético en sus puntas agudas<sup>[41]</sup> que podría favorecer la absorción multifotónica en moléculas cercanas a la superficie de las nanopartículas. Teniendo en cuenta estos aspectos pueden desarrollarse sistemas de fotoliberación de fármacos utilizando AuNSts basados en la absorción multifotónica de la radiación NIR en moléculas que absorben en el intervalo 300-400 nm. Los derivados 2-nitrobencílicos se han utilizado extensamente como grupos protectores fotosensibles<sup>[217-218]</sup> en la síntesis de péptidos, carbohidratos y oligonucleótidos.<sup>[210, 212-213]</sup> El espaciador 2-nitrobencílico también se ha utilizado en la preparación de sistemas de fotoliberación basados en MSNPs funcionalizadas con puertas moleculares.<sup>[235-237]</sup> Sin embargo no se han reportado sistemas de fotoliberación de fármacos basados en la disociación multifotónica activada por la radiación NIR de moléculas fotolábiles que combinen las AuNSts y las MSNPs. Se han preparado nanopartículas híbridas compuestas de Au y sílice mesoporosa con diferentes morfologías tales como las nanopartículas tipo núcleo-capa<sup>[5, 17, 194]</sup> y nanopartículas Janus<sup>[142, 144, 238]</sup>, para aplicaciones de liberación de fármacos, detección de especies químicas y comunicación entre partículas. En este trabajo se desarrollan dos sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en la foto-ruptura de un espaciador 2-nitrobencílico activada por las radiaciones NIR utilizando nanopartículas Janus AuNSt-MSNP y nanopartículas mesoporosas con un núcleo de AuNSt (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>).

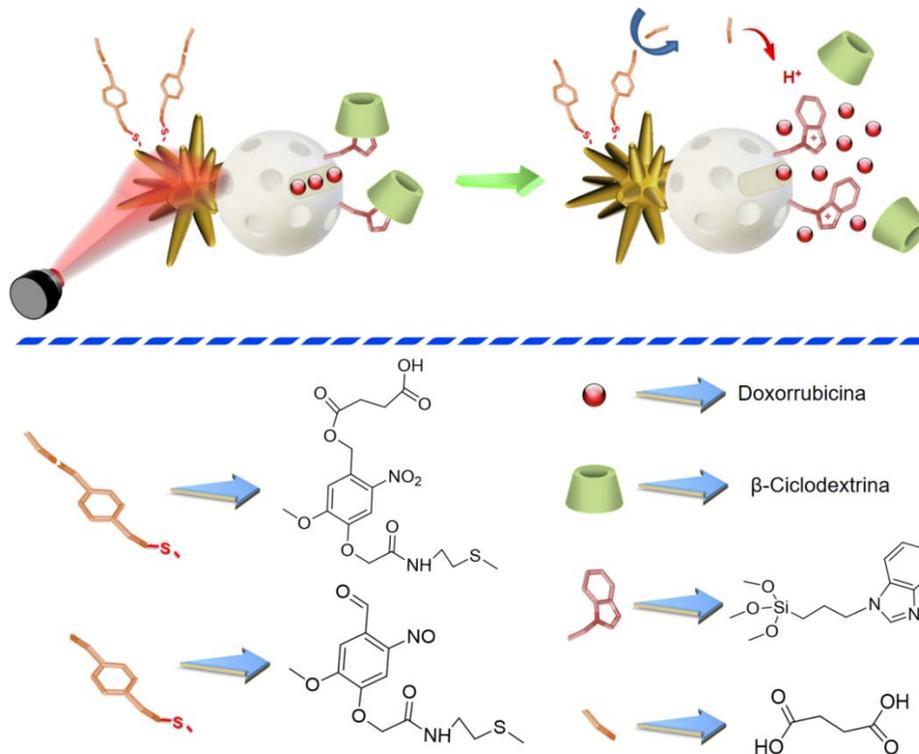
### 3.2. Resultados y discusión

#### *Fotoliberación de doxorubicina utilizando nanopartículas Janus AuNSt-MSNP*

En la **Figura 1** se muestra la representación del nanodispositivo N1 sintetizado en este trabajo basado en las nanopartículas Janus AuNSt-MSNP. La superficie de las AuNSts se funcionaliza con el compuesto 2-nitrobencílico **10 (Figura 2)** y las MSNPs se cargan con doxorubicina (Dox) y se funcionaliza la superficie externa de

---

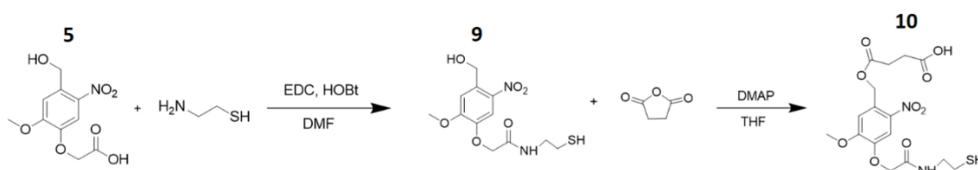
los poros con el complejo benzimidazol@ $\beta$ -ciclodextrina (Bzi@CD) que actúa como puerta molecular sensible al pH.<sup>[142, 239-241]</sup> En un medio neutro (pH=7) el benzimidazol es hidrófobo y puede interactuar supramolecularmente con la cavidad hidrofóbica de la  $\beta$ -ciclodextrina formándose un complejo de inclusión ( $K_{est}=10^2 M^{-1}$ ) sobre la superficie de las nanopartículas que bloquea los poros y evita la difusión del fármaco encapsulado. Cuando el pH disminuye localmente cerca de las nanopartículas, el benzimidazol se protona, debilitándose la interacción supramolecular con la  $\beta$ -ciclodextrina lo que provoca la disociación del complejo y la difusión del fármaco desde el interior de los poros.



**Figura 1.** Representación del nanodispositivo N1 basado en las nanopartículas Janus AuNst-MSNP utilizado para la fotoliberación de la Dox empleando radiaciones NIR.

En este sistema la puerta molecular ensamblada sobre la superficie de la MSNP y la molécula efectora (estímulo que activa o induce la liberación) unida a la superficie de las AuNSts a través del espaciador 2-nitrobenílico están en la misma nanopartícula anisótropa pero en caras opuestas. En la superficie de la AuNSt se produce la fotorruptura multifotónica molecular del compuesto fotolábil durante la irradiación con un láser NIR debido a la gran intensificación del campo electromagnético producido en las puntas agudas de las AuNSt. En este proceso se genera ácido succínico que provoca la disociación del complejo supramolecular (producto a la protonación del benzimidazol) en las MSNPs y la liberación de la doxorubicina.

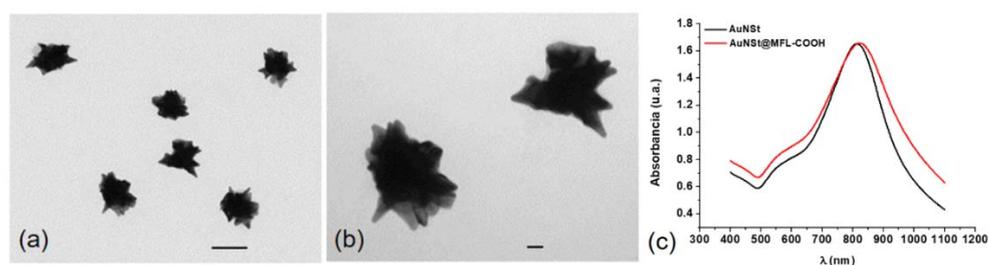
En primer lugar, se sintetizó a partir de la vainillina el compuesto fotolábil **10** con un espaciador 2-nitrobenílico y un grupo tiol, y que tiene asociado el ácido succínico, utilizando un procedimiento similar a los reportados en la literatura.<sup>[227]</sup> El alcohol benílico **5** se obtuvo utilizando el mismo procedimiento descrito en el capítulo 2. La amidación del compuesto **5** con la cisteamina produce un alcohol 2-nitrobenílico con un grupo tiol **9**, que se puede acoplar con el anhídrido succínico para producir la molécula fotolábil **10** (Figura 2). Este compuesto y los productos intermedios se caracterizaron por espectroscopía FT-IR y RMN (Materiales y Métodos).



**Figura 2.** Síntesis de la molécula fotolábil **10** con un espaciador 2-nitrobenílico.

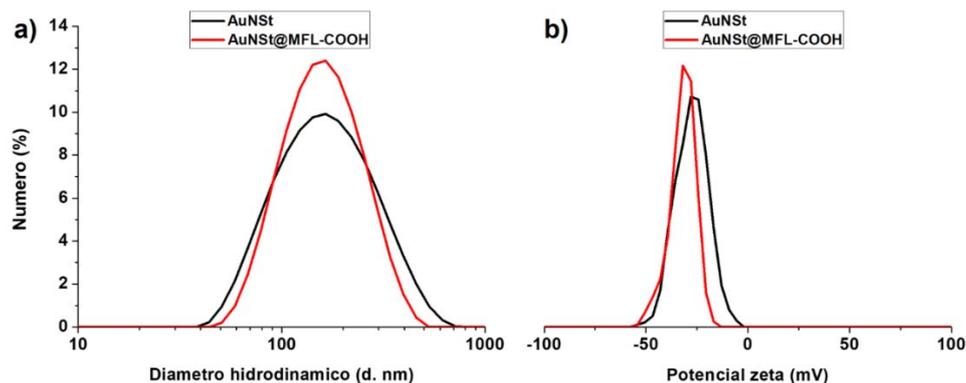
Las AuNSts se obtienen utilizando el método de crecimiento de semillas en una disolución de PVP en DMF.<sup>[44, 113]</sup> Este protocolo se basa en la reducción del complejo AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> por la DMF y la consiguiente deposición de los átomos de Au sobre las AuNP que actúan como semillas. Se sintetizaron AuNSts de 120 nm a partir de AuNPs de 15 nm. La superficie de las AuNSts se funcionalizó con el compuesto **10**,

dispersando las nanopartículas en una disolución del compuesto fotolábil. Finalmente, las partículas se centrifugaron y se lavaron varias veces para eliminar las moléculas que no se unieron a la superficie, obteniéndose las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH, que se utilizaron posteriormente para la preparación del nanodispositivo N1. Las imágenes de TEM y los espectros de absorción de las nanopartículas se muestran en la **Figura 3**. Las AuNSts tienen una banda de absorción en la región NIR, asociada a la LSPR de los electrones de las puntas,<sup>[182]</sup> cuya posición se desplaza batocrómicamente cuando las nanopartículas se modifican con el compuesto **10** debido que la posición de la banda LSPR depende del índice de refracción superficial.<sup>[26, 60, 183-184]</sup>



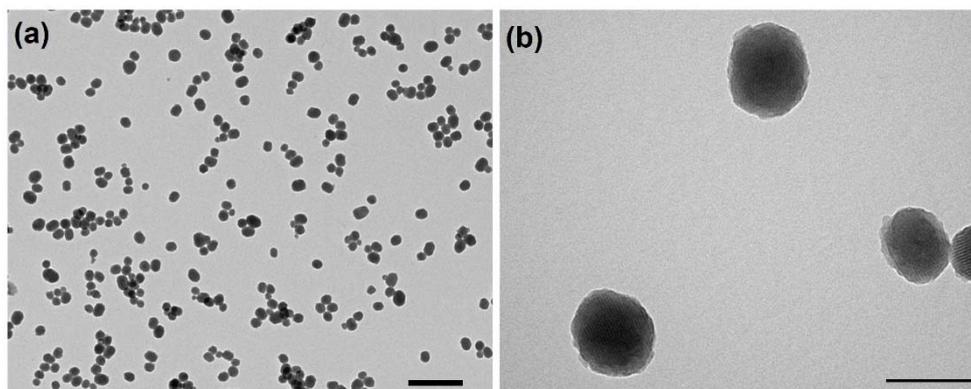
**Figura 3.** Imágenes de TEM (a,b) y espectros de absorción (c) de las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH. Barras de escala: 100 nm (a); 20 nm (b).

Las mediciones del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta de las nanopartículas por DLS también confirman la modificación superficial de las AuNSts con el compuesto **10**. El diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas varía desde 187 hasta 158 nm, mientras que, el potencial zeta disminuye desde -27.6 a -30.5 mV, después del recubrimiento superficial (**Figura 4**). El decremento del diámetro hidrodinámico promedio de las AuNSt después de la modificación superficial puede deberse a que se incrementa la repulsión entre las partículas modificadas con el ligando aniónico, lo que evita la formación de agregados y por consiguiente disminuye la polidispersión de tamaños. La formación de agregados entre las partículas no modificadas superficialmente provoca un incremento de la polidispersión, por lo cual el valor del diámetro hidrodinámico promedio puede ser mayor que el diámetro de las AuNSt determinado por TEM.



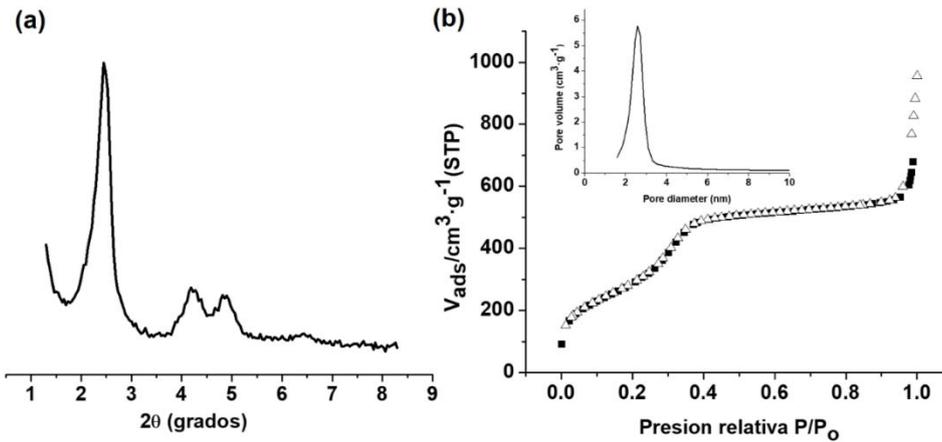
**Figura 4.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico (a) y del potencial zeta (b) de las AuNSts y AuNSt@MFL-COOH.

Las nanopartículas Janus AuNSt-MSNPs se sintetizaron utilizando un protocolo similar al empleado en la síntesis de nanopartículas Janus basadas en nanoesferas de oro y nanopartículas mesoporosas de sílice.<sup>[143, 240, 242]</sup> En este procedimiento se utiliza como plantilla una emulsión Pickering cuya fase hidrófoba está compuesta de una cera de parafina.<sup>[146, 148]</sup> Las nanopartículas mesoporosas de sílice (estructura mesoporosa del tipo MCM-41) se preparan mediante hidrólisis alcalina y posterior condensación del tetraetoxisilano (TEOS) utilizando el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como plantilla (**Figura 5**).



**Figura 5.** Imágenes de TEM de las MSNPs. Barras de escala: 500 nm (a), 100 nm (b).

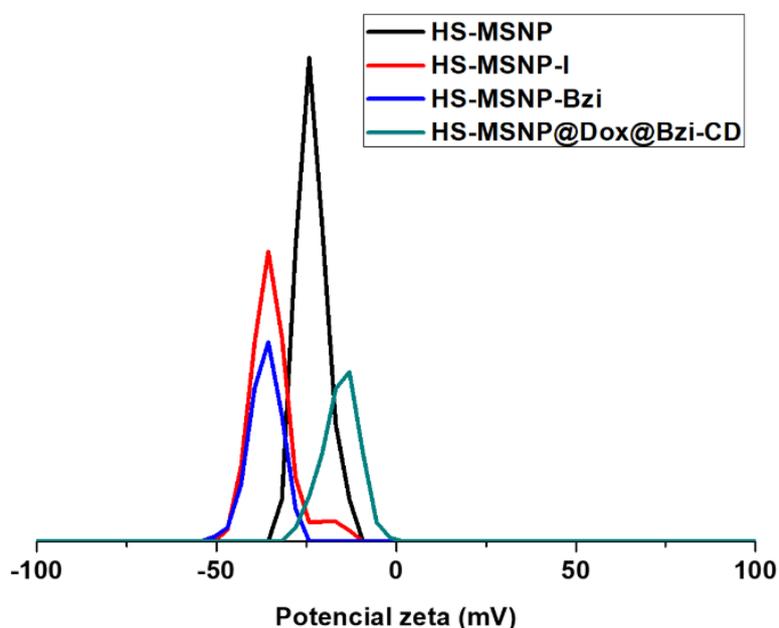
El patrón de difracción de rayos X a ángulos bajos (PXR) de las MSNPs muestra tres máximos a  $2\theta = 2.50, 4.23$  and  $4.87^\circ$  que pueden ser indexados a los planos de difracción (100), (110) y (200) de la celda unidad hexagonal de los materiales mesoporosos, respectivamente (**Figura 6a**).<sup>[129]</sup> Además, se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  de las nanopartículas que muestran la forma tipo IV típica de materiales mesoporosos.<sup>[201]</sup> A partir de estas isothermas se determinó el área superficial BET, el tamaño promedio de los poros y el volumen específico cuyos valores son  $1088 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ,  $2.5 \text{ nm}$  y  $1.05 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente (**Figura 6b**).<sup>[124, 129]</sup>



**Figura 6.** Patrón de difracción de rayos X (a) e isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  (b) de las MSNPs (Recuadro: distribución del tamaño de poros).

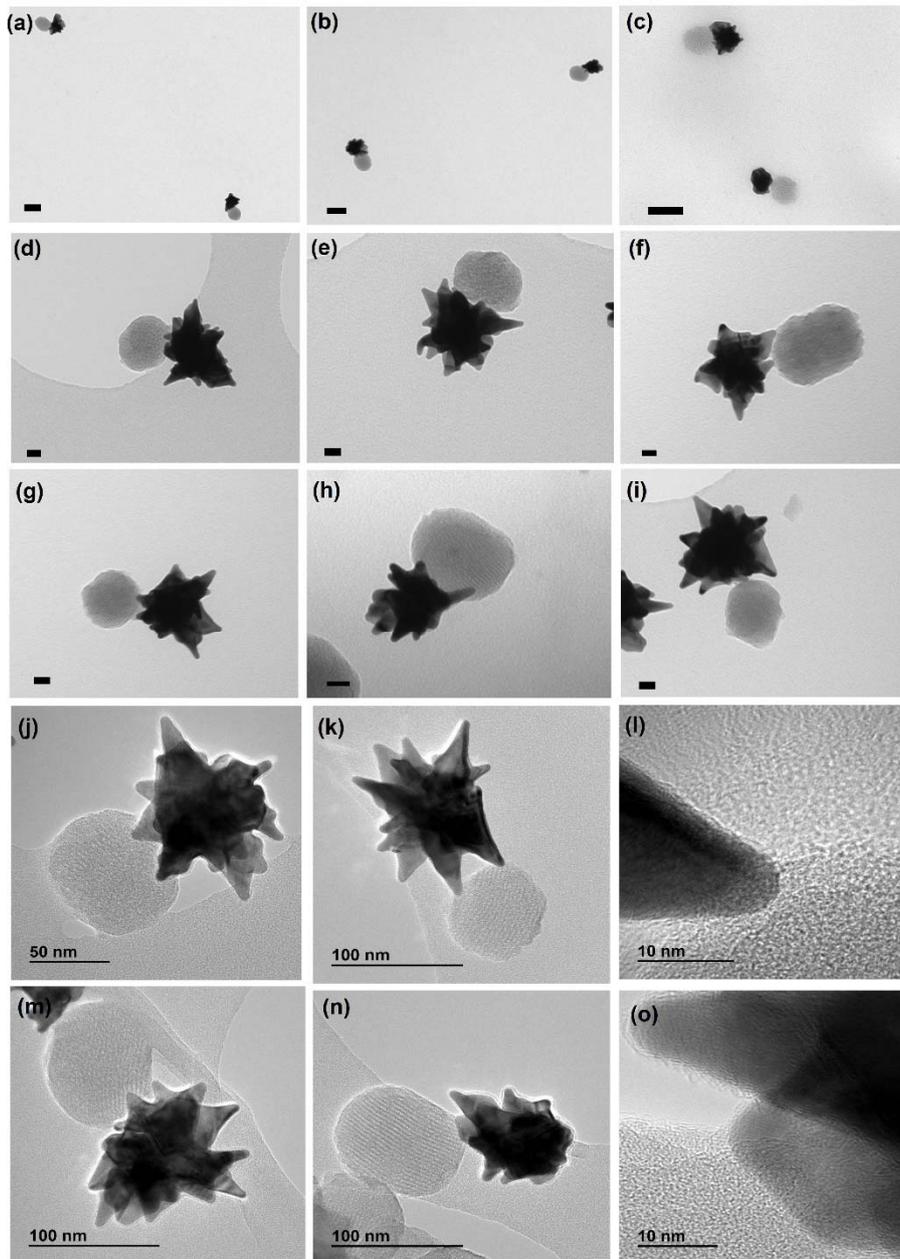
Después del proceso de calcinación de las MSNPs para eliminar el surfactante, la superficie de estas se enmascaran parcialmente confinándolas en la interfase de la emulsión Pickering y se funcionaliza la superficie expuesta con el (3-mercaptopropil)triétoxissilano. Antes de unir las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH a la superficie de las MSNPs funcionalizada con grupos tioles, se disolvió la parafina lavando las partículas con hexano y se funcionalizó el resto de la superficie con el (3-iodopropil)trimetoxissilano y el benzimidazol. Luego se cargaron las nanopartículas con la doxorubicina y se modificaron con la  $\beta$ -ciclodextrina

recubriéndose los poros con el complejo supramolecular que se forma entre el benzimidazol unido covalentemente a la superficie de las nanopartículas y la  $\beta$ -ciclodextrina. Las mediciones del potencial zeta de las MSNPs por DLS confirman las sucesivas modificaciones de la superficie de las nanopartículas. El potencial zeta decrece gradualmente durante la modificación superficial de las MSNPs (HS-MSNP: -23.4 mV) con el (3-iodopropil)trimetoxisilano (HS-MSNP-I: -33.2 mV) y el benzimidazol (HS-MSNP-Bzi: -37.8 mV). Sin embargo, el potencial zeta se incrementa desde -37.8 (HS-MSNP-Bzi) a -13.8 mV (HS-MSNP@Dox@Bzi-CD) después del cargado con la doxorrubicina y la funcionalización superficial con la  $\beta$ -ciclodextrina, debido a la presencia del fármaco catiónico dentro de los canales mesoporosos y a la formación del complejo Bzi-CD en la superficie externa de las nanopartículas (**Figura 7**). Además, se determinó la fracción de materia orgánica total en las nanopartículas HS-MSNP@Dox@Bzi-CD por análisis termogravimétrico, obteniéndose un valor de 9.5 %.

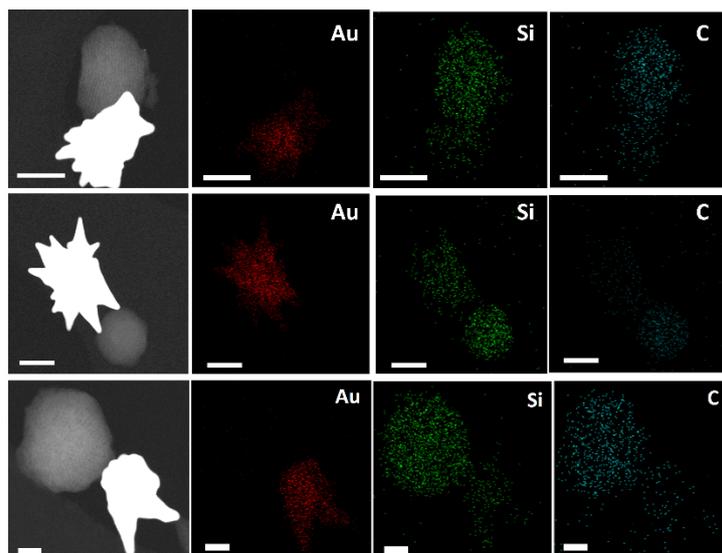


**Figura 7.** Distribuciones por DLS del potencial zeta de las nanopartículas HS-MSNP, HS-MSNP-I, HS-MSNP-Bzi y HS-MSNP@Dox@Bzi-CD.

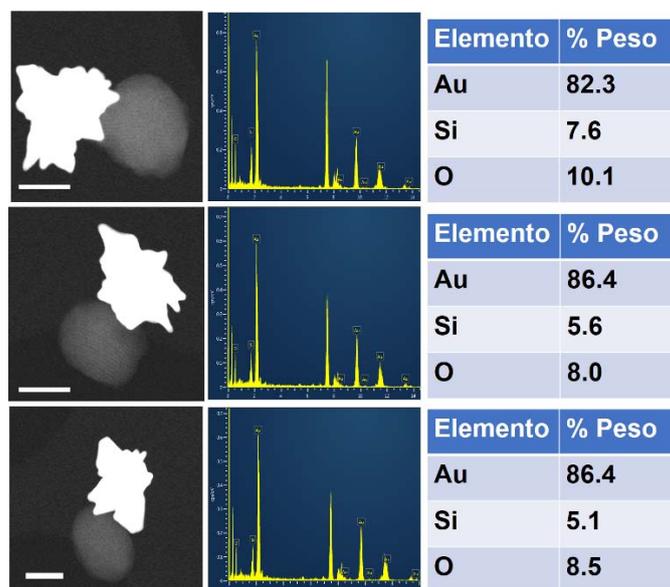
Finalmente, se asocian las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH a las nanopartículas HS-MSN@Dox@Bzi-CD para obtener las nanopartículas Janus N1. En la **Figura 8** se muestran las imágenes de TEM y HR-TEM de las nanopartículas Janus N1. Se realizó un análisis detallado de la morfología de las nanopartículas observándose que las AuNSts y las MSNs están unidas en determinadas zonas de la superficie de ambas partículas formando una interfase bien definida (**Figura 8 l, o**). Además, se determinó la composición de las nanopartículas mediante un análisis elemental por EDXS a partir de las imágenes de DF-STEM (**Figura 9 y 10**).



**Figura 8.** Imágenes de TEM (a,b,c,d,e,f,g,h,i) y HR-TEM (j,k,l,m,n,o) de las nanopartículas Janus N1. Barras de escala: 100 nm (a,b,c), 20 nm (d,e,f,g,h,i).

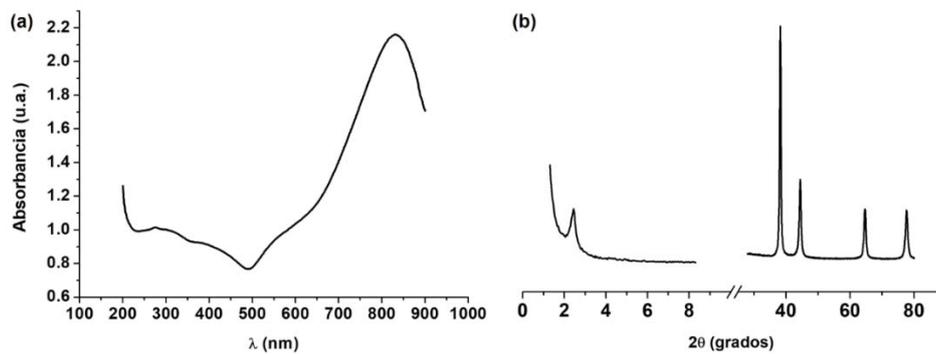


**Figura 9.** Imágenes de DF-STEM y mapa de elementos de Au, Si y C por EDXS de las nanopartículas Janus N1. Barras de escala: 50 nm.



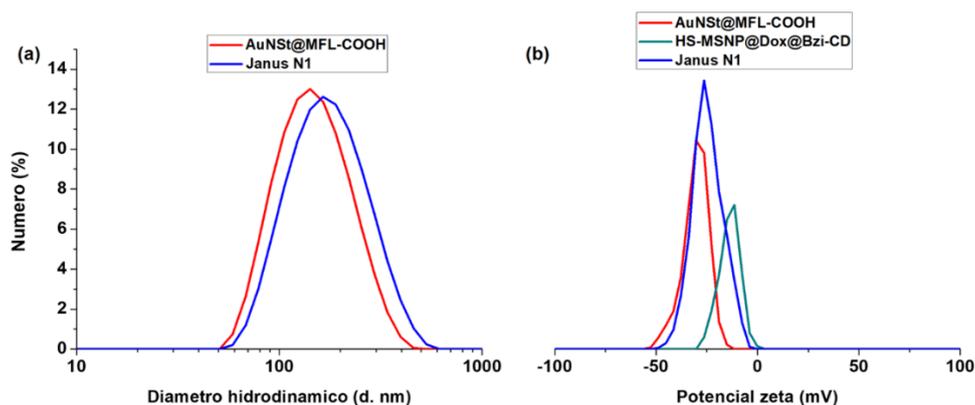
**Figura 10.** Imágenes de DF-STEM y análisis elemental de Au, Si y O por EDXS de las nanopartículas Janus N1. Barras de escala: 50 nm.

En la **Figura 11** se muestra el espectro de absorción y el patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas Janus N1. Las nanopartículas poseen un máximo de absorción a 810 nm que coincide con la longitud de onda del láser utilizado en los experimentos de fotoliberación de doxorubicina. El patrón de difracción de rayos X a ángulos bajos (PXR) de las nanopartículas Janus también muestra un máximo a  $2\theta = 2.50^\circ$  que se indexa al plano de difracción (100) de la celda unidad hexagonal de las MSNPs.<sup>[124, 129]</sup> En el patrón de difracción a ángulos altos se observan 4 máximos a  $2\theta = 38.21, 44.48, 64.76$  and  $77.74^\circ$ , que se indexan a los planos de difracción (111), (200), (220), and (311) del retículo cúbico centrado en las caras del Au, respectivamente.<sup>[142, 240, 243]</sup>



**Figura 11.** Espectro de absorción (a) y patrón de difracción de rayos X (b) de las nanopartículas Janus N1.

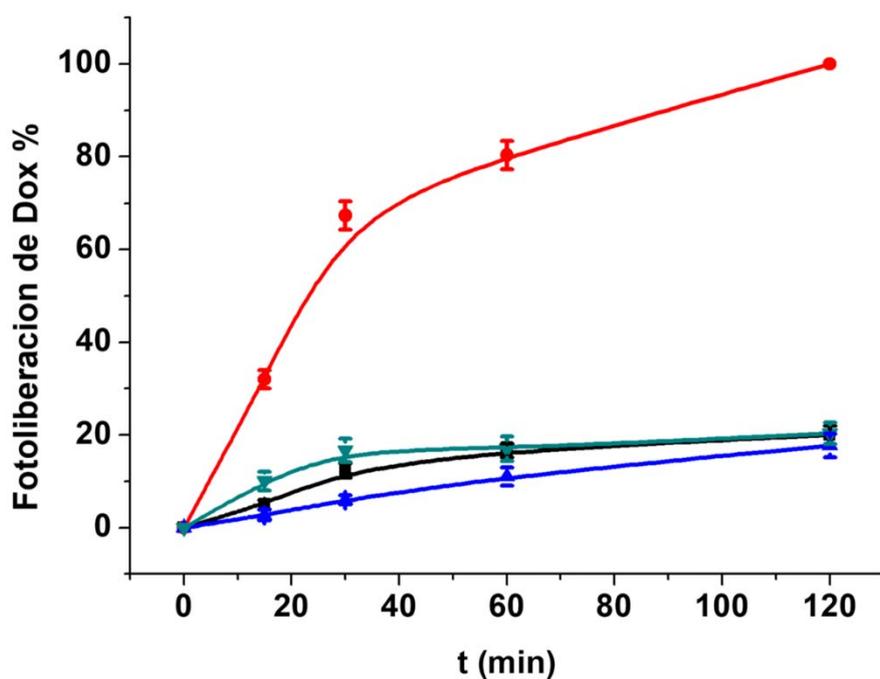
También se midieron por DLS el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas Janus N1. El diámetro hidrodinámico promedio y el potencial zeta tomaron valores de 188 nm y -27.5 mV, respectivamente (**Figura 12**). Además, se determinó la fracción de materia orgánica total en las nanopartículas Janus N1 por análisis termogravimétrico, obteniéndose un valor de 4.8 %.



**Figure 12.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico (a) y del potencial zeta (b) de las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH, HS-MSNP@Dox@Bzi-CD y Janus N1.

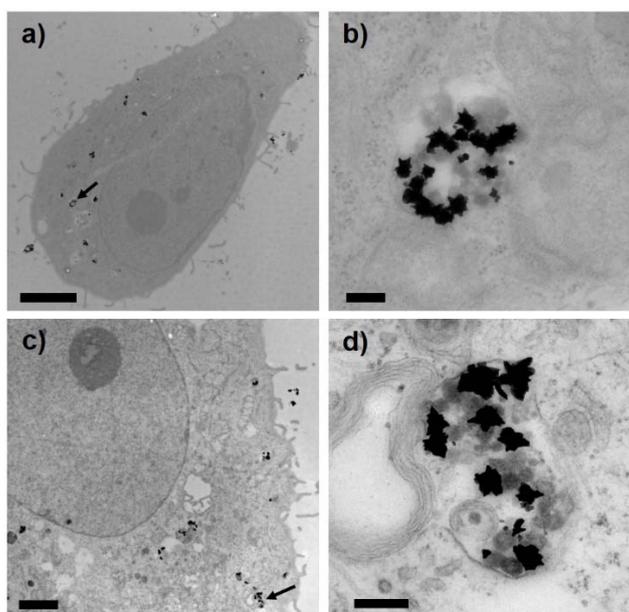
Para llevar a cabo los experimentos de fotoliberación de doxorrubicina, la suspensión de nanopartículas Janus N1 se irradió con el láser de 808 nm a  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , mientras que se utiliza una muestra control que no se irradia. La fotoliberación de doxorrubicina utilizando estas nanopartículas se determinó mediante la espectroscopía de fluorescencia, centrifugando las nanopartículas a tiempos de irradiación predeterminados y midiendo el espectro de los sobrenadantes. Como puede observarse en la **Figura 13**, la liberación de doxorrubicina fue casi nula cuando las partículas no se irradian (curva de color negro). Sin embargo, se produce una liberación apreciable de doxorrubicina después de la irradiación de las nanopartículas Janus N1 (curva de color rojo). La irradiación NIR de las nanopartículas Janus produce la foto-ruptura del espaciador 2-nitrobenílico y la generación del ácido succínico en la superficie de las AuNSts provocando la disociación del complejo supramolecular Bzi-CD, la apertura de los poros y la liberación de la Dox encapsulada en las MSNPs (**Figura 1**). Durante la irradiación las moléculas fotolábiles unidas a la superficie de las AuNSts absorben dos fotones de baja energía que activan el proceso foto-redox en el anillo aromático produciéndose la reducción del grupo nitro y la oxidación del carbono benílico conduciendo finalmente a la ruptura del enlace C-O y a la formación del ácido succínico.

Para comprobar el mecanismo de fotoliberación descrito anteriormente, también se realizaron experimentos de fotoliberación de doxorubicina similares, utilizando nanopartículas Janus cuyas AuNSts no se modificaron con el compuesto **10** (muestra control: curva de color azul; muestra irradiada: curva de color verde). En este caso no se produce una fotoliberación apreciable de doxorubicina debido a que no está presente la molécula efectora en la superficie de las AuNSts, lo que corrobora el mecanismo de fotoliberación descrito anteriormente basado en la fotodescomposición de la molécula fotolábil **10** sobre la superficie de las AuNSts, la consecuente generación de ácido succínico y la disociación del complejo Bzi-CD en la superficie de los poros de las MSNPs.



**Figura 13.** Fotoliberación de doxorubicina con radiaciones NIR utilizando nanopartículas Janus N1 (muestra control: curva de color negro; muestra irradiada: curva de color rojo) y nanopartículas Janus que no fueron funcionalizadas con el compuesto fotolábil **10** (muestra control: curva de color azul; muestra irradiada: curva de color verde).

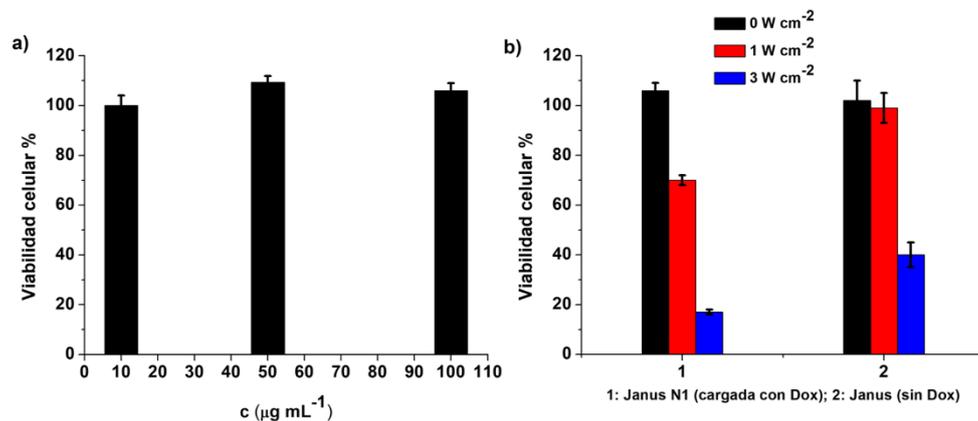
Para evaluar la potencial aplicación de las nanopartículas Janus N1 en la terapia del cáncer se realizaron experimentos de fotoliberación de doxorubicina en las células HeLa. Primero se evaluó la interacción de las nanopartículas con las células HeLa monitoreando la internalización celular de las nanopartículas por TEM (**Figura 14**). En las imágenes se puede observar que las nanopartículas se internalizan en las células eficientemente después de la incubación de las células con la suspensión de las nanopartículas en DMEM.



**Figura 14.** Imágenes de TEM de las células HeLa después de la incubación con las nanopartículas Janus N1. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  (a), 2  $\mu\text{m}$  (c), 200 nm (b,d).

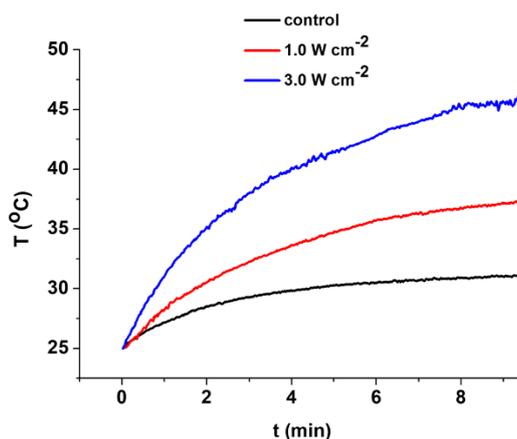
Las células se incubaron con las nanopartículas a diferentes concentraciones por 48 h y se determinó la viabilidad celular después del período de incubación utilizando el ensayo WST-1. Las nanopartículas Janus N1 no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, lo que demuestra que la doxorubicina está eficientemente encapsulada en el interior de las MSNPs (**Figura 15a**). Además, las células se incubaron con las nanopartículas Janus N1 o con nanopartículas similares que no están cargadas con la doxorubicina. Luego se irradiaron con un láser de 808

nm a diferentes potencias y finalmente se incubaron por 48 h antes de medir la viabilidad celular. Como se observa en la **Figura 15b**, la viabilidad celular disminuye después de la irradiación a bajas potencias de las nanopartículas Janus N1 debido a la fotoliberación de la doxorrubicina, mientras que la viabilidad de las células incubadas con las nanopartículas Janus que no están cargadas con doxorrubicina, permanece constante después de la irradiación, comparándose en ambos casos con las muestras no irradiadas. Sin embargo, para el caso de estas últimas nanopartículas, la viabilidad celular decrece después de la irradiación a altas potencias debido al efecto de la hipertermia.



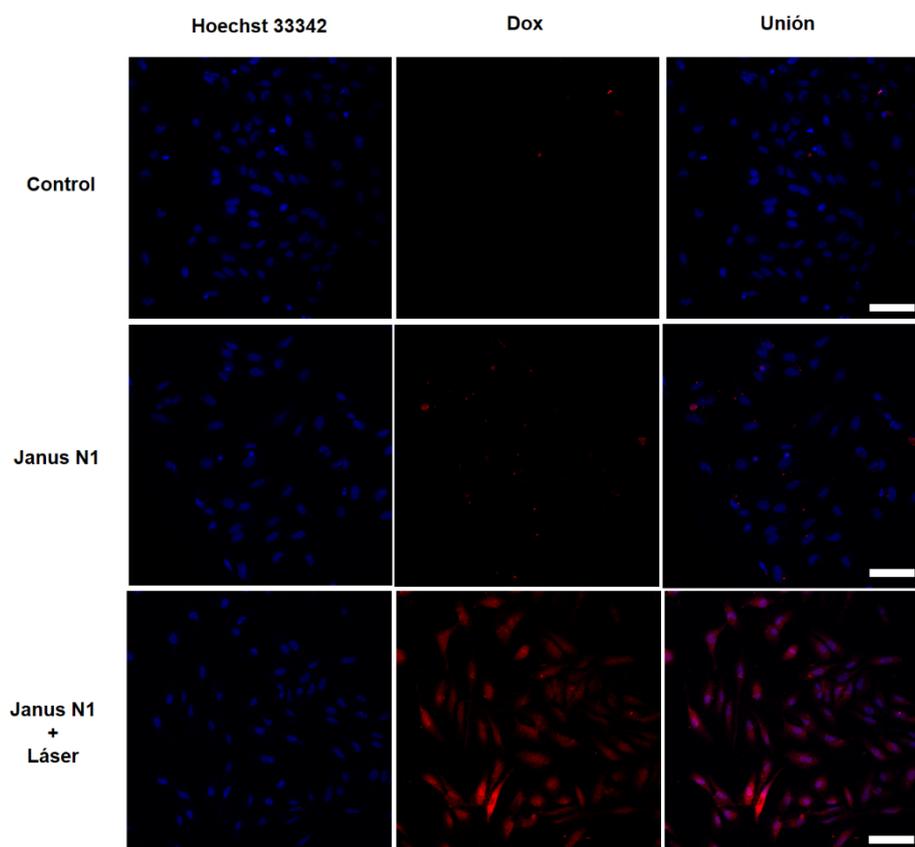
**Figure 15.** Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas Janus N1 a diferentes concentraciones (a). Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas Janus N1 y de las nanopartículas Janus que no están cargadas con doxorrubicina después de la irradiación con el láser de 808 nm a diferentes densidades de potencia por 10 min (b).

En la **Figura 16** se muestran los perfiles de temperatura de las suspensiones de las nanopartículas durante la irradiación a diferentes potencias. Se puede apreciar que la temperatura de la suspensión alcanza los 45 °C después de 10 min de irradiación a 3  $\text{W cm}^{-2}$ . Además, la disminución acentuada de la viabilidad celular cuando se irradian las nanopartículas Janus N1 a altas potencias se debe al efecto sinérgico de la hipertermia y la quimioterapia.



**Figura 16.** Variación de la temperatura de la suspensión de las nanopartículas Janus N1 durante la irradiación NIR a diferentes densidades de potencia del láser.

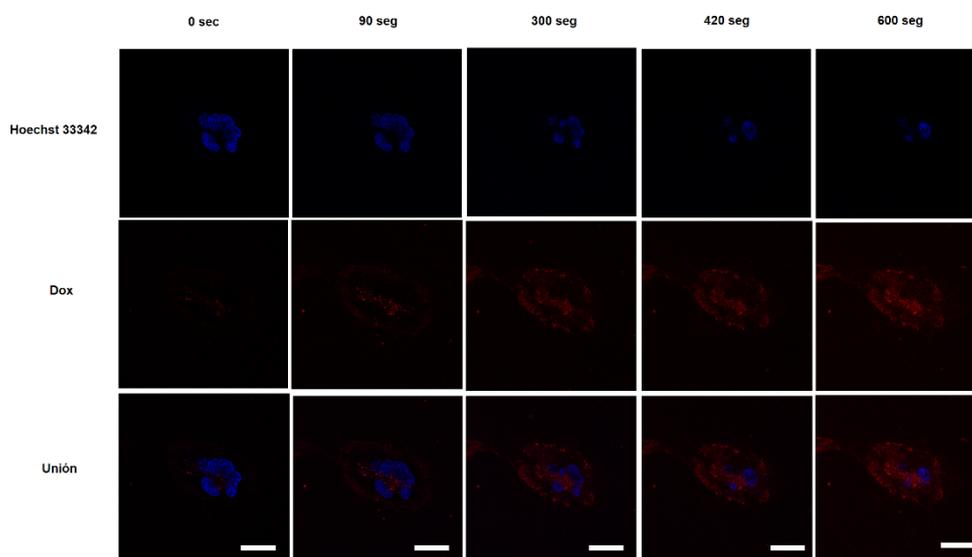
También, se realizó un experimento de fotoliberación de la doxorubicina en las células HeLa, utilizando la microscopía de barrido láser confocal. Las células se incubaron con las nanopartículas Janus N1 durante 2 h, luego se irradiaron con un láser de 808 nm y se incubaron por 2 h adicionales. Los núcleos de las células se marcan con el fluoróforo Hoechst 33342 y se monitorea la presencia intracelular de la doxorubicina midiendo las señales de fluorescencia de ambos fluoróforos en el microscopio confocal. En la **Figura 17** no se observa una señal de fluorescencia de la doxorubicina apreciable en las muestras no irradiadas. Por el contrario, se aprecia un aumento de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación de las células incubadas con las nanopartículas Janus N1. Estos resultados corroboran que se produce la fotoliberación intracelular de la doxorubicina después la irradiación NIR de las nanopartículas Janus N1, que provoca la disminución de la viabilidad celular, complementando los resultados expuestos anteriormente.



**Figura 17.** Fotoliberación de la Dox después de la irradiación NIR de las nanopartículas Janus N1 en las células HeLa empleando la microscopía de barrido láser confocal. De izquierda a derecha: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De arriba a abajo: células control (Control), células no irradiadas después de la incubación con las nanopartículas Janus N1 (Janus N1), células irradiadas después de la incubación con las nanopartículas Janus N1 (Janus N1 + Láser). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Por último, se realizaron experimentos de fotoliberación intracelular de la doxorubicina utilizando el láser del microscopio confocal para irradiar *in situ* las células incubadas con las nanopartículas a 633 nm. En la **Figura 18** se observa un incremento gradual de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la

irradiación durante 90 seg de las células incubadas con las nanopartículas Janus N1. Este resultado demuestra también, que se produce la fotoexcitación multifotónica del compuesto **5** sobre la superficie de la AuNSt, generándose ácido succínico que activa la liberación de la Dox encapsulada en la MSNP, debido a la descomposición del complejo supramolecular Bzi-CD en la superficie externa de los poros.



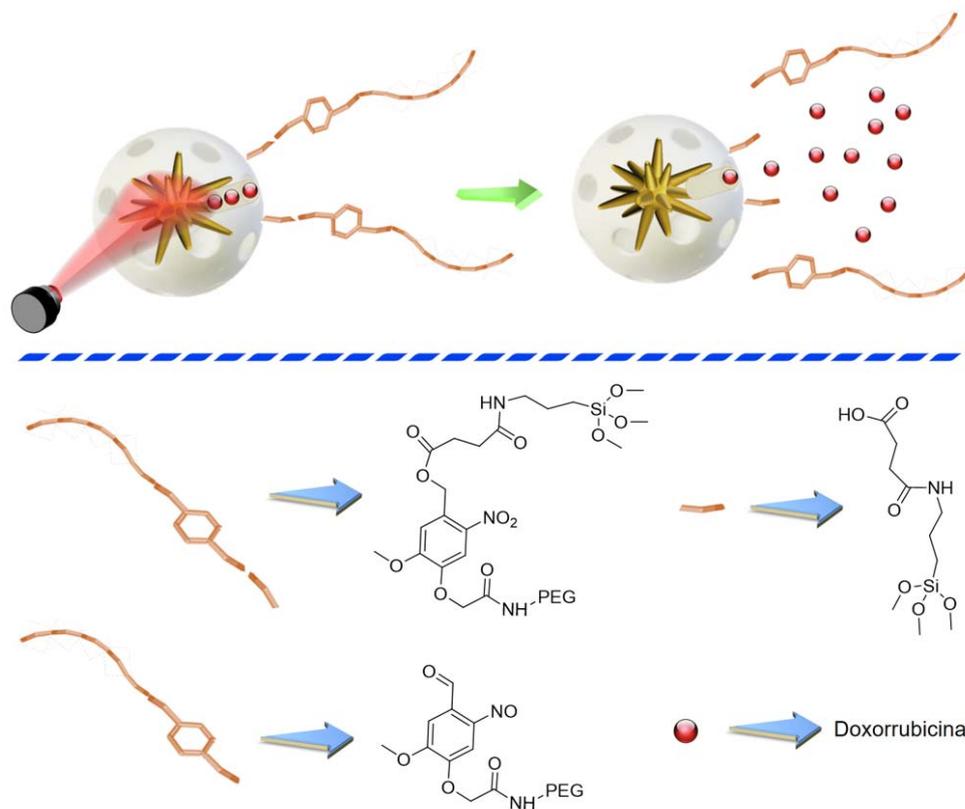
**Figura 18.** Fotoliberación de la Dox después de la irradiación *in situ* a 633 nm de las nanopartículas Janus N1 en las células HeLa empleando la microscopía de barrido láser confocal. De arriba a abajo: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De izquierda a derecha: antes de irradiar (0 seg), irradiación por 90 seg (90 seg) y después de irradiar (300, 420, 600 seg). Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

### *Fotoliberación de doxorubicina utilizando nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>*

En la **Figura 19** se muestra la representación del nanodispositivo N2 sintetizado en este trabajo basado en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. Las partículas se cargan con doxorubicina y la superficie externa de los poros se funcionaliza con un derivado fotolábil del polietilenglicol (PEG) **12** (**Figura 20**). Este compuesto actúa como puerta molecular fotosensible evitando la liberación del fármaco dentro de la

## Resultados y Discusión

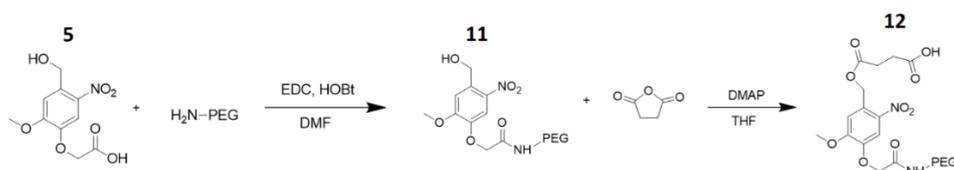
capa mesoporosa.<sup>[243-246]</sup> En la superficie de las nanopartículas N2 se produce la fotorruptura multifotónica molecular del compuesto fotolábil durante la irradiación con un láser NIR debido a la gran intensificación del campo electromagnético producido por las AuNSt. En este proceso se disocian las cadenas del PEG de la superficie externa de los poros provocando la liberación de la doxorrubicina.



**Figura 19.** Representación del nanodispositivo N2 basado en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> utilizado para la fotoliberación de la Dox empleando radiaciones NIR.

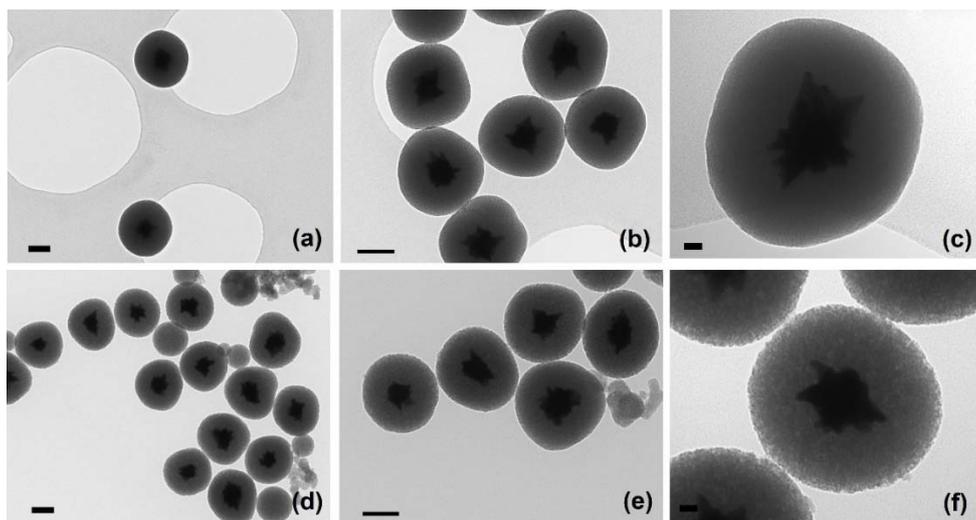
En primer lugar, se sintetizó a partir de la vainillina la molécula fotolábil **12** con una cadena de polietilenglicol (PEG) y un grupo carboxilo de forma similar a la síntesis del compuesto **10**. En este caso, la amidación del alcohol 2-nitrobencílico **5** con el PEG-NH<sub>2</sub> produce el PEG modificado con el espaciador 2-nitrobencílico **11**,

que se acopla con el anhídrido succínico para producir el PEG fotolábil con un grupo carboxilo **12** (Figura 20). Estos productos se caracterizaron por espectroscopía FTIR y RMN.

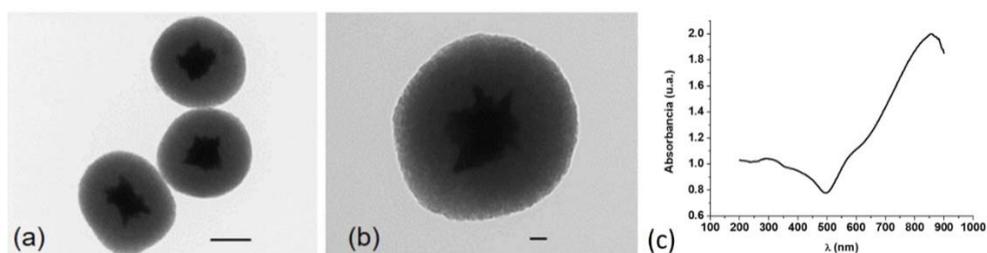


**Figura 20.** Síntesis de la molécula fotolábil **12** con un espaciador 2-nitrobencílico.

Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> se obtienen mediante el recubrimiento de las AuNSts con una capa mesoporosa de sílice siguiendo un procedimiento similar al empleado en el capítulo 1.<sup>[121, 139, 189, 194]</sup> Las nanopartículas híbridas se modifican con el (3-aminopropil)tri-etoxisilano durante el crecimiento de la capa mesoporosa de sílice mediante un proceso de co-condensación para obtener las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Figura 21 a,b,c). Luego se extrae el surfactante de los mesoporos lavando las nanopartículas con una disolución de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y se cargan con doxorubicina. Finalmente, se recubren los poros de las nanopartículas mediante una reacción de amidación con el PEG fotolábil con un grupo carboxilo **12**, previamente activado con EDC y NHS. Las imágenes de TEM de las nanopartículas N2 se muestran en la Figura 21 d, e, f y 22 a, b apreciándose un cambio en la morfología de la capa mesoporosa de sílice después de la funcionalización con el compuesto **12**. Las partículas tienen un máximo de absorción a 850 nm debido a la LSPR del núcleo de las AuNSts.



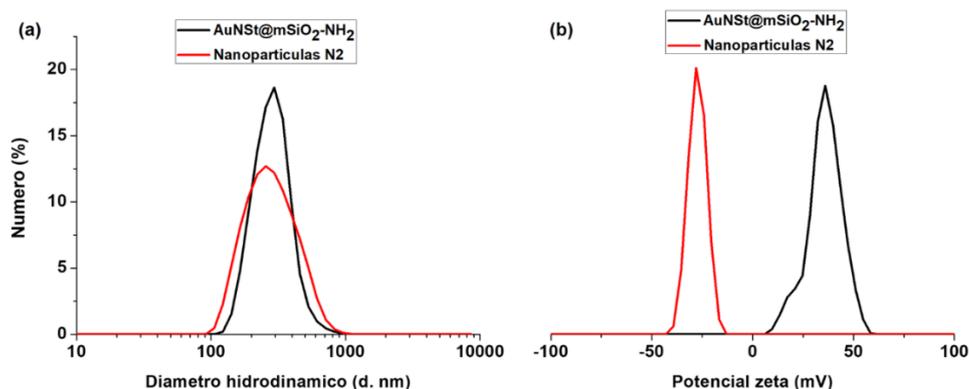
**Figura 21.** Imágenes de TEM de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (a,b,c) y N2 (d,e,f). Barras de escala: 100 nm (a,b,d,e), 20 nm (c,f).



**Figura 22.** Imágenes de TEM (a,b) y espectro de absorción (c) de las nanopartículas N2. Barras de escala: 100 nm (a), 20 nm (b).

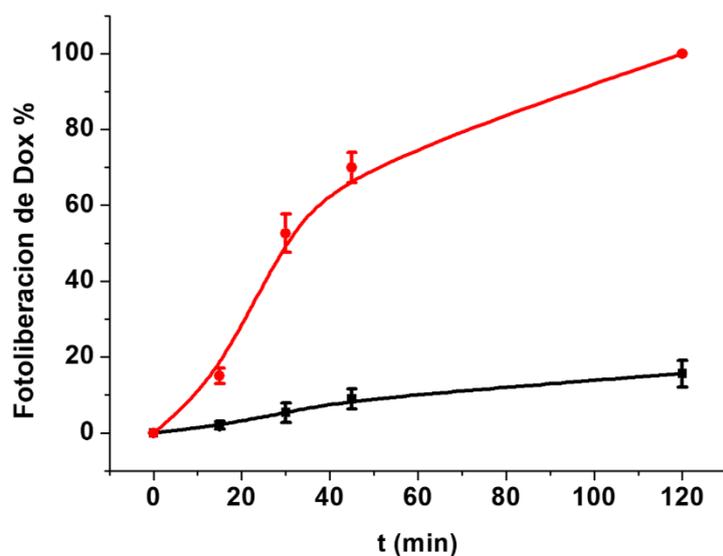
Las mediciones por DLS del diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas, confirman la presencia de la capa de polímero recubriendo las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se incrementa desde 296 a 301 nm después del cargado del fármaco y la funcionalización superficial con el PEG, mientras que el potencial zeta disminuye desde +35.7 a -19.0 mV debido a la modificación de los grupos aminos con el PEG fotolábil **12** en la superficie externa de la capa mesoporosa (**Figura 23**).

También, se determinó la fracción de materia orgánica total en las nanopartículas N2 por análisis termogravimétrico, obteniéndose un valor de 15 %.



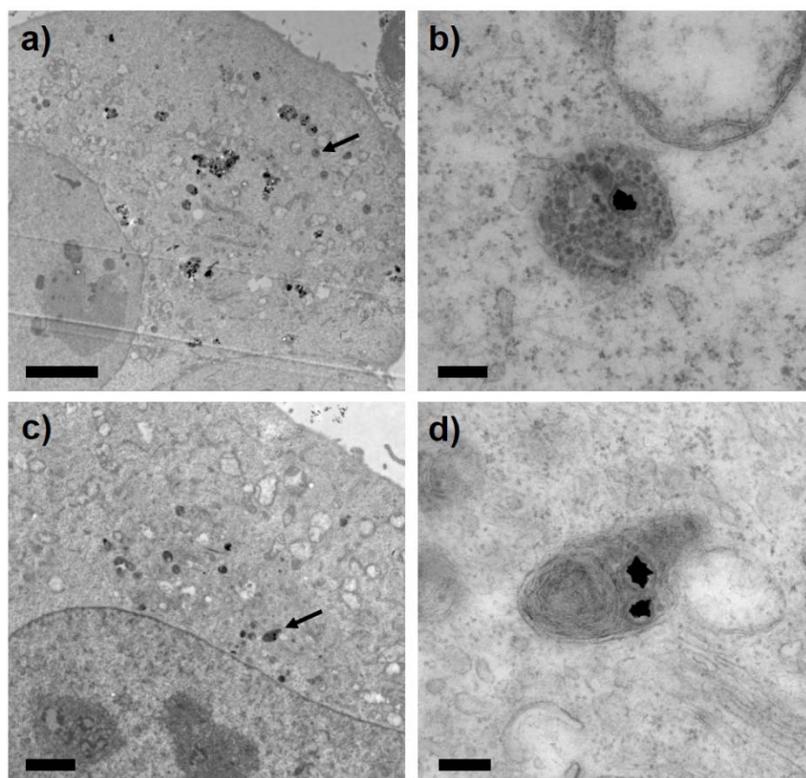
**Figura 23.** Distribuciones por DLS del diámetro hidrodinámico (a) y del potencial zeta (b) de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> y N2.

Para determinar la capacidad de las nanopartículas N2 para la fotoliberación de la doxorrubicina activada por radiaciones NIR, se irradió la suspensión de las nanopartículas con un láser de 808 nm a  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , mientras que una muestra utilizada como control no fue irradiada. A determinados intervalos de tiempo se determina la doxorrubicina liberada midiendo los espectros de fluorescencia de los sobrenadantes de ambas muestras. En la **Figura 24** se observa que no se produce una liberación de Dox apreciable cuando las nanopartículas no se irradian (curva negra). Sin embargo, se evidencia una liberación de doxorrubicina significativa durante la irradiación de las nanopartículas con un láser NIR (curva roja). La irradiación NIR de las nanopartículas N2 produce la fotodisociación del espaciador 2-nitrobenzílico sobre la superficie externa de los poros, la liberación del PEG que provoca la apertura de los poros y la difusión de la doxorrubicina desde el interior de la capa mesoporosa hacia el medio.



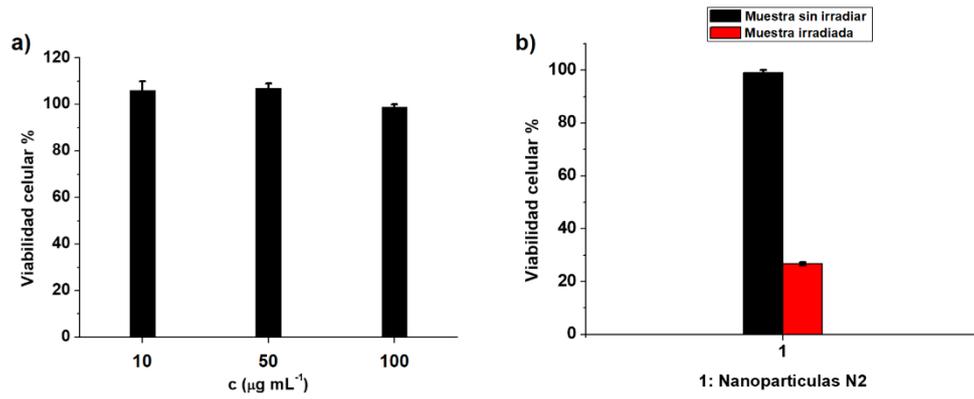
**Figura 24.** Fotoliberación de doxorubicina con radiaciones NIR utilizando nanopartículas N2 (muestra control: curva de color negro; muestra irradiada: curva de color rojo).

Para evaluar la potencial aplicación de las nanopartículas N2 en la terapia del cáncer se realizaron experimentos de fotoliberación de doxorubicina en las células HeLa. Primero se evaluó la interacción de las nanopartículas con las células HeLa monitoreando la internalización celular de las nanopartículas por TEM (**Figura 25**). En las imágenes se puede observar que las nanopartículas se internalizan en las células eficientemente después de la incubación de las células con la suspensión de las nanopartículas en DMEM.



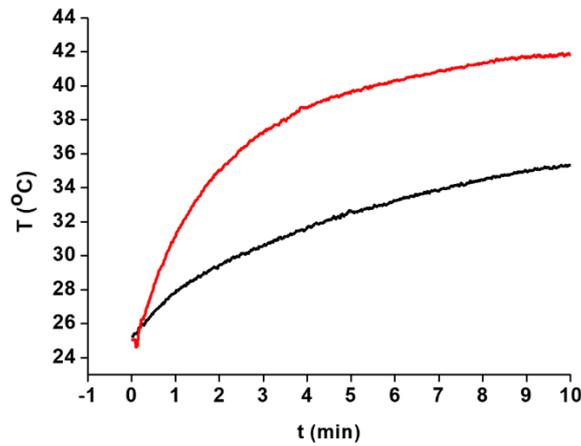
**Figura 25.** Imágenes de TEM de las células HeLa después de la incubación con las nanopartículas N2. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  (a), 2  $\mu\text{m}$  (c), 200 nm (b,d).

Las células se incubaron con las nanopartículas a diferentes concentraciones por 48 h y se determinó la viabilidad celular después del período de incubación utilizando el ensayo WST-1. Las nanopartículas N2 no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, lo que demuestra que la doxorubicina está eficientemente encapsulada en el interior de la capa mesoporosa de sílice de las nanopartículas N2 (**Figura 26a**). También, las células se incubaron con las nanopartículas N2, se irradiaron con un láser de 808 nm a  $1 \text{ W cm}^{-2}$  y finalmente se incubaron por 48 h antes de medir la viabilidad celular. Como se observa en la **Figura 26b**, la viabilidad celular disminuye después de la irradiación de las nanopartículas N2 debido principalmente a la fotoliberación de la doxorubicina.

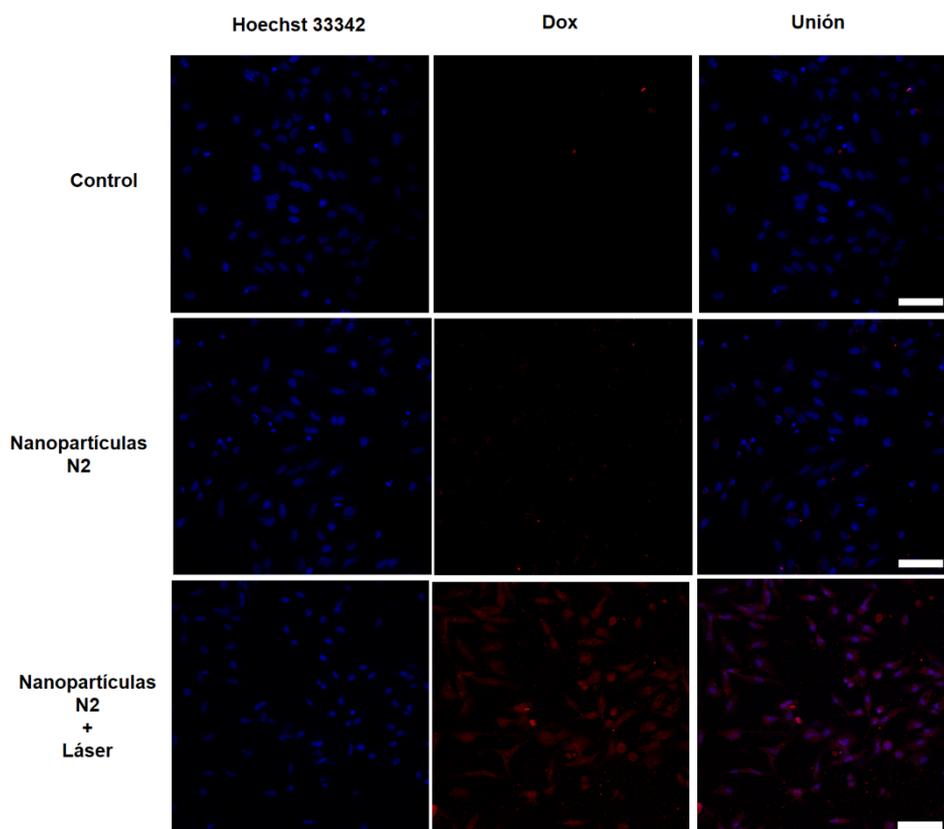


**Figure 26.** Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas N2 a diferentes concentraciones (a). Viabilidad de las células HeLa en presencia de las nanopartículas N2 después de la irradiación con el láser de 808 nm por 10 min (b).

En la **Figura 27** se muestran los perfiles de temperatura de las suspensiones de las nanopartículas durante la irradiación. Se puede apreciar que la temperatura de la suspensión no alcanza los 42 °C después de 10 min de irradiación por lo cual el efecto de la hipertermia sobre la viabilidad celular es menor.



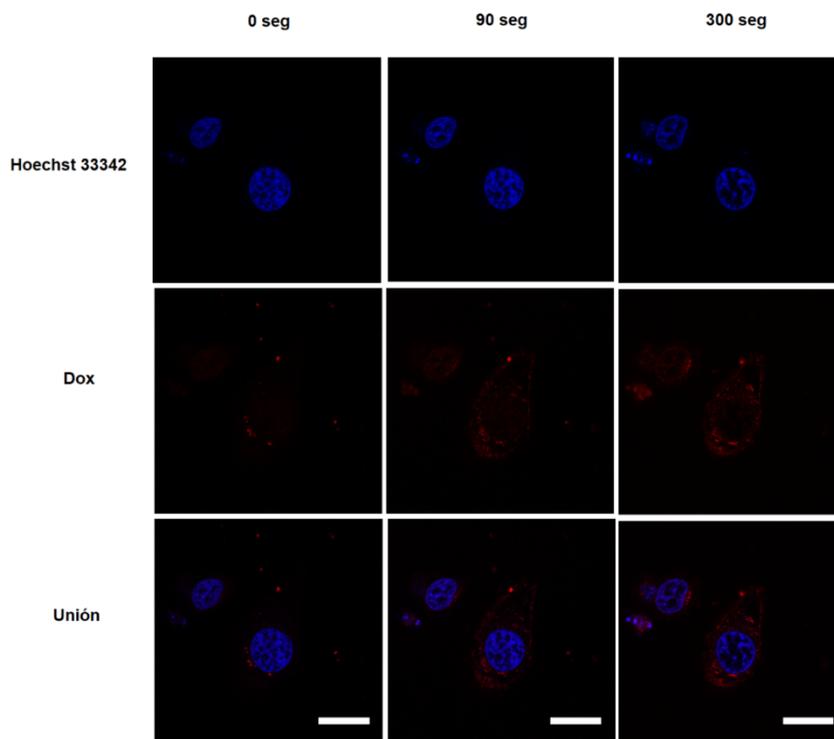
**Figura 27.** Variación de la temperatura de la suspensión de las nanopartículas N2 durante la irradiación NIR (muestra control: curva de color negro; muestra irradiada: curva de color rojo).



**Figura 28.** Fotoliberación de la Dox después de la irradiación NIR de las nanopartículas N2 en las células HeLa empleando la microscopía de barrido láser confocal. De izquierda a derecha: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De arriba a abajo: células control (Control), células no irradiadas después de la incubación con las nanopartículas N2 (Nanopartículas N2), células irradiadas después de la incubación con las nanopartículas N2 (Nanopartículas N2 + Láser). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

También, se realizó un experimento de fotoliberación de la doxorubicina en las células HeLa, utilizando la microscopía de barrido láser confocal. Las células se incubaron con las nanopartículas N2 durante 2 h, luego se irradiaron con un láser de 808 nm y se incubaron por 2 h adicionales. Los núcleos de las células se marcan con el fluoróforo Hoechst 33342 y se monitorea la presencia intracelular de la

doxorubicina midiendo las señales de fluorescencia de ambos fluoróforos en el microscopio confocal. En la **Figura 28** no se detecta una señal de fluorescencia de la doxorubicina apreciable en las muestras no irradiadas. Por el contrario, se observa un incremento de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación de las células incubadas con las nanopartículas N2. Este resultado demuestra que se produce la fotoliberación intracelular de la doxorubicina después la irradiación NIR de las nanopartículas N2, que provoca la disminución de la viabilidad celular, corroborando los resultados expuestos anteriormente.



**Figura 29.** Fotoliberación de la Dox después de la irradiación *in situ* a 633 nm de las nanopartículas N2 en las células HeLa empleando la microscopía de barrido láser confocal. De arriba a abajo: señales de fluorescencia del marcador de ADN (Hoechst 33342), la doxorubicina (Dox) y señales conjuntas (Unión). De izquierda a derecha: antes de irradiar (0 seg), irradiación por 90 seg (90 seg) y después de irradiar (300 seg). Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

Por último, se realizaron experimentos de fotoliberación intracelular de la doxorubicina utilizando el láser del microscopio confocal para irradiar *in situ* las células incubadas con las nanopartículas a 633 nm. En la **Figura 29** se observa un incremento gradual de la señal de fluorescencia de la doxorubicina después de la irradiación durante 90 seg de las células incubadas con las nanopartículas N2. Este resultado demuestra también, que se produce la fotodescomposición del PEG sobre la superficie de la capa mesoporosa de las partículas que conduce finalmente a la difusión de la Dox desde el interior de los poros.

Estos resultados muestran que los nanodispositivos N1 y N2 basados en nanopartículas Janus AuNSt-MSNP y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>, respectivamente, pueden ser excelentes plataformas para la fotoliberación de doxorubicina con radiaciones NIR en aplicaciones para la terapia del cáncer. El método utilizado en este trabajo permite la preparación de sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en AuNSts y MSNPs con diferentes morfologías, que poseen pérdidas mínimas del fármaco encapsulado y cuyo mecanismo de liberación se basa en la fotodescomposición molecular multifotónica de derivados 2-nitrobenzólicos.

### 3.3. Conclusiones

En este trabajo se desarrollaron dos sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en la foto-ruptura con radiaciones NIR de un espaciador 2-nitrobenzólico utilizando nanopartículas Janus AuNSt-MSNP y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. El funcionamiento adecuado de estos materiales híbridos se basa en el empleo de moléculas fotolábiles que poseen un espaciador 2-nitrobenzólico que pueden enlazarse a la superficie de las AuNSts en las nanopartículas Janus o actuar como puertas moleculares sobre la superficie de la capa mesoporosa de sílice en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. Estas moléculas fotolábiles se disocian durante la irradiación NIR de las nanopartículas basadas en AuNSt provocando en última instancia la liberación de la doxorubicina desde las nanopartículas híbridas. Ambas nanopartículas no mostraron toxicidad hacia las células HeLa, demostrando la eficiencia de encapsulación del fármaco en la fase mesoporosa de sílice. La viabilidad celular disminuye después de la irradiación de ambas nanopartículas con un láser de 808

nm, debido a la liberación intracelular de la doxorrubicina. La metodología utilizada en este trabajo se puede extender para la síntesis de otros sistemas de fotoliberación de fármacos utilizando radiaciones NIR basados en nanopartículas Janus AuNSt-MSNP empleando otras puertas moleculares sobre la superficie de las MSNPs y otras moléculas efectoras asociadas sobre la superficie de las AuNSts a través de diferentes espaciadores fotolábiles y basados en nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> empleando otras puertas moleculares fotosensibles asociadas a la superficie externa de los poros de la capa mesoporosa a través de diferentes espaciadores fotolábiles.

### **Materiales y Métodos**

#### **1. Reactivos y línea celular**

Ácido tetracloroáurico 30%, citrato de sodio trihidratado, polivinilpirrolidona (PVP,  $M_w=10000 \text{ g mol}^{-1}$ ), N,N-dimetilformamida (DMF), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), tetraetoxisilano (TEOS), amoníaco 32%, nitrato de amonio, octadeciltrimetoxisilano (ODTMS), heneicosano, (3-aminopropil)tri-etoxisilano (APTES), (3-iodopropil)tri-etoxisilano (IPTMS), (3-mercaptopropil)tri-etoxisilano, benzimidazol (Bzi),  $\beta$ -ciclodextrina (CD), cera de parafina, vainillina, bromoacetato de etilo, carbonato de sodio, ácido nítrico 70%, anhídrido acético, ácido acético glacial (AcOH), ácido clorhídrico 36 %, hidróxido de sodio, borohidruro de sodio, cloruro de sodio, sulfato de sodio anhidro, trietilamina, dihidrocloruro de cistamina, hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (HOBt), alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico, cloroformiato de 4-nitrofenilo, cloroformiato de 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo, cisteamina, anhídrido succínico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y metoxipolietilenglicol amina (PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w=750 \text{ g mol}^{-1}$ ) se adquirieron en Aldrich. Hidrocloreuro de doxorubicina (Dox) se adquirió en Carbosynth Limited. Los disolventes de grado analítico se adquirieron en Scharlau. Las células HeLa se adquirieron en el Centro alemán de recursos para materiales biológicos. El DMEM, FBS, PBS, tripsina, Hoechst 33342 y WST-1 se adquirieron en Sigma-Aldrich.

#### **2. Técnicas de caracterización**

##### *Microscopía electrónica y espectroscopía de emisión de rayos X*

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se tomaron en un microscopio JEOL JEM-1010 operando a 100 kV. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y de transmisión y barrido de campo oscuro (DF-STEM), los espectros de emisión de rayos X (EDXS) y los mapas de elementos de EDXS se adquirieron en un microscopio JEOL JEM-2100F

operando a 200 kV. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) se obtuvieron en un microscopio ZEISS ULTRA55.

### *Difracción de rayos X.*

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización de materiales cristalinos basada en la relación que existe entre el ángulo formado por los haces de rayos X difractados por el material y los haces incidentes y la distancia entre los planos que forman los átomos debido su ordenamiento en el cristal. Esta relación se expresa a través de ley de Bragg:  $2d \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda$ , donde  $d$  es la distancia interplanar,  $\theta$  es el ángulo formado entre los haces incidentes y difractados,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X y  $n$  es un número entero. Esta ley determina que la posición angular de los máximos de difracción depende del ordenamiento atómico particular de cada material cristalino. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron en un difractómetro de polvo Bruker AXS D8 utilizando la radiación Cu-K $\alpha$ .

### *Porosimetría*

Las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> se obtuvieron en un analizador Micromeritics ASAP2010. Las muestras se desgasificaron a 120 °C a vacío durante 16 h. El área superficial específica se calculó a partir de los datos de adsorción en el intervalo de bajas presiones utilizando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). El tamaño de los poros se determinó utilizando el modelo de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

### *Análisis termogravimétrico*

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en un equipo TGA/SDTA 851e Mettler Toledo, usando una atmósfera oxidante (Aire, 80 mL min<sup>-1</sup>) con un programa que consiste en una etapa de calentamiento desde 298 K a 373 K con una velocidad de calentamiento de 10 K min<sup>-1</sup>, una segunda etapa isotérmica a 373 K durante 30 minutos, una tercera etapa de calentamiento desde 373 K a 1273 K con una velocidad de calentamiento de 10 K min<sup>-1</sup> y finalmente una etapa isotérmica a 1273 K durante 30 minutos.

### *Dispersión dinámica de la luz*

La dispersión dinámica de la luz es una técnica que permite determinar el diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión coloidal debido a la correlación entre la dispersión de la radiación electromagnética por las partículas en movimiento browniano y la velocidad de ese movimiento que depende del tamaño de las partículas. También existe una correlación entre la dispersión de la luz por las partículas y su movilidad electroforética al aplicar una diferencia de potencial eléctrico, lo que permite determinar el potencial zeta relacionado con la densidad de carga eléctrica superficial de las partículas. El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se obtuvieron por dispersión dinámica de la luz (DLS) usando un instrumento Malvern Zeta sizer Nano ZS con un láser de 633 nm.

### *Espectroscopía FT-IR*

La espectroscopía FT-IR es una técnica que permite determinar la presencia de ciertos grupos funcionales en las moléculas debido a la excitación de sus estados vibracionales por la radiación del infrarrojo. Las frecuencias de las vibraciones de estos grupos funcionales son independientes del resto de las vibraciones de la molécula por lo que absorben la radiación infrarroja en un intervalo estrecho de frecuencias del espectro. Los espectros FT-IR se adquirieron en un espectrómetro Bruker TENSOR27.

### *Espectroscopía de absorción UV-Visible*

La espectroscopía UV-Visible permite determinar la presencia de insaturaciones conjugadas en las moléculas debido a la excitación de los estados electrónicos con simetría  $\pi$  de carácter enlazante y antienlazante (transiciones  $\pi-\pi^*$ ) producto de la absorción de la radiación en el intervalo de 200-800 nm. También permite la determinación cuantitativa de las moléculas que absorben en este intervalo del espectro, debido a la relación lineal que existe entre la absorbancia a una longitud de onda y la concentración, según la ley de Lambert-Beer:  $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$ , donde  $A$  es la absorbancia de la disolución a una longitud de onda,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la molécula a la misma longitud de onda,  $l$  es el paso óptico de la cubeta

---

utilizada para medir el espectro y  $c$  es la concentración de la disolución. Los espectros de extinción óptica se adquirieron en un espectrofotómetro JASCO V-650 UV/Vis.

### *Espectroscopía de fluorescencia*

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica muy sensible y específica que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de ciertas moléculas capaces de emitir luz después de la absorción de la radiación UV-Visible, debido a que se producen transiciones entre el estado electrónico excitado y el estado base de las moléculas con la consiguiente pérdida de energía en forma de fotones emitidos. Los espectros de emisión se obtuvieron en un espectrofluorímetro JASCO FP-8300 (Hitachi High Technologies).

### *Espectroscopía RMN*

La espectroscopía RMN permite la elucidación estructural de las moléculas orgánicas debido a la interacción de los núcleos (fundamentalmente  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) con un momento de espín distinto de cero (se comportan como dipolos magnéticos) con un campo magnético externo. En estas condiciones los momentos magnéticos de los núcleos precesan alrededor del campo magnético externo con una frecuencia que depende, según la relación:  $\nu = \gamma \cdot B_0 \cdot (1 - \sigma) / 2 \cdot \pi$ , de la razón magnetogirica del núcleo ( $\gamma$ ), de la intensidad del campo magnético externo ( $B_0$ ) y de la densidad electrónica o entorno químico del núcleo expresado numéricamente como constante de apantallamiento o blindaje ( $\sigma$ ). Cada núcleo interactúa con una radiación con una radiofrecuencia igual a su frecuencia de precesión (resonancia) debido a que se producen transiciones entre sus estados de espín nuclear correspondientes a los diferentes ángulos formados entre el momento magnético del núcleo y el campo externo durante la precesión. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se adquirieron a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Bruker 400 Avance III. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) en orden creciente del campo magnético y se referencian con respecto a la señal residual del disolvente. Las constantes de acoplamiento escalar ( $J$ ) se reportan en hertz (Hz). Las

abreviaturas para indicar la multiplicidad de las señales son las siguientes: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete. También se realizaron experimentos multipulsos (DEPT-135) y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) para asignar todas las señales de resonancia a los núcleos correspondientes en la estructura molecular de los compuestos sintetizados.

### *Espectrometría de masas*

La espectrometría de masas es una técnica que permite determinar la masa molecular y la identidad de los diferentes compuestos orgánicos. Las moléculas en fase gaseosa o en fase condensada se ionizan utilizando diferentes métodos, luego los iones formados pueden ser diferenciados según su relación masa/carga ( $m/z$ ) utilizando diferentes analizadores y finalmente se detectan transformando el flujo de iones en una corriente eléctrica. En la ionización por electrospray (ESI) se hace pasar la muestra en fase líquida por un fino capilar que se le aplica una diferencia de potencial eléctrico elevado y al mismo tiempo se nebuliza la muestra con un flujo de un gas inerte. En estas condiciones se forman gotas pequeñas altamente cargadas que tienden a dividirse en fragmentos cada vez más pequeños debido a la repulsión electrostática provocando la desolvatación y la formación de iones multicargados en fase gaseosa. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) permite diferenciar los iones con diferentes relaciones  $m/z$ , por el tiempo que tardan en llegar al detector después que son acelerados con un campo eléctrico, para lograr la uniformidad de sus energías cinéticas antes de entrar al analizador. Los iones de menor masa se moverán con mayor velocidad y llegarán en menor tiempo al detector que los iones de mayor masa. El espectro de masa de alta resolución del compuesto **2** se adquirió en un espectrómetro ESI-TOF.

### *Cromatografía de capa fina*

El avance de las reacciones se monitoreó por cromatografía de capa fina (TLC) utilizando láminas de Al precubiertas con sílica gel de SIGMA-ALDRICH con indicador fluorescente 254 nm. (60 Å de diámetro de poro medio).

### *Cromatografía líquida de alta resolución*

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución con fase reversa (RP-HPLC) se realizaron en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 con un detector PDA (Arreglo de fotodiodos), utilizando una columna cromatográfica con fase reversa Acclaim(R) (120, C18, 250x4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ ) a 30  $^{\circ}\text{C}$  y un flujo de la fase móvil de 0.7 mL  $\text{min}^{-1}$ . El método utilizado se basa en un gradiente lineal empleando una mezcla de disolventes A (0.1% AcOH en agua) y B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) comenzando con una proporción A/B = 90/10 v/v y alcanzando A/B = 80/20 v/v en 10 min; 70/30 en 17 min; 60/40 en 20 min; 40/60 en 25 min y 0/100 en 30 min. Finalmente, se incrementa la proporción de A desde 0–100% en 10 min. Todos los cromatogramas se registran a 290 nm.

### **3. Síntesis de materiales**

#### *Síntesis de las nanopartículas de oro de 15 nm y 40 nm*

Las nanopartículas de oro recubiertas con citrato con diámetros de 15 nm y 40 nm se obtuvieron utilizando el método de Turkevich-Frens<sup>[98-99, 247]</sup> y de Bastús,<sup>[248]</sup> respectivamente. Ambas muestras de nanopartículas se recubrieron con PVP utilizando el procedimiento reportado por Graf.<sup>[249]</sup> La concentración de Au en las suspensiones de estas nanopartículas se calcularon a partir de los espectros de absorción ( $\epsilon = 2400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 400 nm).<sup>[193, 250-251]</sup>

#### *Síntesis de las nanoestrellas de oro de 120 nm (AuNSt)*

Las AuNSts se obtuvieron empleando el método de crecimiento de semillas en una disolución concentrada de PVP en DMF<sup>[44, 114, 181]</sup> con algunas modificaciones. A 25  $^{\circ}\text{C}$ , se adicionan 750  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (166 mM) a 150 mL de una disolución de PVP en DMF (10 mM). Después de 5 min, se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de semillas sintetizadas previamente (nanoesferas de oro de 15 nm recubiertas con PVP en etanol,  $c(\text{Au}) = 6.5 \text{ mM}$ ). La mezcla de reacción se mantiene sin agitación por 24 h. Las nanopartículas se separan del medio por centrifugación (20 min; 9500 rpm) y se lavan con agua 5 veces por redispersión y

centrifugación. La concentración de AuNSts en las suspensiones se calcula conociendo el número de átomos de Au por nanopartículas que se puede estimar asumiendo que las nanopartículas tienen una morfología cuasi-esférica para determinar su volumen a partir de las imágenes de TEM.

### *Síntesis de AuNSt de 250 nm recubiertas de PVP (AuNSt@PVP)*

Las AuNSts se obtuvieron empleando el método de crecimiento de semillas en una disolución concentrada de PVP en DMF [24] con algunas modificaciones. A 25 °C, se adicionan 75 µL de una disolución acuosa de HAuCl<sub>4</sub> (166 mM) a 15 mL de una disolución de PVP en DMF (10 mM). Después de 5 min, se adicionan 10 µL de una suspensión de semillas sintetizadas previamente (nanoesferas de oro de 40 nm recubiertas con PVP en etanol, c(Au) = 8.5 mM). La mezcla de reacción se mantiene sin agitación por 24 h. Las nanopartículas se separan del medio por centrifugación (20 min; 9500 rpm) y se lavan con agua una vez por redispersión y centrifugación.

### *Síntesis de AuNSt recubiertas con una capa mesoporosa de sílice (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>)*

Se mezclan 50 mL de una disolución acuosa de CTAB (6.6 mM) con 20 mL de etanol a 25 °C en un balón de 250 mL utilizando un agitador magnético (400 rpm). Se burbujeó Ar en la disolución durante 1 h y se mantiene la atmósfera de Ar durante toda la reacción. Cuando se eliminaron las burbujas en la disolución, se adicionan 50 µL de amoníaco 32%. Luego se adicionan al balón 3 mL de la suspensión de AuNSt de 120 nm (c(Au) = 5 mM). Después de 5 min, se adiciona gota a gota un volumen predefinido de TEOS (30-40 µL) a la mezcla de reacción. Se varió la cantidad de TEOS en la mezcla para obtener las nanopartículas híbridas con el tamaño deseado. Después de 24 h las partículas se separan del medio por centrifugación (10 min, 9500 rpm) y se lavan dos veces con etanol. Finalmente, las moléculas de CTAB se eliminan mediante un proceso de extracción dispersando las nanopartículas en 50 mL de una disolución de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> en etanol (10 mg mL<sup>-1</sup>). La mezcla se agita por 2 horas y las partículas se recuperan por centrifugación. Se repite

este procedimiento de extracción 4 veces para extraer el CTAB de los poros. Las partículas se secan a vacío.

### *Síntesis de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina*

El proceso de cargado de la doxorubicina (Dox) dentro de los mesoporos de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> y la posterior funcionalización de la superficie externa con ODTMS y heneicosano se realizó utilizando un procedimiento descrito anteriormente<sup>[202]</sup> con algunas modificaciones. Se dispersan 2 mg de las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> en 2 mL de etanol. Luego se adiciona 1 mg de Dox y 20 µL de ODTMS y se agita la mezcla por 12 h a 25 °C. Las nanopartículas se recuperan por centrifugación y se secan a vacío. Las nanopartículas cargadas con doxorubicina se dispersan en 10 mL de *n*-hexano y se adiciona 1 mL de una disolución de heneicosano en *n*-hexano (20 mg mL<sup>-1</sup>). La mezcla se dispersa por períodos cortos (1 min) durante 30 minutos utilizando un baño ultrasónico. Finalmente, las nanopartículas se recuperan por centrifugación y se secan a vacío. La fracción de materia orgánica total en las nanopartículas se determinó mediante análisis termogravimétrico (TGA). La cantidad de doxorubicina cargada en las nanopartículas se determinó espectrofotométricamente dispersando 1 mg de nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina en 1 mL de agua. Luego, la suspensión de nanopartículas se calienta a 60 °C por 12 h para fundir la capa de parafina sobre la superficie de las nanopartículas y extraer la Dox desde el interior de los poros hacia el medio. Finalmente, después de centrifugar las nanopartículas, se midió la absorbancia del sobrenadante a 480 nm para determinar la concentración de Dox empleando una curva de calibración.

### *Síntesis de las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub>*

Para la modificación de las AuNSts con el profármaco de la doxorubicina con un grupo disulfuro, se dispersan las nanopartículas en una disolución del compuesto **8** en THF y se agitan durante 18 h. Las nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> se colectan por centrifugación, se lavan 5 veces con THF y se redispersan en H<sub>2</sub>O.

### *Síntesis de las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH*

Para la modificación de las AuNSts con la molécula fotolábil con un espaciador 2-nitrobencílico y un grupo tiol, se dispersan las nanopartículas en una disolución del compuesto **10** en THF y se agitan durante 18 h. Las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH se colectan por centrifugación, se lavan 5 veces con THF y se redispersan en H<sub>2</sub>O.

### *Síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice (estructura mesoporosa del tipo MCM-41)*

Se disuelve 1 g (2.74 mmol) de CTAB en 480 mL de agua. Luego se adicionan 3.5 mL de una disolución acuosa de NaOH (2 M) y se incrementa la temperatura de la mezcla a 80 °C. Se adiciona gota a gota el TEOS (5 mL, 22.4 mmol) a la mezcla mientras se agita a 800 rpm. La agitación se mantiene durante 2 h obteniéndose un precipitado blanco. Finalmente, el sólido se aísla por centrifugación, se lava varias veces con agua y se seca a 60 °C durante 18 h. Para obtener el material mesoporoso final (MSNPs), el sólido se calcina a 550 °C utilizando una atmósfera oxidante por 5 h con el objetivo de eliminar las moléculas de surfactante en el interior de los poros.

### *Síntesis de las nanopartículas Janus NI (AuNSt-MSNPs)*

Las MSNPs (180 mg) se dispersan en 9 mL de una disolución acuosa (6.7 % etanol) de CTAB (1 μM). La mezcla se calienta a 75 °C, y luego se adiciona 1 g de cera de parafina. Cuando la parafina se funde, la mezcla se agita vigorosamente durante 15 min utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T-8 (IKA). Luego, la mezcla se agita magnéticamente a 1500 rpm por 1 h a 75 °C. La emulsión Pickering resultante se enfría a 25 °C, se adicionan 9 mL de metanol y 180 μL de (3-mercaptopropil)trióxido de silano y se agita por 3 h. El sólido se colecta por centrifugación, se lava con MeOH y hexano y se seca a 60 °C por 18 h. Las MSNPs parcialmente funcionalizadas con grupos tioles (HS-MSNPs; 10 mg) se dispersan en 1.5 mL de acetonitrilo (ACN), y luego se adicionan 50 μL de IPTMS. La mezcla se agita a 25 °C por 18 h. Las partículas se colectan por centrifugación y se lavan con ACN (HS-MSNPs-I). Luego se resuspenden en 1.5 mL de DMF anhidra, y se

---

adicionan 20 mg de benzimidazol y 20  $\mu\text{L}$  de trietilamina. La suspensión se agita a 70 °C por 24 h. Se colectan las nanopartículas por centrifugación y se lavan con DMF y  $\text{H}_2\text{O}$  (HS-MSNP-Bzi). Las nanopartículas se dispersan en 1.5 mL de una disolución acuosa de Dox ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y se agita la suspensión durante 18 h. Luego, se adiciona a la mezcla  $\beta$ -ciclodextrina (40 mg) y se agita por 18 h. Las nanopartículas se centrifugan y se lavan varias veces con agua (HS-MSNP@Dox@Bzi-CD). Para la unión de las nanopartículas de oro, las nanopartículas HS-MSNP@Dox@Bzi-CD se dispersan en agua y se adicionan sobre la suspensión de las nanopartículas AuNSt@MFL-COOH. La mezcla se agita durante 24 h, se centrifugan las nanopartículas Janus N1, se lavan con agua y se secan a vacío.

### *Síntesis de las nanopartículas N2 (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@PEG)*

Se mezclan 50 mL de una disolución acuosa de CTAB (6.6 mM) con 20 mL de etanol a 25 °C en un balón de 250 mL utilizando un agitador magnético (400 rpm). Se burbujeó Ar en la disolución durante 1 h y se mantiene la atmósfera de Ar durante toda la reacción. Se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de amoníaco 32%. Luego se adicionan al balón 3 mL de la suspensión de AuNSt de 120 nm ( $c(\text{Au}) = 5 \text{ mM}$ ). Después de 5 min, se adiciona gota a gota 50  $\mu\text{L}$  de TEOS a la mezcla de reacción. La mezcla se agita por 15 min y se adicionan 10  $\mu\text{L}$  de APTES. Después de 24 h las partículas se separan del medio por centrifugación (10 min, 9500 rpm) y se lavan dos veces con etanol. Finalmente, las moléculas de CTAB se eliminan mediante un proceso de extracción con una disolución de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en etanol ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La mezcla se agita por 2 horas y las partículas se recuperan por centrifugación. Las nanopartículas híbridas funcionalizadas con grupos aminos (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 2 mg) se dispersan en una disolución de Dox en etanol ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y se agita la suspensión por 18 h. Las nanopartículas cargadas con Dox se centrifugan y se redispersan en una disolución del compuesto **12** en THF, previamente activado con EDC y NHS. Luego la mezcla se agita durante 18 h a 25 °C. Las nanopartículas N2 se centrifugan, se lavan con THF y  $\text{H}_2\text{O}$  y se secan a vacío.

#### 4. Síntesis de compuestos orgánicos

##### *Síntesis del compuesto 1*

Una mezcla del alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico (0.43 g; 2 mmol) y el cloroformiato de 4-nitrofenilo (0.6 g; 4 mmol) se disuelve en diclorometano (DCM, 5 mL) y se enfría a 0 °C. Se adiciona trietilamina (0.55 mL; 0.4 g; 4 mmol) y la mezcla se agita magnéticamente por 20 min a 0 °C. Luego se incrementa la temperatura de la mezcla hasta 25 °C y se mantuvo la agitación durante 6 h. La mezcla se particiona entre DCM y una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh) y se evapora obteniéndose un sólido amarillo **1** (0.56 g, 1.48 mmol, 74 % rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 8.35 (d, J=9.2, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.58 (d, J=9.2, 2H), 7.30 (s, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.98 (s, 3H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 168.1, 156.3, 155.4, 152.8, 147.7, 146.4, 140.7, 126.6, 126.1, 123.3, 112.9, 112.5, 68.3, 57.1, 57.3.

##### *Síntesis del compuesto 2*

Una mezcla de la Dox (0.58 g; 1 mmol), el compuesto **1** (0.38 g; 1 mmol) o el cloroformiato de 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo (0.275 g; 1 mmol), HOBT (0.135 g; 1 mmol) y trietilamina (0.28 mL; 0.2 g; 2 mmol) se disuelve en DMF (5 mL) y se agita por 3 h a 25 °C. La mezcla se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh) y se evapora. La mezcla resultante se purifica por cromatografía de columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y una elución por gradiente (0 a 5% MeOH en DCM) obteniéndose un sólido rojo **2** (0.53 g, 0.68 mmol, 68 % rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.97 (s, 1H), 13.20 (s, 1H), 8.01 (d, J=7.6, 1H), 7.78 (t, J=8.1, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.38 (d, J=8.5, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.50 (br s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.31(m, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.13 (m, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.87 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.24 (d, J=18.7, 1H), 2.96 (d, J=18.7, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.28 (m, 1H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213.9, 187.2, 186.8, 161.2, 156.3, 155.8, 155.2, 153.6, 148.3, 140.0, 135.9, 135.6, 133.7, 133.6, 128.0, 121.0, 120.0, 118.6, 111.8, 111.6, 110.4, 108.3, 100.8, 69.9, 69.7, 67.4, 65.7, 63.8, 56.8, 56.6, 56.5, 47.3,

35.8, 34.1, 33.8, 17.0; ESI-TOF MS  $m/z = 805.2028$  (calcd. for  $C_{37}H_{38}N_2O_{17}Na$  805.2063  $[M+Na]^+$ ).

### *Síntesis del compuesto 3*

Una mezcla de vainillina (2.5 g, 16 mmol), bromoacetato de etilo (2 mL, 3 g, 18 mmol) y  $Na_2CO_3$  (3.5 g, 25 mmol) en DMF (15 mL) se agita a 25 °C durante 24 h. Se adiciona agua y la mezcla se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  (anh) y se evapora obteniéndose el éster aldehídico **3** (3.5 g, 15 mmol, 90 % rendimiento).  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.83 (s, 1H), 7.41 (d,  $J=1.9$ , 1H), 7.39 (dd,  $J=8.1$ , 1.9, 1H), 6.86 (d,  $J=8.1$ , 1H), 4.75 (s, 2H), 4.24 (q,  $J=7.1$ , 2H), 3.92 (s, 3H), 1.26 (t,  $J=7.1$ , 3H);  $^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  190.9, 168.1, 152.6, 150.1, 131.2, 126.2, 112.5, 110.0, 66.0, 61.7, 56.1, 14.2.

### *Síntesis del compuesto 4*

Una disolución del compuesto **3** (3.5 g, 15 mmol) en anhídrido acético (10 mL) se adiciona a una disolución de  $HNO_3$  70 % (10 mL) y anhídrido acético (15 mL) a 0 °C. La mezcla resultante se agita durante 2 h, luego se aumenta la temperatura a 25 °C y se mantiene la agitación durante 4 h. La mezcla se adiciona sobre agua fría, se añade en frío NaOH para ajustar el pH entre 13-14 y luego se añade HCl 36 % para ajustar el pH entre 2-3. La fase acuosa se extrae con AcOEt y se seca la fase orgánica y se evapora obteniéndose un sólido amarillo. El producto se recrystaliza en una mezcla de MeOH/ $H_2O$  para obtener el compuesto nitro-ácido **4** (3 g, 12 mmol, 80 % rendimiento).  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10.24 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.66 (s, 2H), 3.86 (s, 3H);  $^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  187.4, 168.9, 153.3, 150.4, 143.1, 126.0, 110.1, 108.7, 65.6, 56.5.

### *Síntesis del compuesto 5*

A una disolución del compuesto **4** (1 g, 4 mmol) en THF (20 mL) se adiciona  $NaBH_4$  (0.5 g, 13 mmol) a 25 °C y la mezcla se agita por 24 h. Se adiciona agua a la mezcla de reacción y se adiciona HCl 1M para ajustar el pH entre 2-3. La fase acuosa se extrae con AcOEt y la fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose el sólido amarillo **5** (0.95 g, 3.7 mmol, 95 % rendimiento).  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $CO(CD_3)_2$ )  $\delta$

7.73 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.00 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  169.8, 155.4, 146.8, 139.7, 136.0, 111.5, 111.2, 66.5, 61.8, 56.7.

*Síntesis del compuesto 6*

Una mezcla del compuesto **5** (0.66 g; 2.6 mmol), dihidrocloruro de cistamina (0.28 g; 1.3 mmol), trietilamina (0.4 mL; 0.3 g; 3 mmol), HOBt (0.4 g; 3 mmol) y EDC (0.58 g; 3 mmol) en DMF (5 mL) se agita por 24 h a 25 °C. La mezcla de reacción se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose el compuesto **6** (0.68 g, 1.1 mmol, 85 % rendimiento).  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  7.77 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.62 (dd,  $J=13.2, 6.7$ , 2H), 2.92 (t,  $J=6.7$ , 2H);  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  168.5, 155.5, 146.5, 136.5, 126.1, 112.6, 111.1, 70.0, 68.1, 56.8, 38.9, 38.7.

*Síntesis del compuesto 7*

Una mezcla del diol **6** (0.63 g; 1 mmol) y el cloroformiato de 4-nitrofenilo (0.5 g; 2.5 mmol) en DCM (10 mL) se enfría a 0 °C. Se adiciona trietilamina (0.35 mL; 0.255 g; 2.5 mmol) a la mezcla y se agita por 20 min a 0 °C. Luego, se aumenta la temperatura de la mezcla a 25 °C y se mantiene la agitación durante 6 h. La mezcla se particiona entre DCM y NaCl (sat). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anh) y se evapora obteniéndose un sólido amarillo **7** (0.91 g, 0.95 mmol, 95 % rendimiento).  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  8.31 (d,  $J=9.2$ , 2H), 7.83 (s, 1H), 7.51 (d,  $J=9.2$ , 2H), 7.27 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.66 (dd,  $J=12.8, 6.4$ , 2H), 2.93 (t,  $J=6.4$ , 2H);  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  168.2, 156.6, 155.2, 152.9, 147.9, 146.6, 140.9, 126.9, 126.2, 123.2, 112.8, 112.6, 69.6, 68.2, 57.0, 38.8, 38.5.

*Síntesis del compuesto 8*

Una mezcla de Dox (0.58 g; 1 mmol), el compuesto **7** (0.48 g; 0.5 mmol), HOBt (0.63 g; 1 mmol) y trietilamina (0.27 mL; 0.2 g; 2 mmol) en DMF (5 mL) se agita por 3 h a 25 °C. La mezcla se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anh) y se evapora. El sólido resultante se purifica por cromatografía de columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y una elución con gradiente (0 a 5% MeOH en DCM) obteniéndose un sólido rojo **8** (0.57 g, 0.32

mmol, 63 % rendimiento).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.01 (s, 1H), 13.27 (s, 1H), 8.04 (d,  $J=7.6$ , 1H), 7.80 (t,  $J=8.1$ , 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (d,  $J=8.5$ , 1H), 7.00 (s, 1H), 5.52 (br s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.31(m, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.13 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.87 (m, 1H), 3.69 (dd,  $J=12.8$ , 6.4, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.3 (d,  $J=18.7$ , 1H), 3.08 (t,  $J=6.4$ , 2H), 3.00 (d,  $J=18.7$ , 1H), 2.34 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.28 (m, 1H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213.9, 187.2, 186.8, 168.4, 161.2, 156.3, 155.8, 155.2, 153.6, 148.3, 140.0, 135.9, 135.6, 133.7, 133.6, 128.0, 121.0, 120.0, 118.6, 111.8, 111.6, 110.4, 108.3, 100.8, 69.9, 69.7, 68.9, 67.4, 65.7, 63.8, 56.8, 56.6, 47.3, 38.0, 37.6, 35.8, 34.1, 33.8, 17.0.

*Síntesis del compuesto 9*

Una mezcla del sólido **5** (0.25 g, 1 mmol), cisteamina (0.083 g, 1.1 mmol), HOBT (0.145 g, 1.1 mmol), EDC (0.21 g, 1.1 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.15 mL, 0.11 g, 1.1 mmol) en DMF (5 mL) se agita durante 24 h a 25 °C. La mezcla de reacción se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose el sólido **9** (0.24 g, 0.75 mmol, 75 % rendimiento).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  7.77 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.62 (dd,  $J=13.2$ , 6.7, 2H), 2.92 (t,  $J=6.7$ , 2H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  168.5, 155.5, 146.5, 136.5, 126.1, 112.6, 111.1, 70.0, 68.1, 56.8, 38.9, 38.7.

*Síntesis del compuesto 10*

Una mezcla del alcohol **9** (0.24 g, 0.75 mmol), anhídrido succínico (0.083 g, 0.83 mmol) y DMAP (0.1 g, 0.83 mmol) en THF (5 mL) se agita durante 24 h a 25 °C. Se adiciona agua a la mezcla de reacción y se adiciona HCl 1M para ajustar el pH entre 2-3. La fase acuosa se extrae con AcOEt y la fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose el sólido **10** (0.22 g, 0.53 mmol, 70 % rendimiento).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  7.79 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 5.49 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.62 (dd,  $J=12.7$ , 6.5, 2H), 2.92 (t,  $J=6.5$ , 2H), 2.75 (m, 2H), 2.68 (m, 2H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ )  $\delta$  174.0, 172.7, 168.6, 155.4, 147.2, 140.4, 129.8, 112.6, 111.6, 69.7, 63.5, 57.1, 38.9, 38.8, 30.7, 30.6.

### *Síntesis del compuesto 11*

Una mezcla del sólido **5** (0.125 g, 0.5 mmol), PEG-NH<sub>2</sub> (0.4 g, 0.54 mmol), HOBT (0.075 g, 0.55 mmol), EDC (0.1 g, 0.52 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.075 mL, 0.055 g, 0.54 mmol) en DMF (5 ml) se agita por 24 h a 25 °C. La mezcla se particiona entre AcOEt y NaCl (sat). La fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose el compuesto **11** (0.35 g, 0.35 mmol, 71 % rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 7.79 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.68-3.52 (m, 68H), 3.29 (s, 3H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 168.0, 155.5, 146.5, 136.6, 126.0, 112.4, 111.2, 72.63, 71.2 (x29), 71.0 (x2), 70.2, 70.0, 61.6, 58.8, 56.9, 39.4.

### *Síntesis del compuesto 12*

Una mezcla del alcohol **11** (0.24 g, 0.24 mmol), anhídrido succínico (0.03 g, 0.3 mmol) y DMAP (0.035 g, 0.3 mmol) en THF (5 mL) se agita por 24 h a 25 °C. Se adiciona agua a la mezcla y se ajusta el pH entre 2-3 adicionando HCl 1M. La fase acuosa se extrae con AcOEt y la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh) y se evapora obteniéndose el compuesto **12** (0.16 g, 0.15 mmol, 63 % rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 7.82 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.68-3.52 (m, 68H), 3.29 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.68 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 173.8, 172.6, 168.0, 155.4, 147.3, 129.6, 126.0, 112.5, 111.7, 72.6, 71.2 (x29), 71.0 (x2), 70.2, 69.8, 63.5, 58.8, 57.2, 39.5, 30.6, 30.5.

## **5. Experimentos para determinar la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas con el láser**

### *Mediciones directas del perfil de temperatura alrededor de una nanopartícula individual*

Las mediciones del perfil de temperatura alrededor de una nanopartícula irradiada e inmovilizada sobre una bicapa lipídica se realizan utilizando el protocolo descrito por Bendix y col.<sup>[174]</sup> Para el ensayo con la bicapa lipídica donde se particiona el fluoróforo en la fase de gel se utilizó el 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DC<sub>15</sub>PC, Avanti Polar lipids) con 0.75 mol % del fluoróforo perclorato de 3,3'-dilinoiloxacarbocianina (DiOC<sub>18:2</sub>). El fluoróforo se excita a 488 nm y se registra

la emisión en el intervalo espectral de 496–587 nm.<sup>[176]</sup> Los lípidos suspendidos en cloroformo se secan sobre placas de vidrio bajo flujo de nitrógeno y luego a vacío por 2 h. El filme lipídico se hidrata en PBS a 37 °C. Para formar pequeñas vesículas unilaminares, extruimos la masa del lípido hidratado a través de filtros de 50 nm a 37 °C. Luego, se dejó que las vesículas unilaminares pequeñas se fusionaran a una superficie de vidrio hidrófilo durante 3 horas a 37 °C, por encima de la transición de fase de gel a fluido. Posteriormente, la superficie se lava exhaustivamente con agua Milli-Q manteniendo la superficie y el fluido a 37 °C. Se añadieron las nanopartículas suspendidas en agua MilliQ y se dejaron adherir a la bicapa. Solo las nanopartículas que se pegaron a la bicapa se usaron para los experimentos. Las superficies de vidrio se limpian durante 30 minutos usando disolución piranha (ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno 3: 1).

Para los experimentos se utilizó un láser Nd:YVO<sub>4</sub> (5 W Spectra Physics Millennia  $\lambda=1064$  nm, TEM00) acoplado en el puerto posterior de un microscopio de barrido láser confocal Leica (SP5/TCS). El láser se enfocó a través de un objetivo de inmersión en aceite con una apertura numérica elevada (HC, PL, APO, 63.X, NA=1.20 WATER). Para mejorar la trampa óptica, las dimensiones del haz colimado superan ligeramente la apertura trasera del objetivo. La posición del foco se posicionó con precisión nanométrica, con respecto a la superficie utilizando una pieza piezoeléctrica tridimensional (PI 731.20, Physik Instrumente, Germany). El foco del láser fue desplazado en la dirección axial desde el foco óptico del microscopio para simular la configuración que se emplea cuando se atrapa una nanopartícula de oro en disolución. Las nanopartículas se visualizan en modo reflexión (excitadas a  $\lambda = 594$  nm). La luz dispersada por la partícula y la luz fluorescente de la bicapa se registran simultáneamente usando dos tubos fotomultiplicadores. La cámara de medición se calienta utilizando un recirculador de agua con un control de temperatura de aproximadamente 0.5 °C. La potencia del láser que alcanza el objetivo se midió usando un potenciómetro y la transmisión a través del objetivo se midió con el método de objetivo dual. El tamaño del haz en el plano de la bicapa lipídica se determinó degradando un área sobre la bicapa lipídica marcada fluorescentemente y enfriada 13 °C por debajo de la temperatura de

transición de fase, siendo  $d_{\text{faz}} = 1.95 \mu\text{m}$ . Se utilizó la máxima potencia para degradar las moléculas fluorescentes en la región focal. La bicapa enfriada posee una difusión del fluoróforo muy baja y por lo tanto el área degradada representa la extensión aproximada del foco. La densidad de potencia del láser se calcula utilizando la ecuación  $I=4P/\pi d_{\text{spot}}^2$ , donde  $P$  es la potencia del láser a la cual se irradia la muestra.

### *Medición del perfil de temperatura de una suspensión de nanopartículas*

Los experimentos se realizan utilizando un láser (808 nm)<sup>[188]</sup> que se coloca por encima de la superficie del líquido. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de nanopartículas (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en un pocillo de una placa de 96 pocillos. De esta manera se irradia la muestra a diferentes densidades de potencia durante intervalos de tiempos predeterminados. Los cambios de temperatura de las muestras irradiada se monitorizan utilizando un sensor térmico de fibra óptica.

## 6. Experimentos de fotoliberación

### *Fotoliberación in vitro de doxorrubicina utilizando las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina*

Antes de comenzar el experimento de fotoliberación, las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina se lavan varias veces con agua por centrifugación y redispersión. Se añaden 250  $\mu\text{L}$  de una suspensión de nanopartículas (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en un pocillo de una placa de 96 pocillos. También se añaden en otro pocillo 250  $\mu\text{L}$  de la suspensión control y se coloca la placa en una cámara de aire a 37 °C. Los experimentos se realizan irradiando las suspensiones de nanopartículas con un láser (808 nm)<sup>[188]</sup> a una densidad de potencia determinada (0.4 and 4  $\text{W cm}^{-2}$ ). A determinados tiempos de irradiación, las muestras se centrifugan (3 min, 9500 rpm) y se determina la cantidad de doxorrubicina liberada al medio midiendo los espectros de emisión de la doxorrubicina ( $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ). Los cambios de temperatura de las muestras irradiada y control se monitorizan utilizando un sensor térmico de fibra óptica.

### *Fotoactivación de los profármacos de la doxorubicina*

Las AuNSts se dispersan en una disolución del compuesto **2** en 10% DMSO en H<sub>2</sub>O. Se adicionan 250 µL de la suspensión de nanopartículas en un pocillo de una placa de 96 pocillos. Los experimentos de fotodisociación del profármaco se realizan irradiando las suspensiones con un diodo láser (808 nm) a una densidad de potencia de 1 W cm<sup>-2</sup>. A determinados intervalos durante la irradiación NIR, las partículas se centrifugan (3 min, 9500 rpm) y se mide el espectro de fluorescencia del sobrenadante ( $\lambda_{exc} = 490$  nm). También se realiza un análisis por HPLC del sobrenadante para determinar la doxorubicina formada. De forma similar la suspensión de nanopartículas AuNSt@(MFL-Dox)<sub>2</sub> se irradia a 808 nm y se mantiene una muestra control sin irradiar. A determinados intervalos de tiempo durante la irradiación se centrifugan las nanopartículas (3 min, 9500 rpm) y la doxorubicina liberada en el sobrenadante se determina midiendo la intensidad de fluorescencia a 560 nm ( $\lambda_{exc} = 488$  nm).

### *Experimentos de fotoliberación de doxorubicina utilizando las nanopartículas Janus N1 y nanopartículas N2*

Se añaden 250 µL de una suspensión de nanopartículas (100 µg mL<sup>-1</sup>) en un pocillo de una placa de 96 pocillos. También se añaden en otro pocillo 250 µL de la suspensión control que no se irradia. Los experimentos se realizan irradiando las suspensiones con un láser (808 nm) a una densidad de potencia de 1 W cm<sup>-2</sup>. A intervalos de tiempo predeterminados, las muestras se centrifugan (3 min, 9500 rpm) y se determina la cantidad de doxorubicina liberada al medio utilizando la espectroscopia de fluorescencia ( $\lambda_{em} = 560$  nm  $\lambda_{exc} = 488$  nm).

## **7. Experimentos con células**

### *Cultivo celular*

Las células HeLa se cultivan en una placa a 37 °C utilizando el medio DMEM (por sus siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium) en un ambiente con aire húmedo que contiene 5 vol.% de CO<sub>2</sub> en DMEM. El medio se suplementa con 10 vol.% de suero bovino fetal (FBS, Gibco) y 1 vol.% de penicilina/estreptomina (10000 unidades de ambos por ml). Después de 24 h de incubación, las células se

lavan con PBS, y se desprenden de la placa con tripsina (0.2 vol. %)/PBS. Las células se siembran en una placa de 96 pocillos con una densidad de  $5 \cdot 10^3$  células por pocillo y se dejan crecer en DMEM por 24 h.

### *Internalización celular de las nanopartículas*

La internalización celular de las nanopartículas se monitoreó utilizando la microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes de TEM se adquirieron en un microscopio FEI Tecnai Spirit G2 operando a 80 kV con una cámara digital (Soft Image System, Morada). Las células Hela se incubaron con las suspensiones de las nanopartículas en DMEM a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 24 h. Luego, las células se fijan con glutaraldehído (3 %) en buffer de fosfato ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ), se deshidratan en etanol y se añaden como agentes de contraste tetróxido de osmio (1 %) y acetato de uranilo (1 %). Finalmente, las muestras se incluyen en una resina epoxi (Araldita) y se cortan en láminas ultrafinas para el análisis en el microscopio.

### *Ensayos de viabilidad celular utilizando las nanopartículas y compuestos sintetizados*

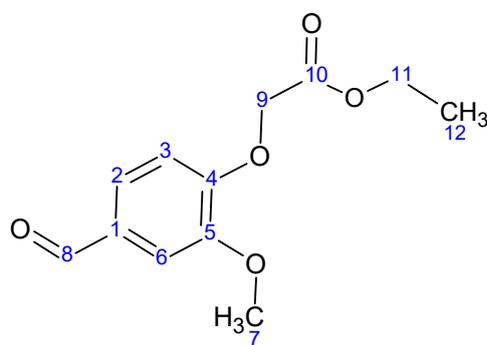
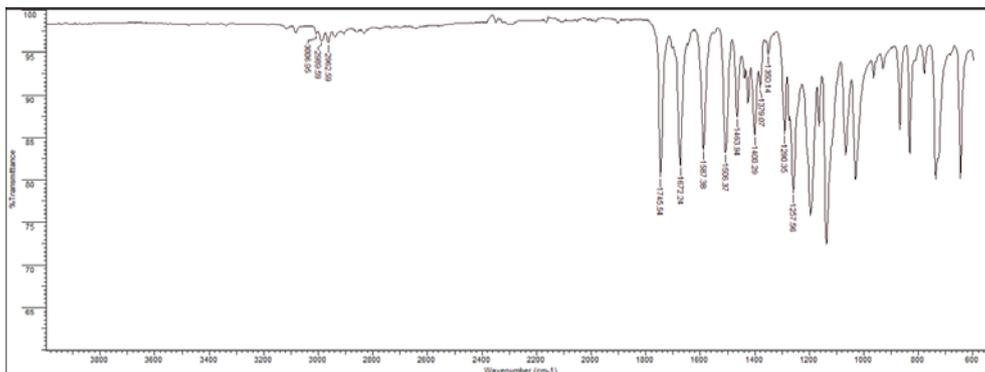
Después del sembrado en la placa de 96 pocillos y el crecimiento durante 24 h, las células se tratan con las suspensiones de las diferentes nanopartículas sintetizadas (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina, AuNSt, AuNSt@(MFL-DOx)<sub>2</sub>, Janus N1 y N2) o con las disoluciones de los compuestos **2** y **8** en DMEM a diferentes concentraciones. Luego las células designadas se irradian con el láser NIR (808 nm, 1-4 W cm<sup>-2</sup>, 10-15 min). Después de la irradiación, las células se incuban durante 24 o 48 h. Después del período de incubación, las células se lavan con PBS, y se evalúa la viabilidad celular utilizando el ensayo WST-1. Se adicionan 7  $\mu\text{L}$  del reactivo de proliferación celular WST-1, y se incuban las células durante 1 h a 37 °C. Por último, se mide la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas (Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2). Se determina el porcentaje de viabilidad celular relativa a las células no tratadas (control, 100 % viabilidad). Se realizaron 3 réplicas para cada grupo de tratamiento.

### *Ensayos de fotoliberación de Dox utilizando microscopia de barrido láser confocal*

Para los experimentos de fotoliberación intracelular de doxorrubicina utilizando la microscopía de barrido láser confocal (CLSM, siglas en inglés), las células HeLa se siembran en una placa de 96 pocillos con fondo de vidrio con una densidad de  $5 \cdot 10^3$  células por pocillo. Después del sembrado en la placa de 96 pocillos y el crecimiento durante 24 h, las células se incuban por 2 h con los diferentes sistemas sintetizados (AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina, AuNSt + compuesto **2**, AuNSt@(MFL-DOx)<sub>2</sub>, Janus N1 y N2). Luego, las células designadas se irradian con un láser de 808 nm por 10 min y se incuban por 2 h adicionales. Después de este período de incubación las células se lavan con PBS y se adiciona DMEM. Finalmente, se adiciona el marcador de ADN Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se incuban las células por 5 min antes del análisis CLSM. Las imágenes CLSM se adquieren utilizando un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems CMS GmbH). Las muestras controles también se irradian *in situ* con el láser de 633 nm del microscopio y se adquieren las imágenes antes y después de la irradiación.

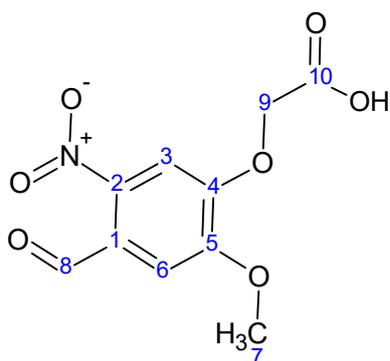
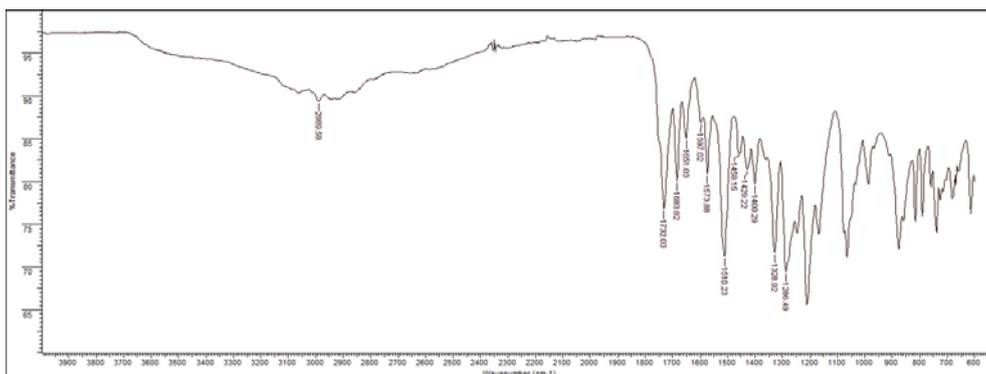
8. Espectros FT-IR

Compuesto 3



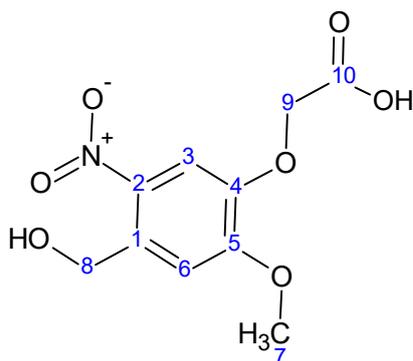
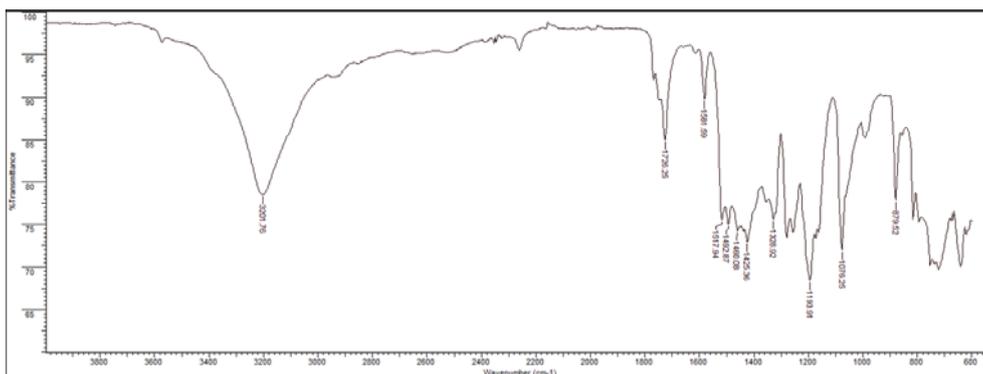
$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibraciones Moleculares
3006	$\nu$ C <sub>sp2</sub> -H
2989, 2962	$\nu$ C <sub>sp3</sub> -H
1745	$\nu$ C=O (RCOOR)
1672	$\nu$ C=O (ArCHO)
1587, 1506, 1400	$\nu$ C <sup>≡</sup> C (Ar)
1463	$\delta$ C <sub>sp3</sub> -H
1257, 1120	$\nu$ C-O (RCOOR)

Compuesto 4



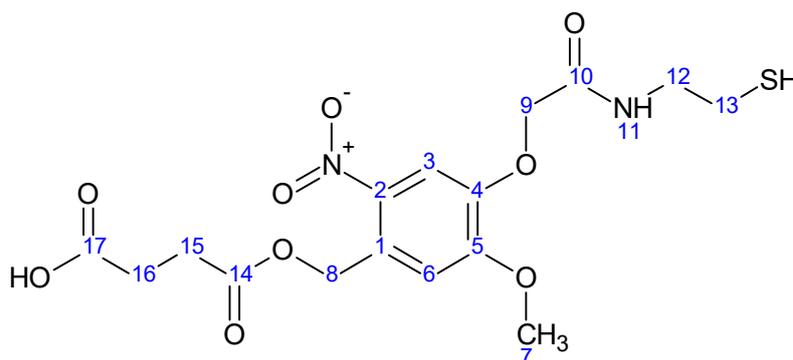
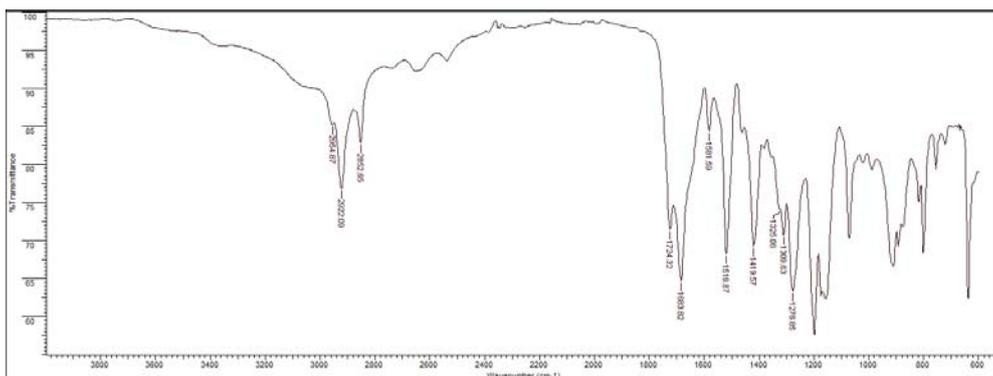
$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibraciones Moleculares
3000	$\nu$ O-H (RCOOH)
1732	$\nu$ C=O (RCOOH)
1683	$\nu$ C=O (ArCHO)
1573, 1458, 1400	$\nu$ C <sup>≡</sup> C (Ar)
1510, 1328	$\nu_{as,s}$ N <sup>≡</sup> O (NO <sub>2</sub> )
1200	$\nu$ C-O (RCOOH)

Compuesto 5



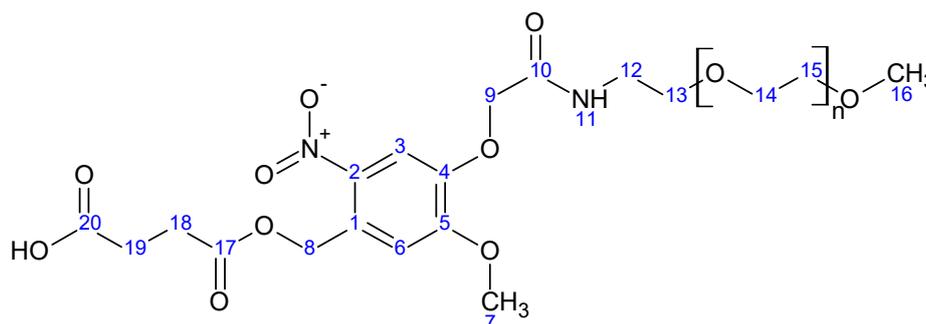
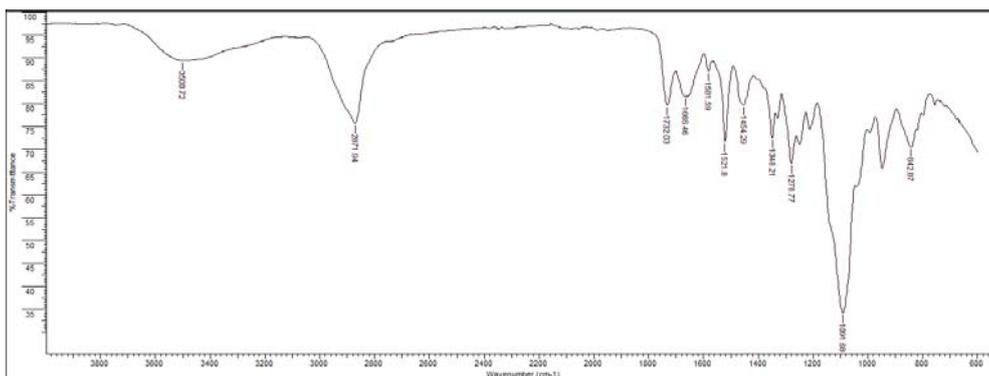
$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibraciones Moleculares
3201	$\nu$ O-H (ArCH <sub>2</sub> OH)
1726	$\nu$ C=O (RCOOH)
1581, 1492, 1425	$\nu$ C≡C (Ar)
1517, 1328	$\nu_{as,s}$ N≡O (NO <sub>2</sub> )
1193	$\nu$ C-O (RCOOH)

Compuesto 10



$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibraciones Moleculares
3000	$\nu$ O-H (RCOOH)
2922, 2852	$\nu$ C <sub>sp3</sub> -H
1724	$\nu$ C=O (RCOOH)
1683	$\nu$ C=O (RCONHR)
1589, 1450, 1420	$\nu$ C <sup>≡</sup> C (Ar)
1519, 1309	$\nu_{as,s}$ N <sup>≡</sup> O (NO <sub>2</sub> )
1276, 1050	$\nu$ C-O (RCOOR)

Compuesto 12

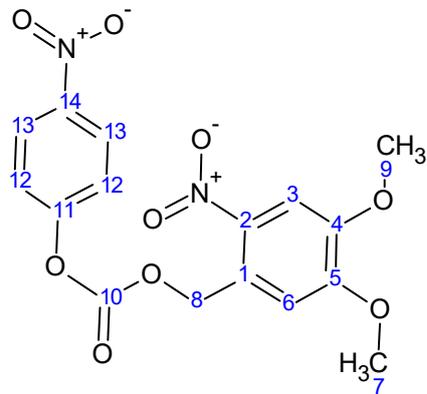
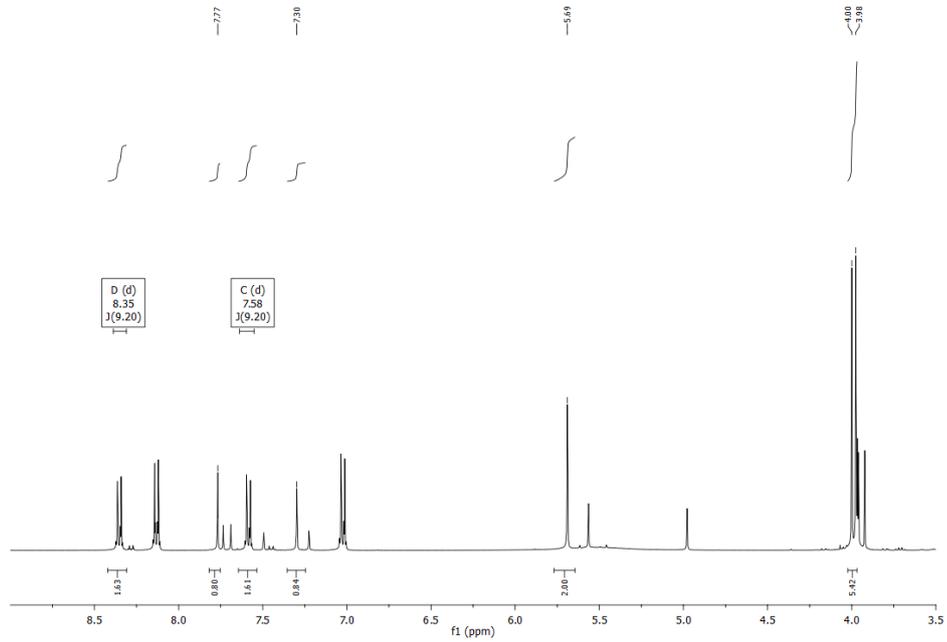


$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibraciones Moleculares
3500	$\nu$ N-H (RCONHR)
3000	$\nu$ O-H (RCOOH)
2871	$\nu$ C <sub>sp3</sub> -H
1732	$\nu$ C=O (RCOOH)
1666	$\nu$ C=O (RCONHR)
1581, 1454	$\nu$ C <sup>≡</sup> C (Ar)
1521, 1348	$\nu$ as,s N <sup>≡</sup> O (NO <sub>2</sub> )
1278	$\nu$ C-O (RCOOH)
1091	$\nu$ C-O (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>

9. Espectros RMN

Compuesto 1

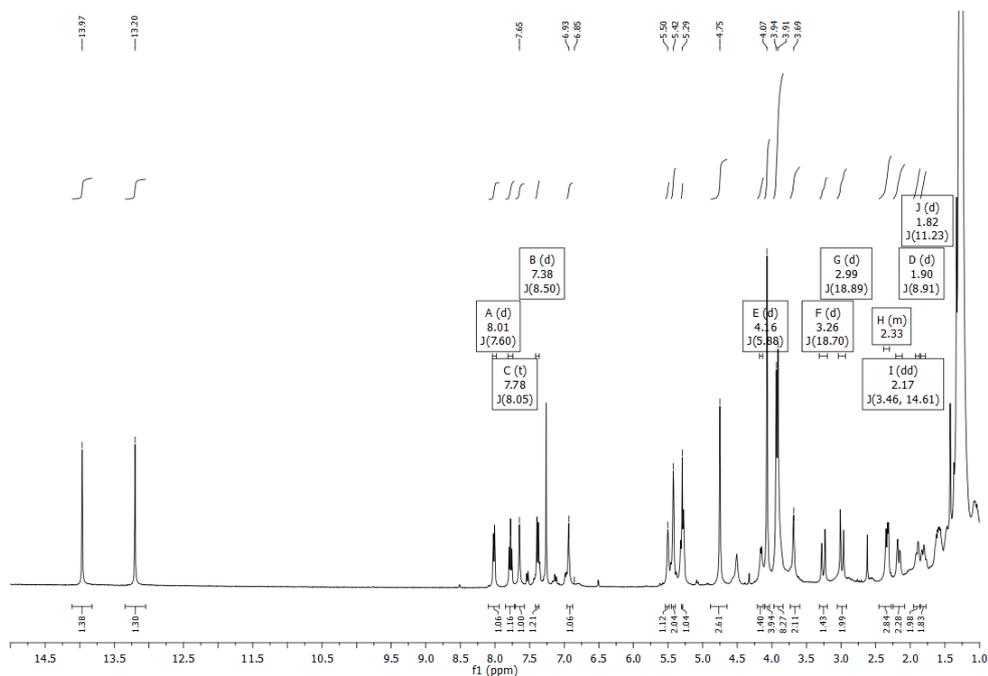
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



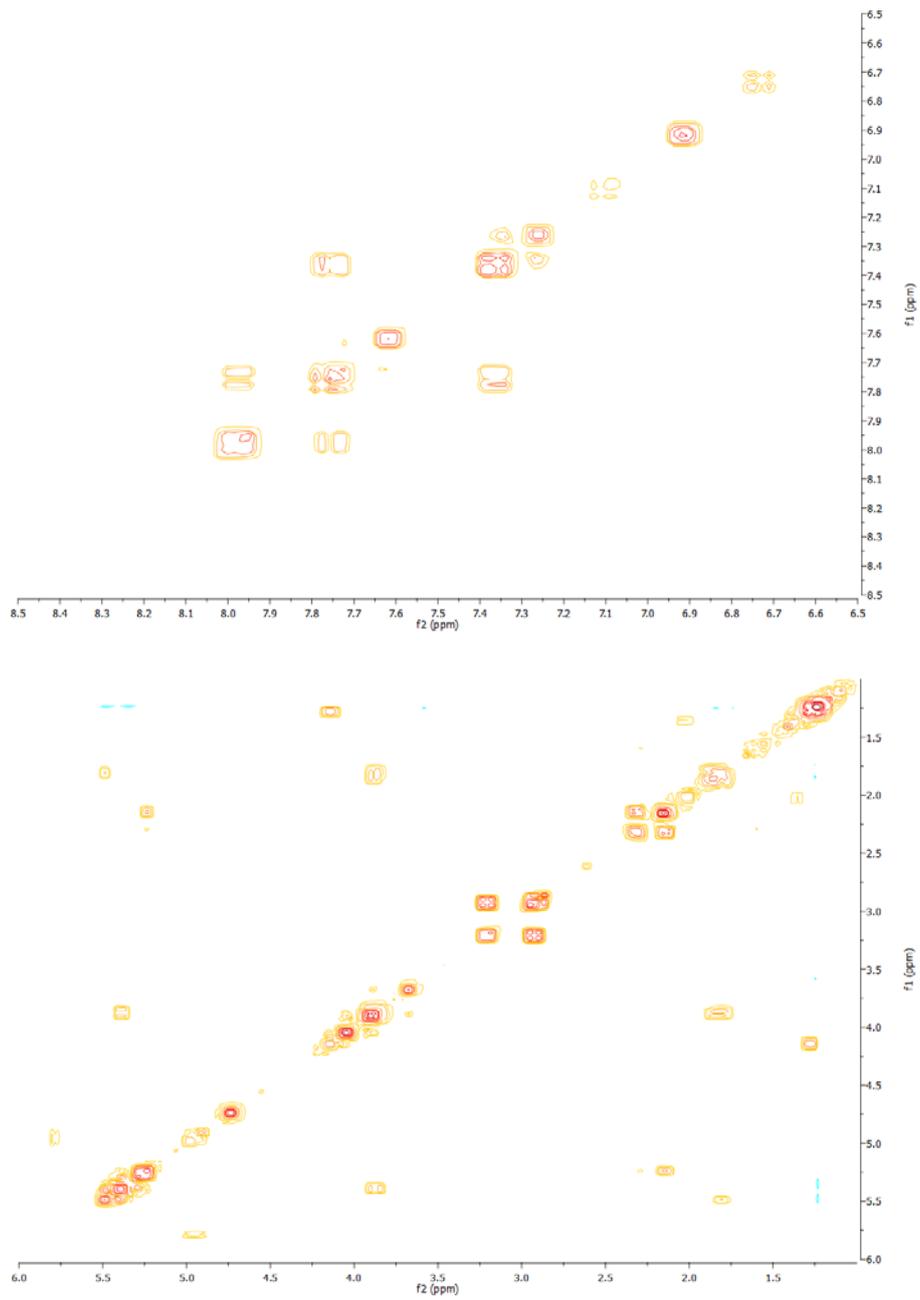
Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
8.35	2	d (9.2)	13
7.77	1	s	3
7.58	2	d (9.2)	12
7.30	1	s	6
5.69	2	s	8
4.00	3	s	9
3.98	3	s	7

**Compuesto 2**

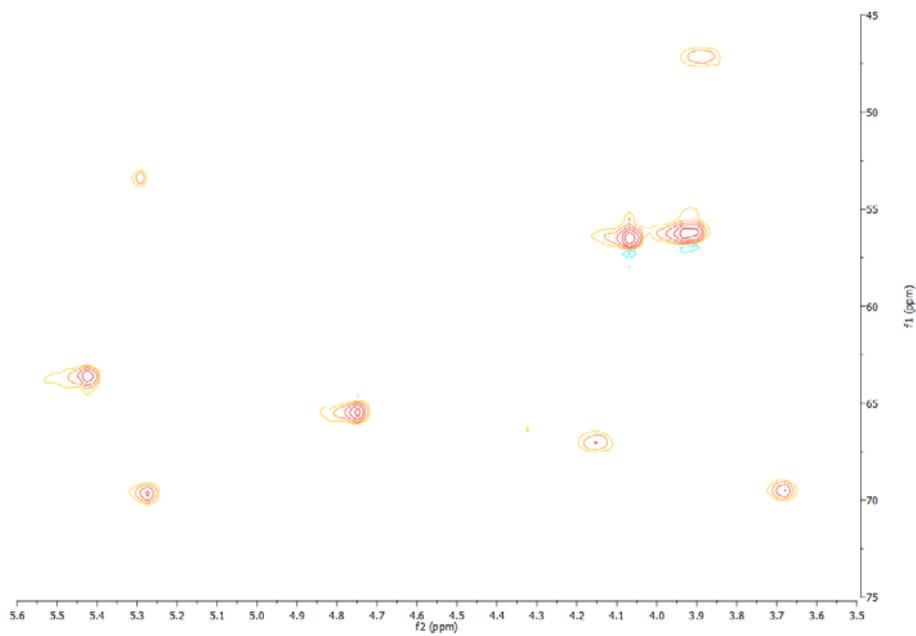
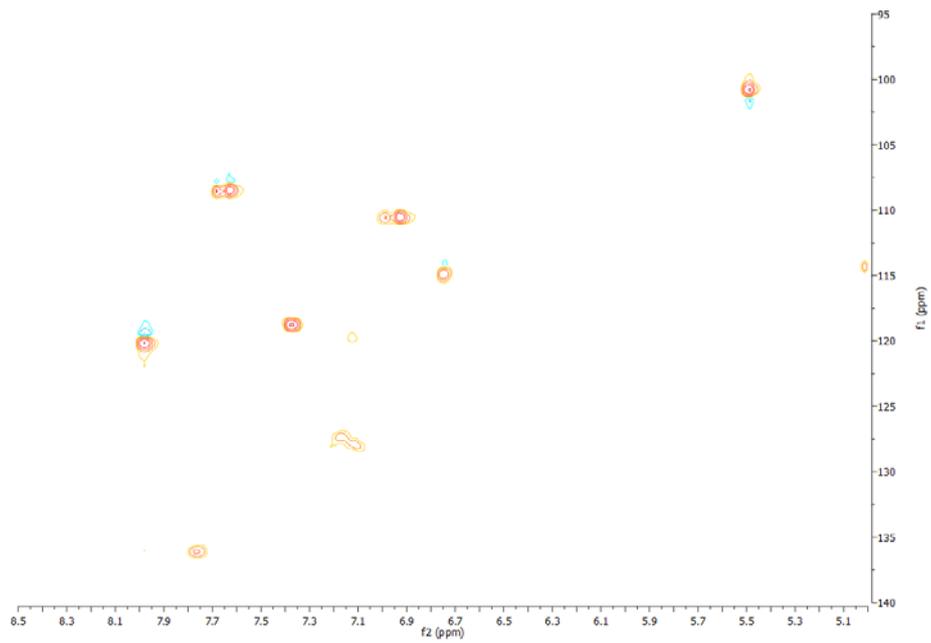
**Espectro  $^1\text{H}$ -RMN**

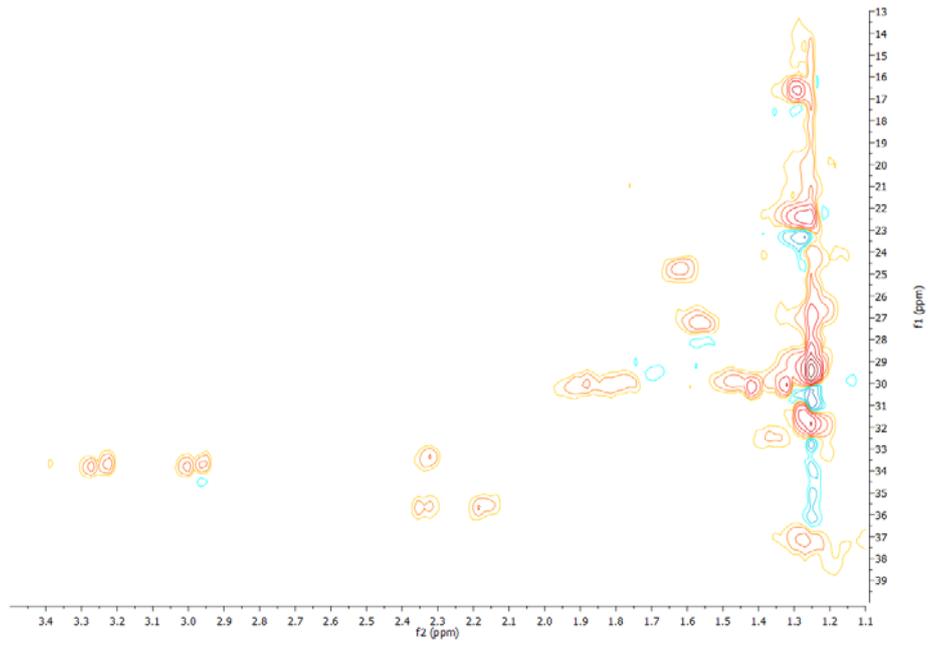


Espectros COSY

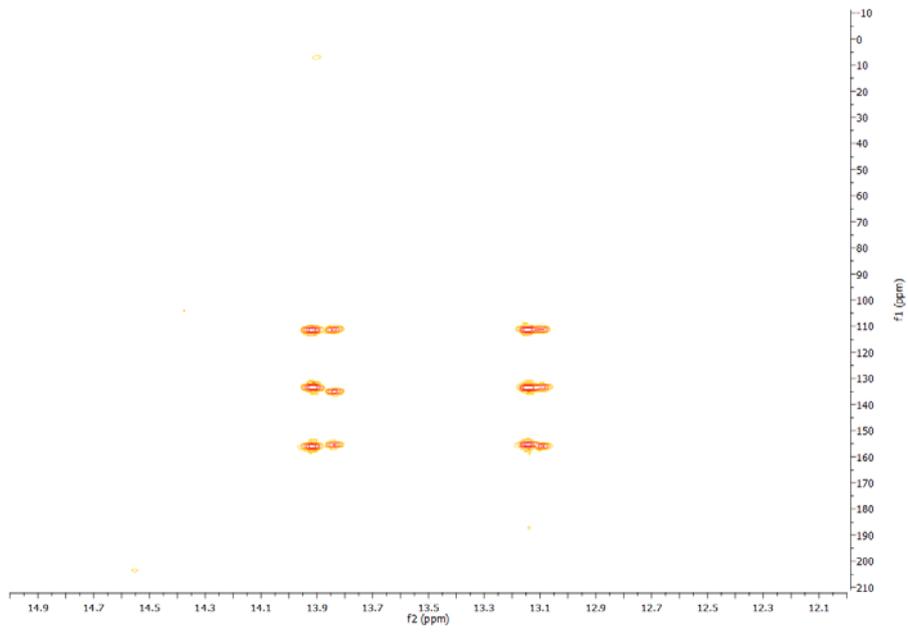


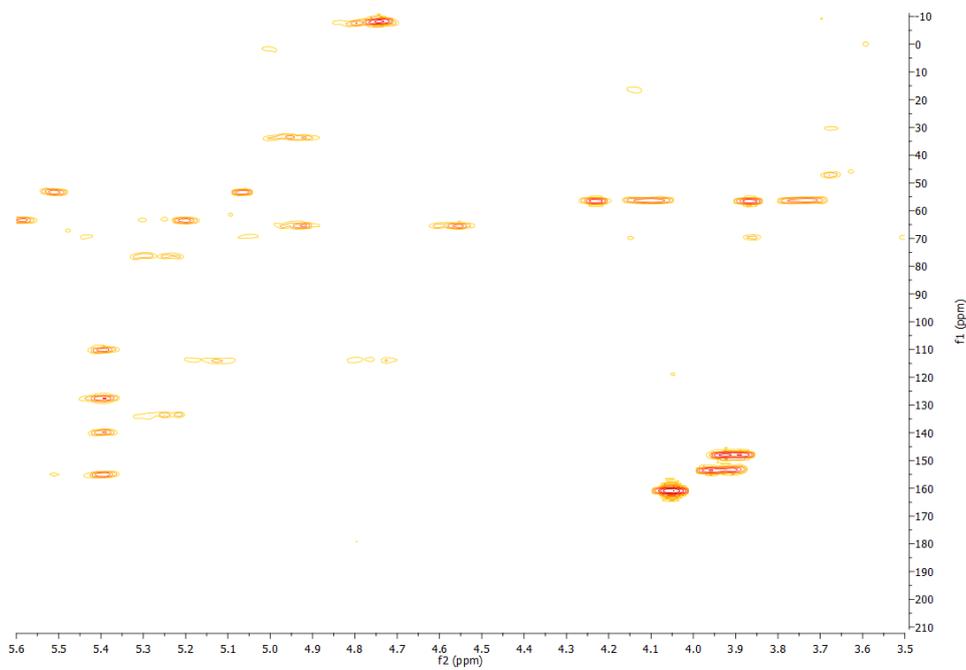
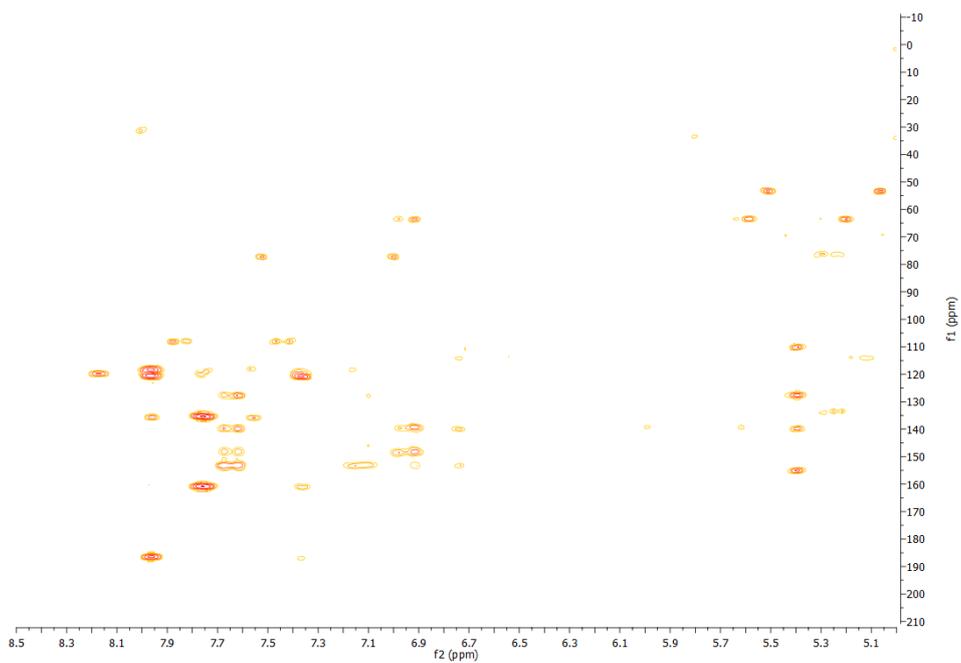
Espectros HSQC

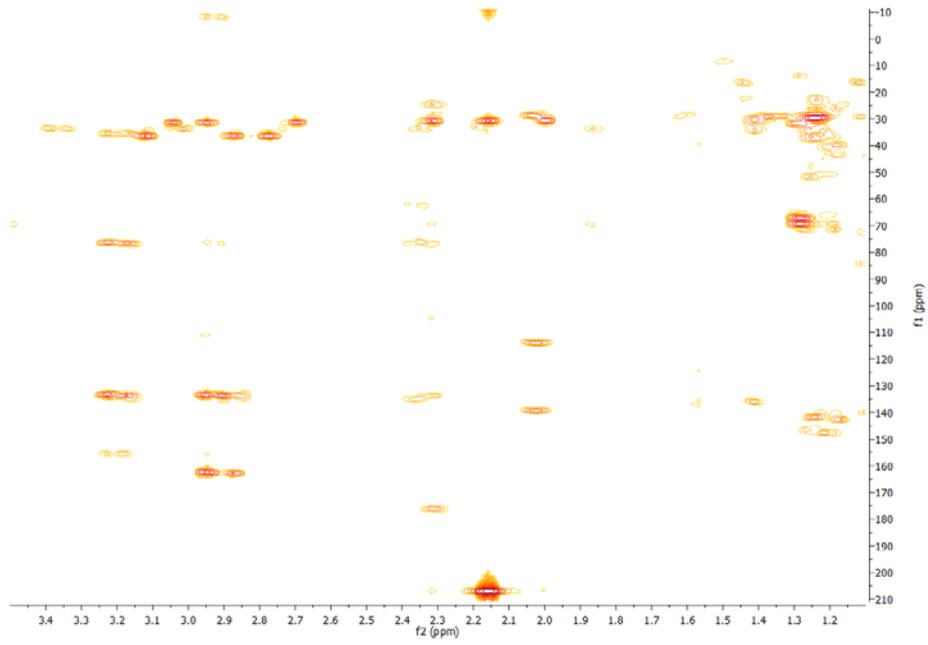




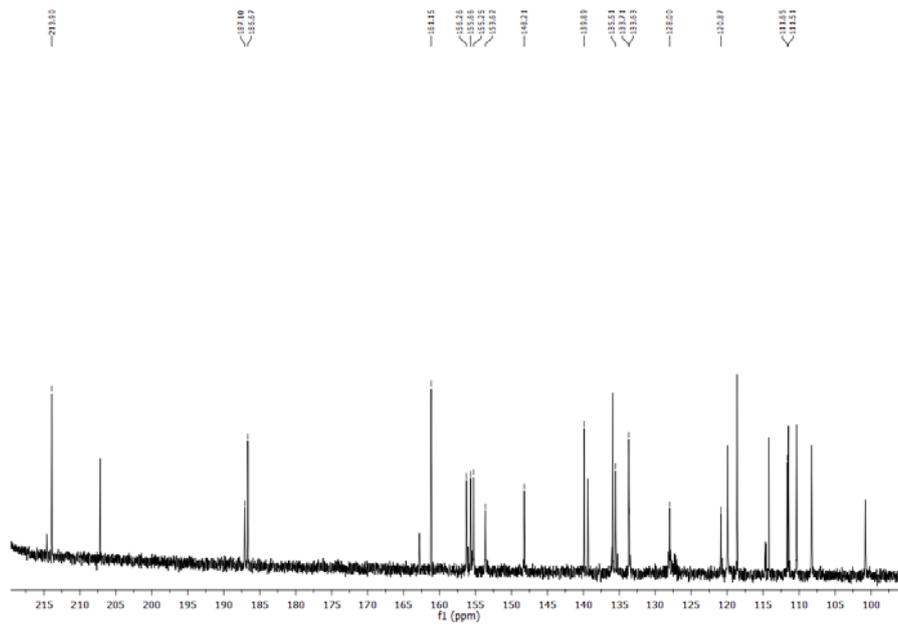
Espectros HMBC



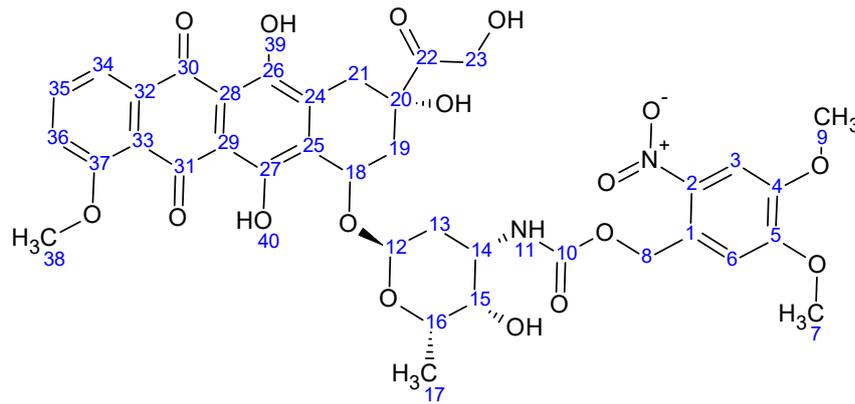
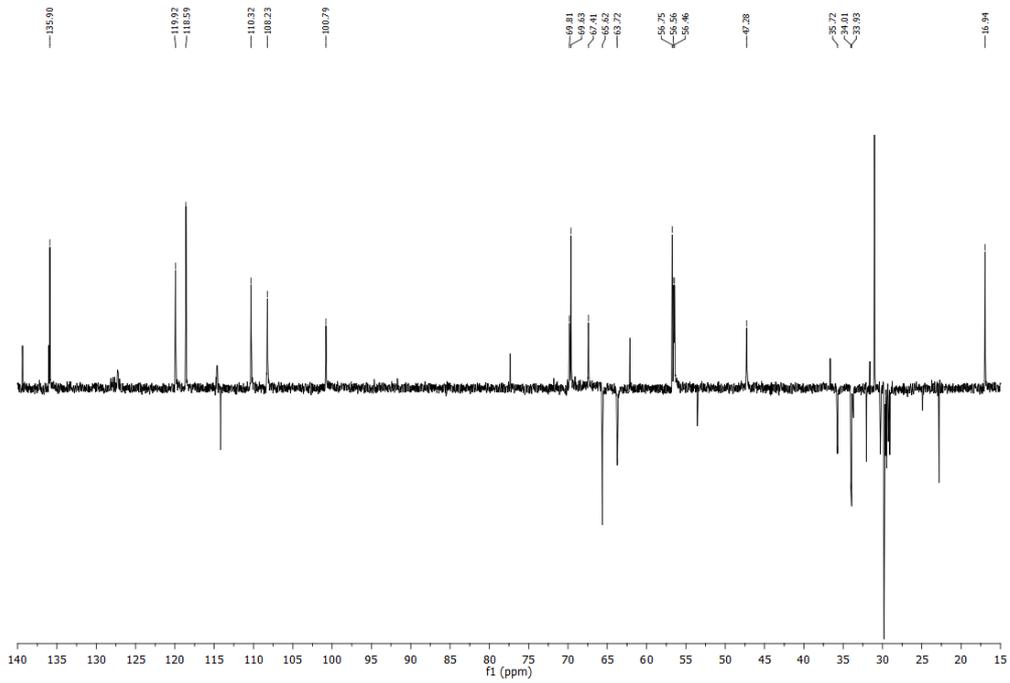




Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Espectro DEPT-135



## *Materiales y Métodos*

Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm) COSY	Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) HSQC	Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) HMBC	Número del átomo en la estructura
13.97	1	s			156.29 155.75 133.72 133.60 111.75 111.57	40
13.20	1	s			156.29 155.75 133.72 133.60 111.75 111.57	39
8.01	1	d	7.78	120.00	186.79 135.61 120.97 118.61	34
7.78	1	t	8.01 7.38	135.94	161.21 135.61	35
7.65	1	s		108.29	153.64 148.25 139.96 128.02	3

## *Materiales y Métodos*

7.38	1	d	7.78	118.61	161.21 120.97 120.00	36
6.93	1	s		110.36	148.25 139.96 63.78	6
5.50	1	d	1.81	100.80		12
5.42	2	s		63.78	155.22 139.96 128.02 110.36	8
5.38	1	d	3.87			11
5.25	1	m	2.17	69.89	133.72 76.77	18
4.75	2	s		65.67	213.92	23
4.13	1	m	1.28	67.40		16
4.06	3	s		56.81	161.21	38
3.94	3	s		56.60	153.64	7
3.91	3	s		56.51	148.25	9
3.87	1	m	1.81 3.68 5.38	47.28		14
3.68	1	m	3.87	69.70	47.28	15
3.24	1	d	2.96	34.12	155.22 133.60 76.67 35.80	21
2.96	1	d	3.24	34.12	213.92 133.60	21

## *Materiales y Métodos*

2.34	1	m	2.17	35.80	133.60 76.77 34.12	19
2.17	1	m	2.34 5.25	35.80	34.12	19
1.81	2	m	3.87 5.50	33.76		13
1.28	3	d	4.13	16.97	69.70 67.40	17

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT- 135  Signo de la señal	Número del átomo en la estructura
213.92		22
187.24		31
186.79		30
161.21		37
156.29		27
155.75		26
155.22		10
153.64		5
148.25		4
139.96		2
135.94	+	35
135.61		32
133.72		25

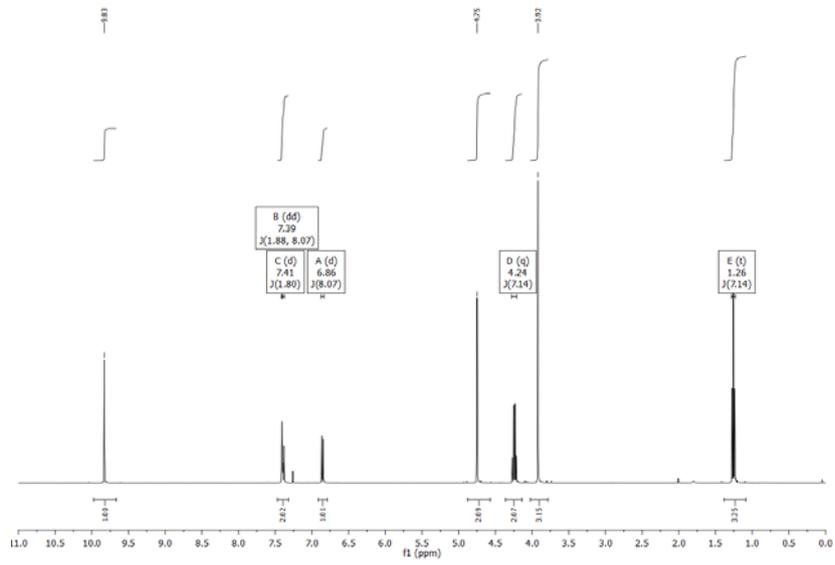
## *Materiales y Métodos*

---

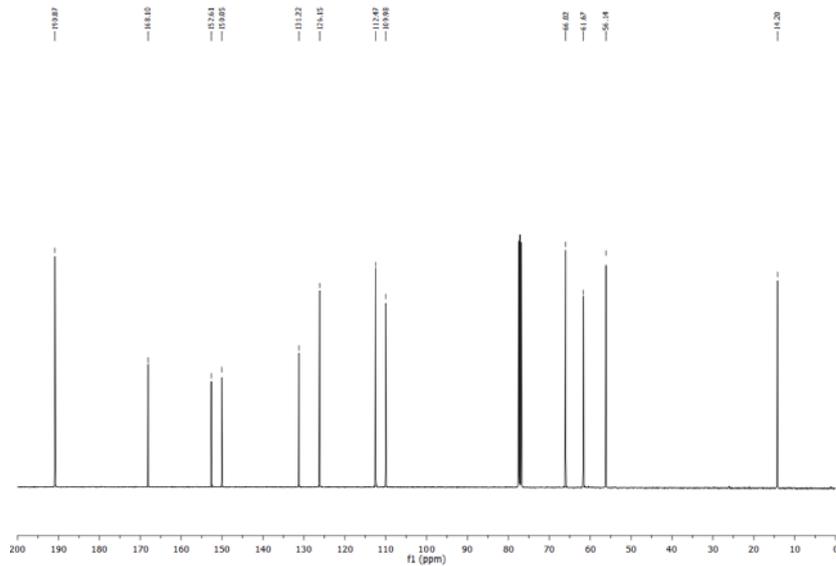
133.60		24
128.02		1
120.97		33
120.00	+	34
118.61	+	36
111.75		29
111.57		28
110.36	+	6
108.29	+	3
100.80	+	12
76.67		20
69.89	+	18
69.70	+	15
67.40	+	16
65.67	-	23
63.78	-	8
56.81	+	38
56.60	+	7
56.51	+	9
47.28	+	14
35.80	-	19
34.12	-	21
33.76	-	13
16.97	+	17

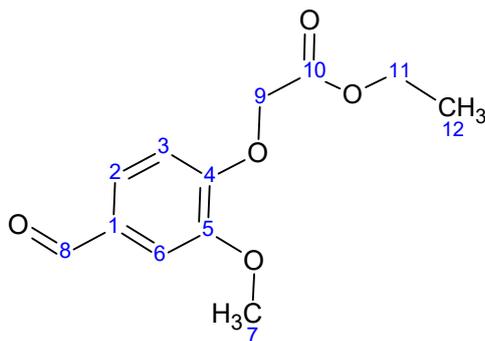
Compuesto 3

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



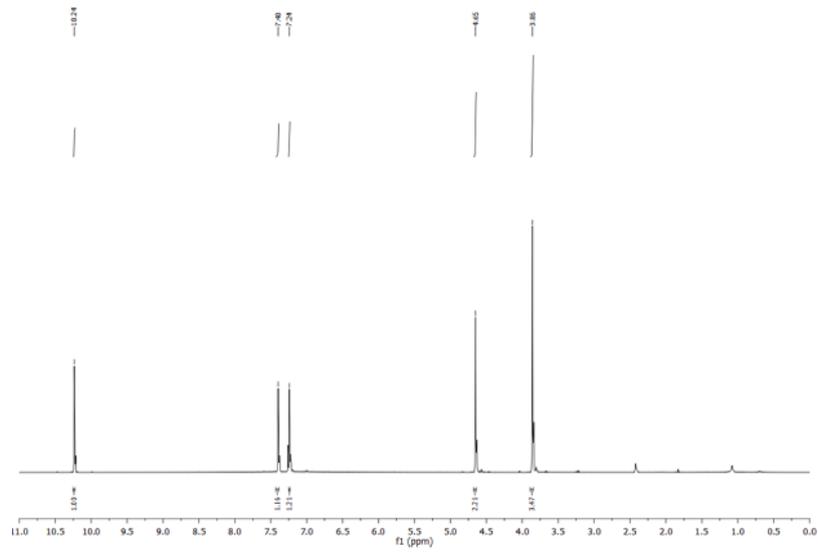


Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
9.83	1	s	8
7.41	1	d (1.80)	6
7.39	1	dd(8.07,1.88)	2
6.86	1	d (8.07)	3
4.75	2	s	9
4.24	2	q (7.14)	11
3.92	3	s	7
1.26	3	t (7.14)	12

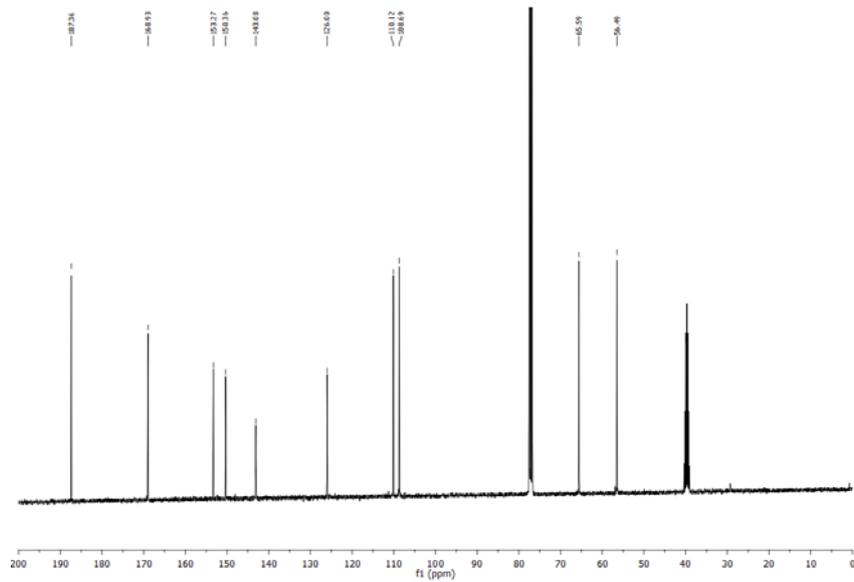
Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Número del átomo en la estructura
190.87	8
168.10	10
152.61	4
150.05	5
131.22	1
126.15	2
112.47	3
109.98	6
66.02	9
61.67	11
56.14	7
14.20	12

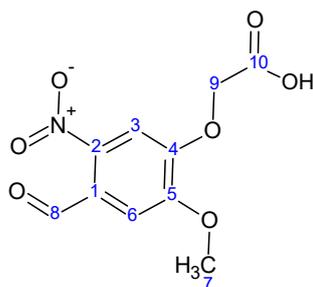
Compuesto 4

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



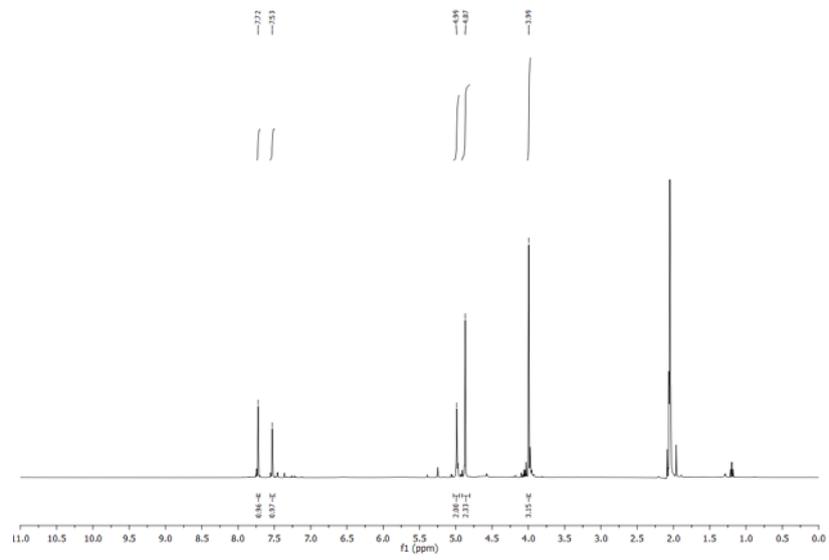


Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
10.24	1	s	8
7.40	1	s	3
7.24	1	s	6
4.65	2	s	9
3.86	3	s	7

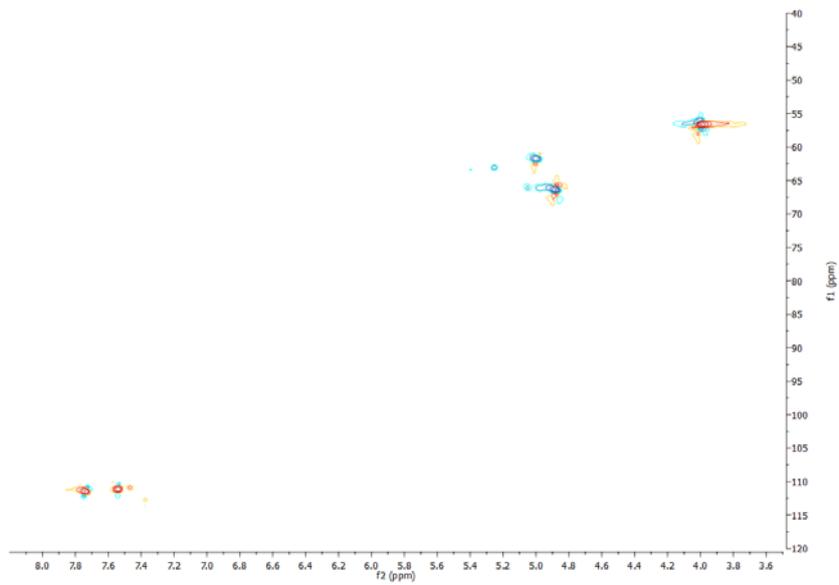
Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Número del átomo en la estructura
187.36	8
168.93	10
153.27	5
150.36	4
143.08	2
126.00	1
110.12	6
108.69	3
65.59	9
56.49	7

Compuesto 5

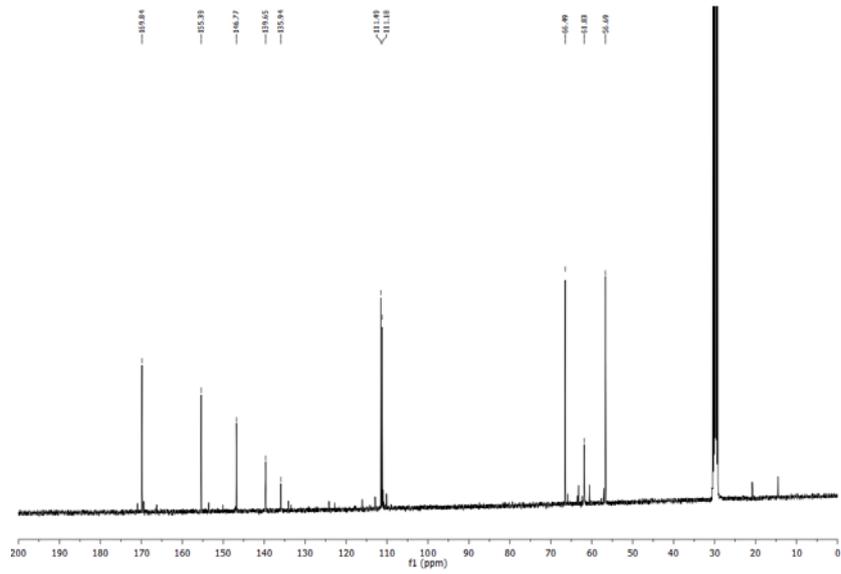
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



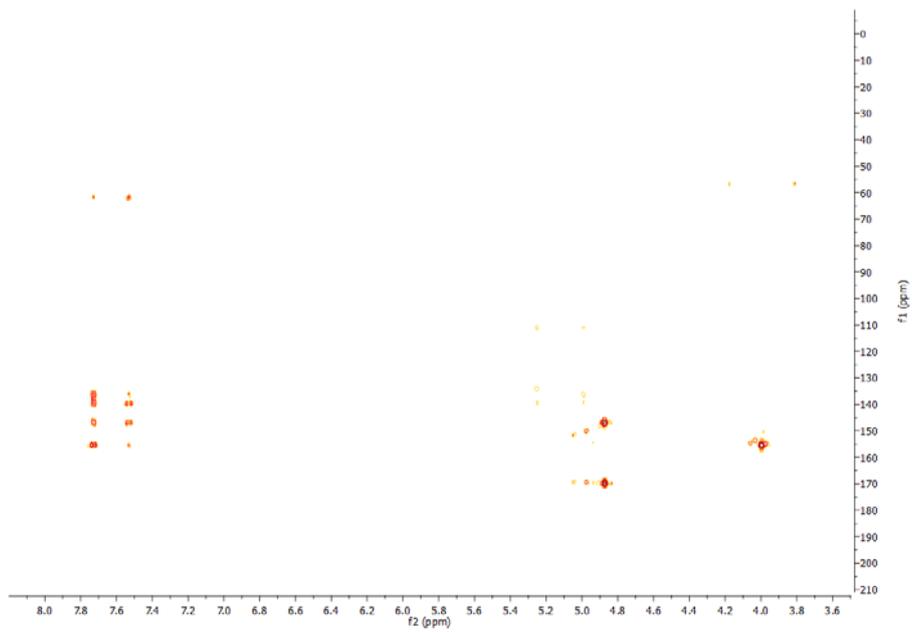
Espectro HSQC



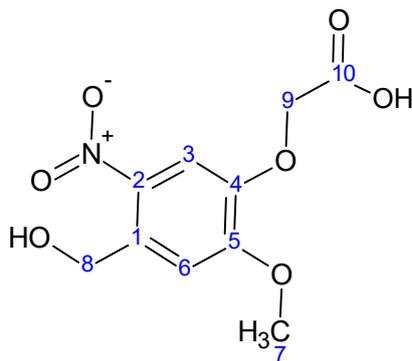
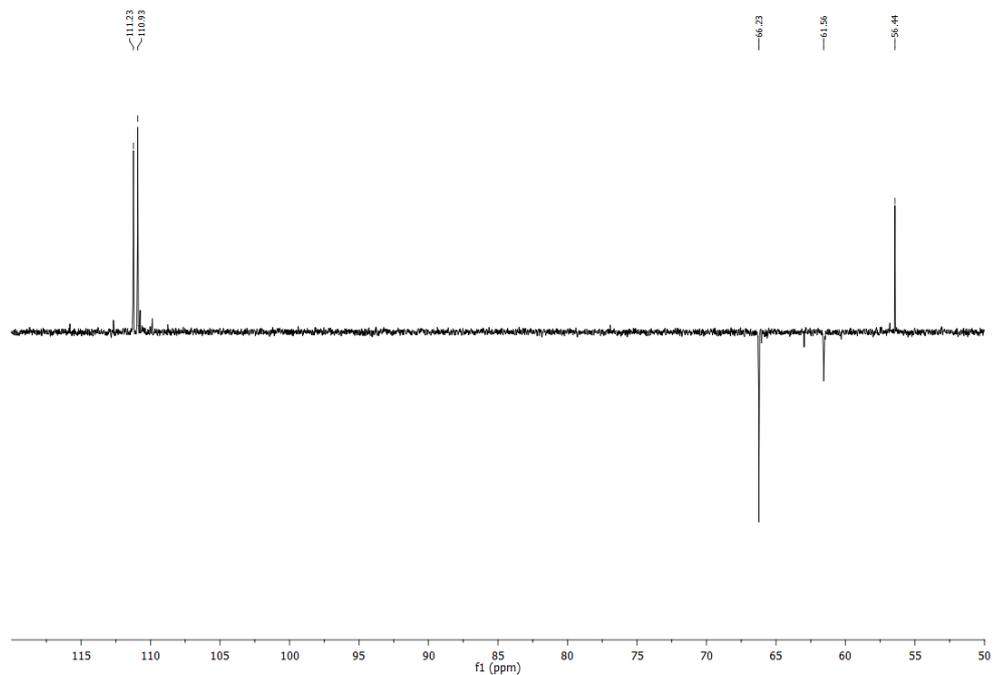
Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Espectro HMBC



Espectro DEPT-135



## *Materiales y Métodos*

---

Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) HSQC	Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) HMBC	Número del átomo en la estructura
7.72	1	s	111.49	155.39 146.77 139.65 135.94 61.83	3
7.53	1	s	111.18	155.39 146.77 139.65 135.94 61.83	6
4.99	2	s	61.83		8
4.87	2	s	66.49	169.84 146.77	9
3.99	3	s	56.69	155.39	7

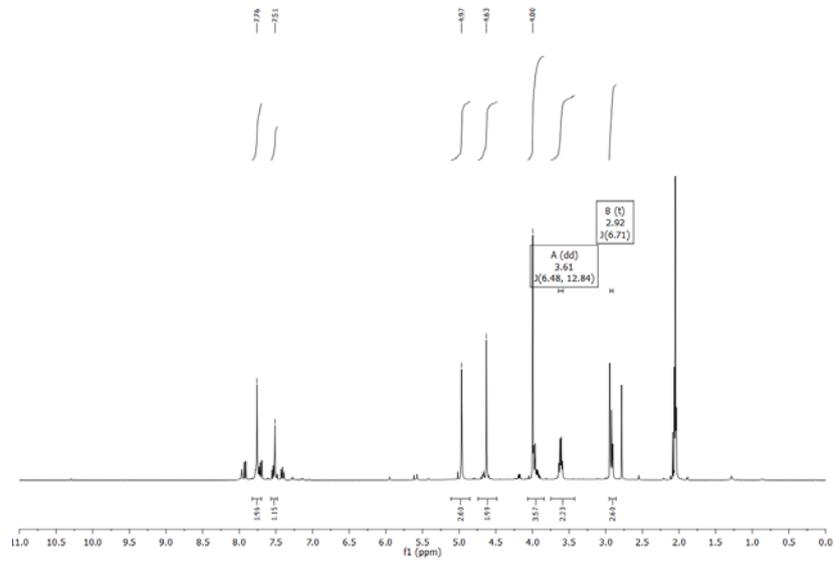
## *Materiales y Métodos*

---

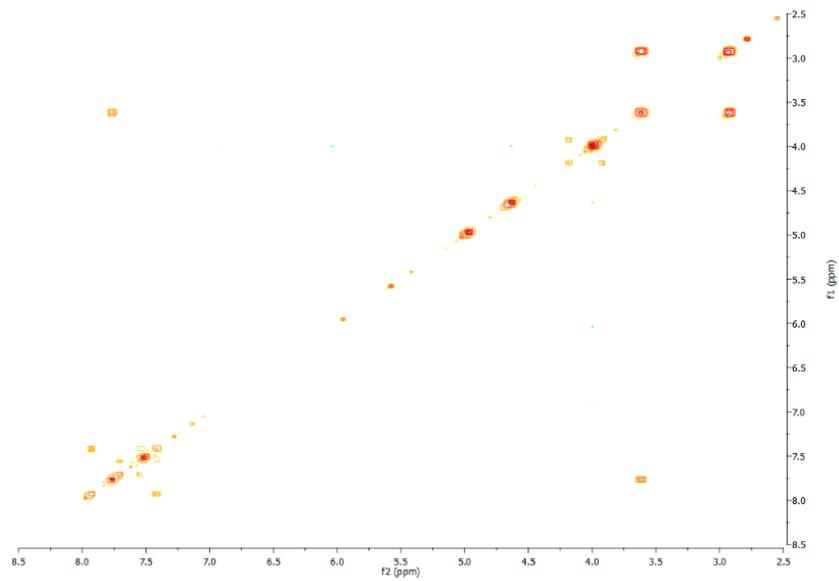
Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT- 135  Signo de la señal	Número del átomo en la estructura
169.84		10
155.39		5
146.77		4
139.65		2
135.94		1
111.49	+	3
111.18	+	6
66.49	-	9
61.83	-	8
56.69	+	7

Compuesto 6

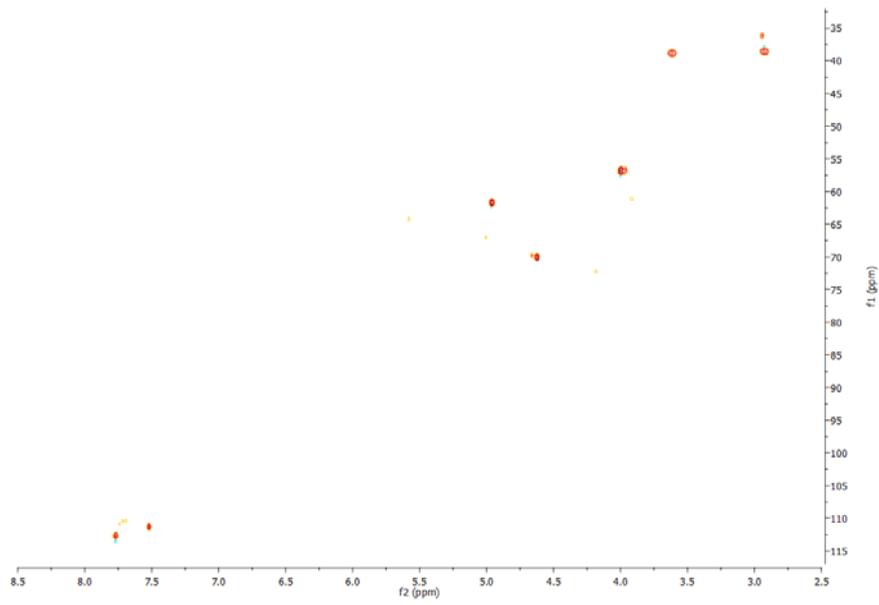
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



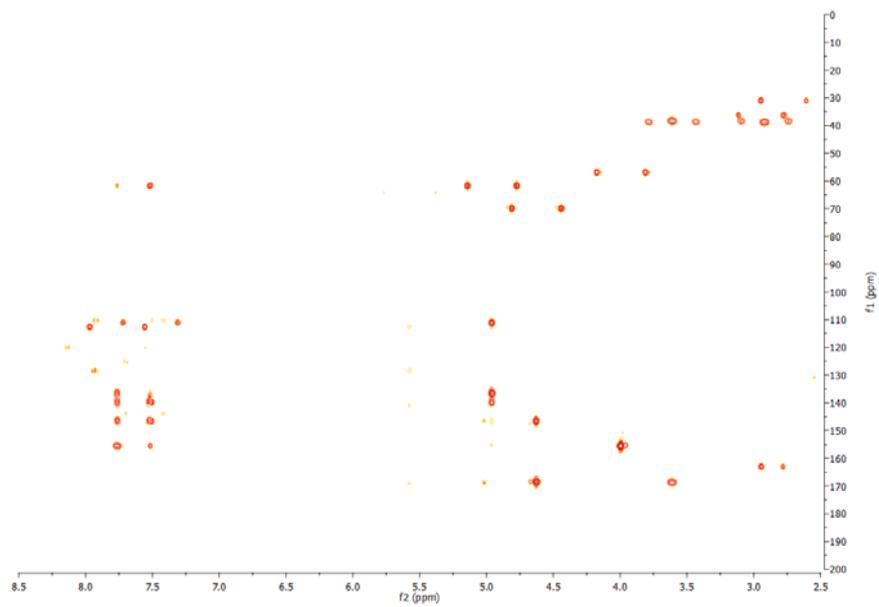
Espectro COSY



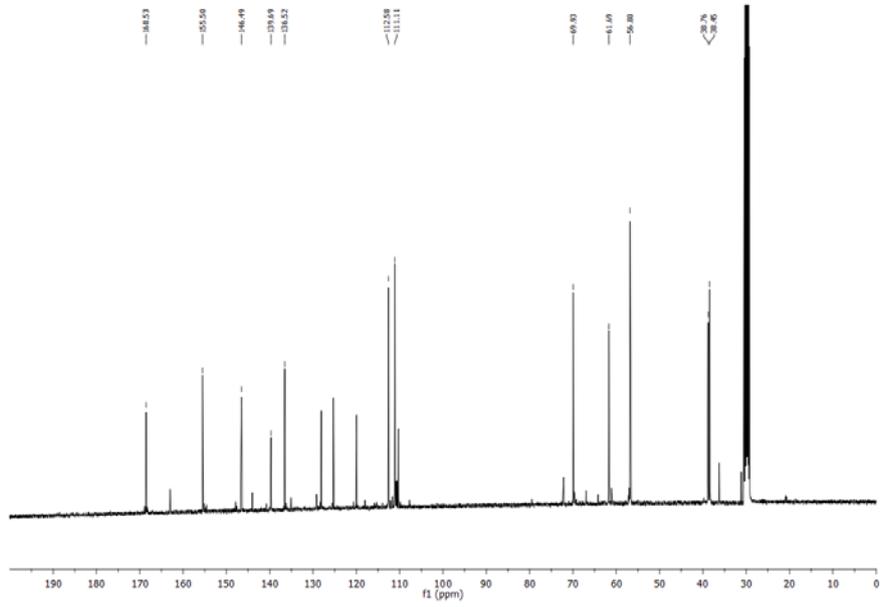
Espectro HSQC



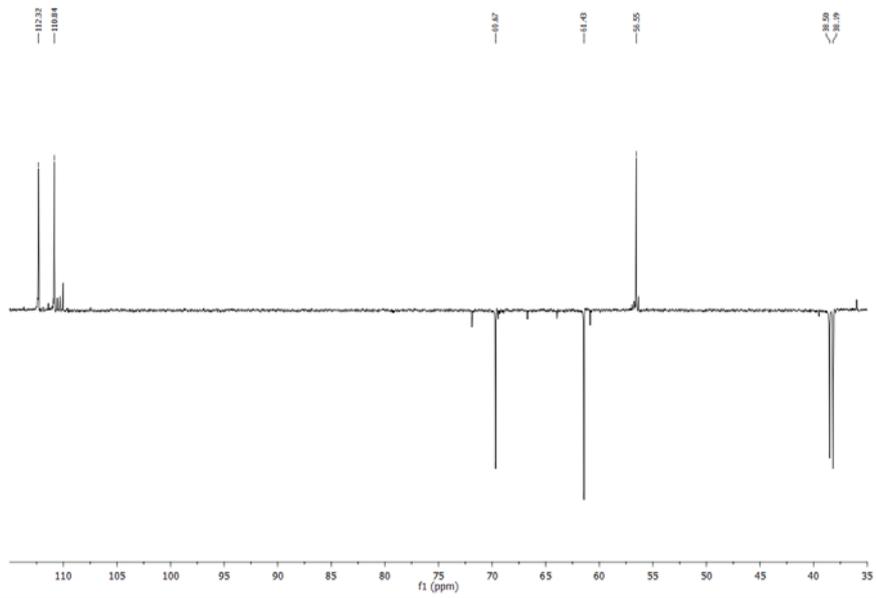
Espectro HMBC

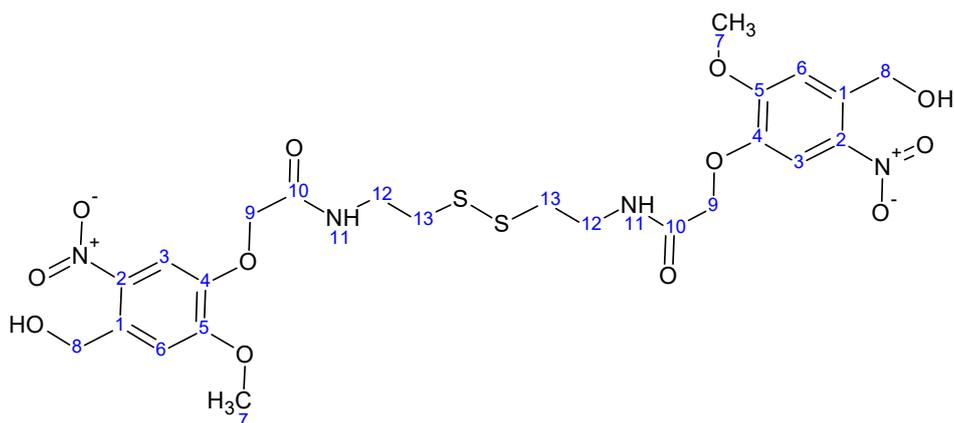


Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Espectro DEPT-135





Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) COSY	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HSQC	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HMBC	Número del átomo en la estructura
7.77	1	s	3.61			11
7.76	1	s		112.58	155.50 146.49 139.69 136.52	3
7.51	1	s		111.11	155.50 146.49 139.69 61.69	6
4.97	2	s		61.69	139.69 136.52 111.11	8
4.63	2	s		69.93	168.53	9

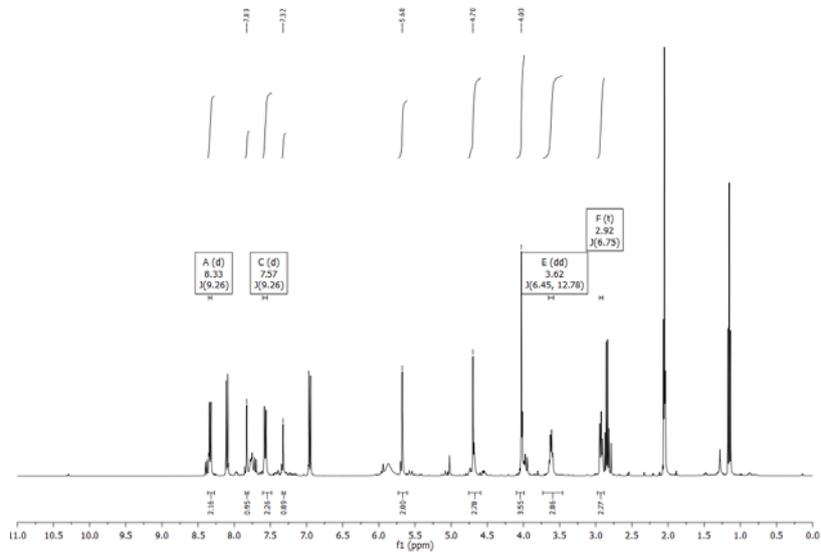
## *Materiales y Métodos*

					146.49	
4.00	3	s		56.80	155.50	7
3.61	2	dd (12.84, 6.48)	7.77 2.92	38.76	168.53 38.45	12
2.92	2	t (6.71)	2.92	38.45	38.76	13

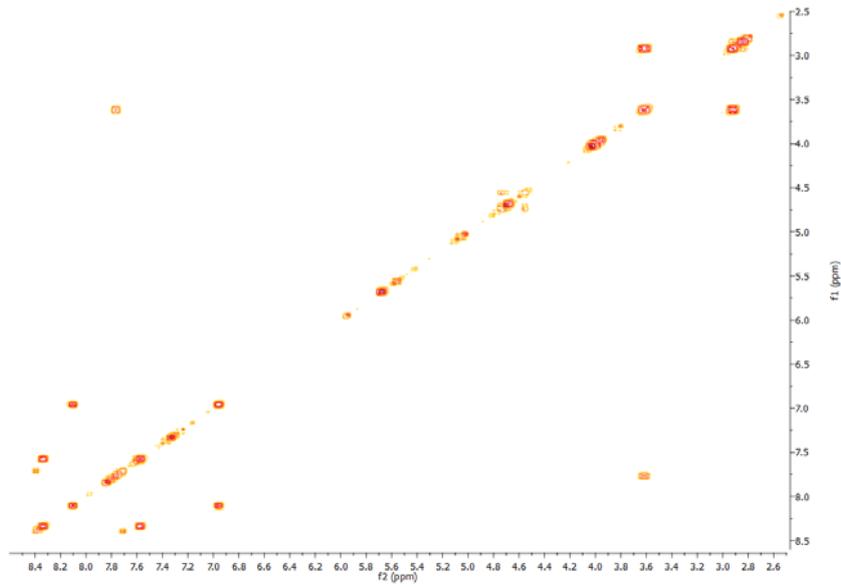
Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT- 135 Signo de la señal	Número del átomo en la estructura
168.53		10
155.50		5
146.49		4
139.69		2
136.52		1
112.58	+	3
111.11	+	6
69.93	-	9
61.69	-	8
56.80	+	7
38.76	-	12
38.45	-	13

Compuesto 7

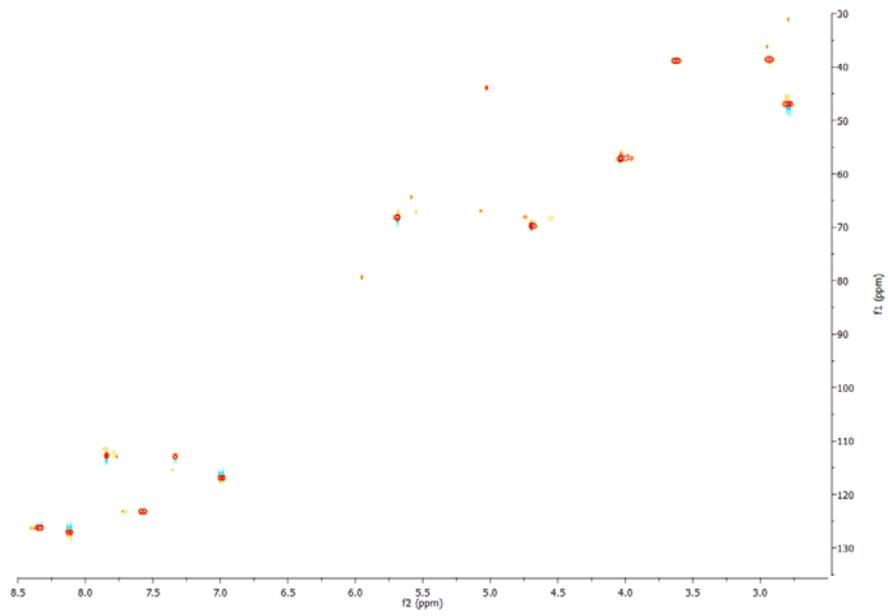
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



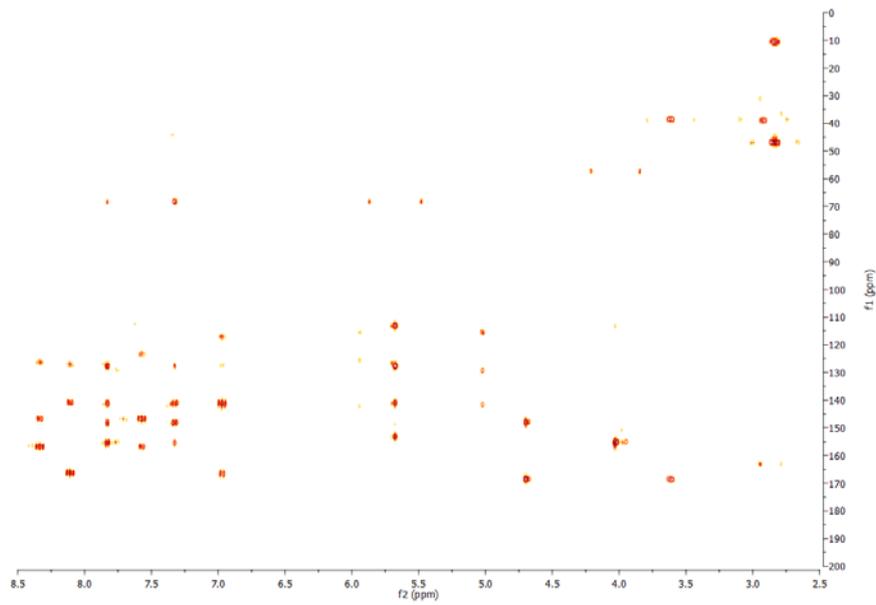
Espectro COSY



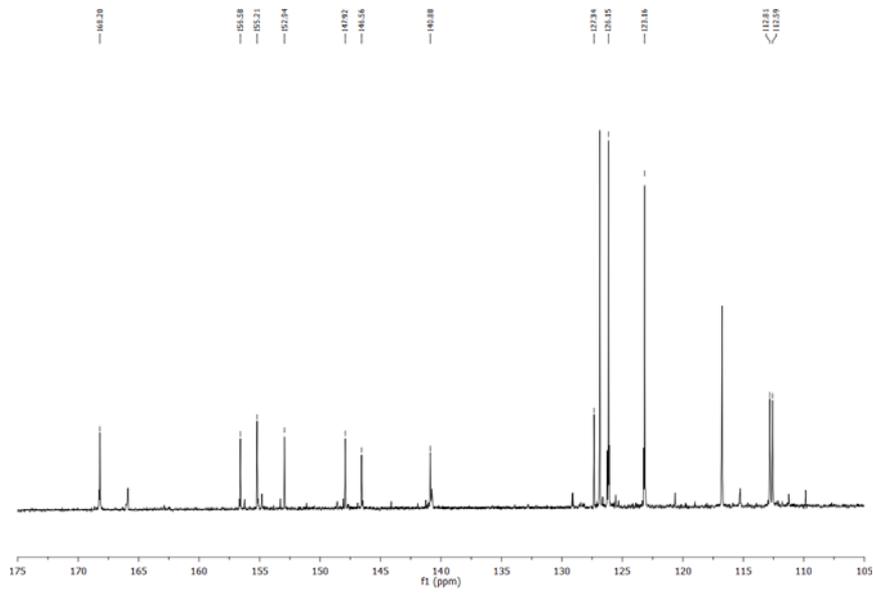
Espectro HSQC



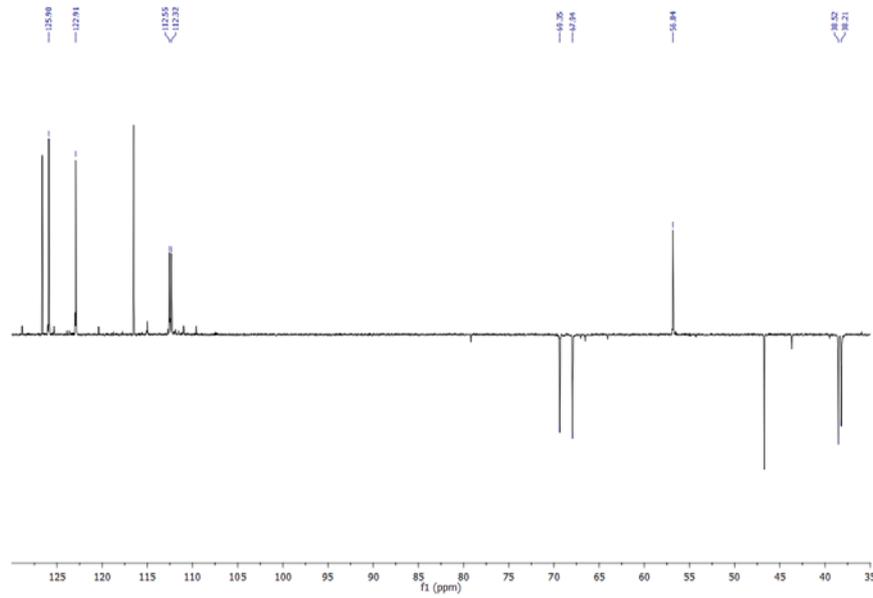
Espectro HMBC

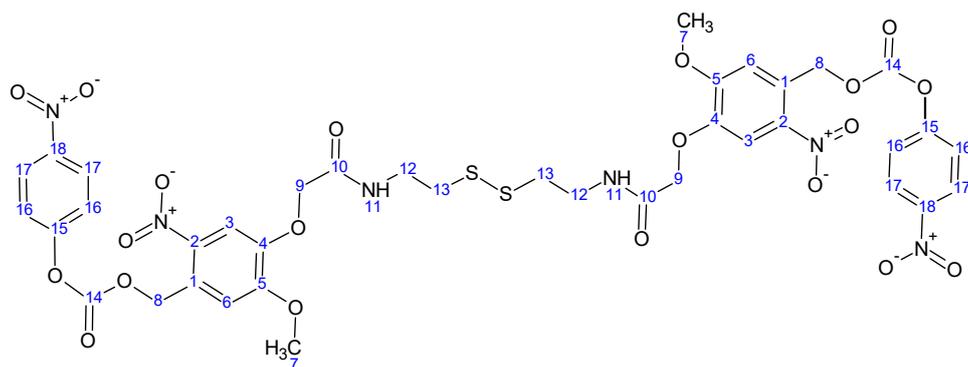


Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Espectro DEPT-135





Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) COSY	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HSQC	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HMBC	Número del átomo en la estructura
8.33	2	d (9.26)	7.57	126.15	156.58 146.56 126.15	17
7.83	1	s		112.59	155.21 147.92 140.88 127.34	3
7.77	1	s	3.61			11
7.57	2	d (9.26)	8.33	123.16	156.58 146.56 123.16	16
7.32	1	s		112.81	147.92 140.88 68.19	6

## *Materiales y Métodos*

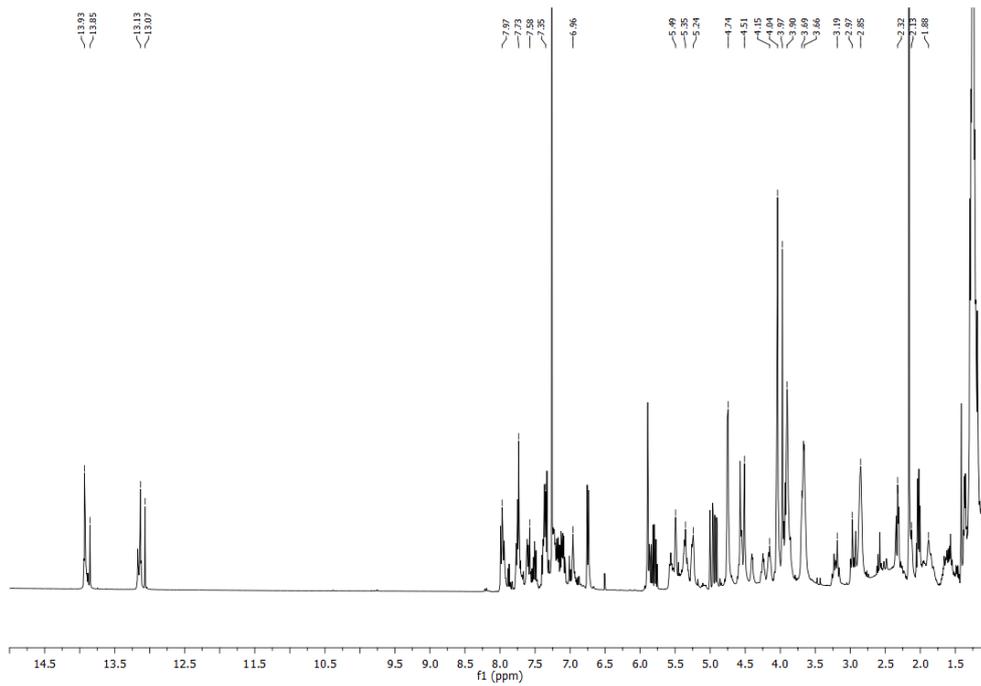
5.68	2	s		68.19	152.97 140.88 127.34 112.81	8
4.70	2	s		69.62	168.20 147.92	9
4.03	3	s		57.00	155.21	7
3.62	2	dd (12.78, 6.45)	7.77 2.92	38.78	168.20 38.47	12
2.92	2	t (6.75)	2.92	38.47	38.78	13

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT- 135 Signo de la señal	Número del átomo en la estructura
168.20		10
156.58		15
155.21		5
152.94		14
147.92		4
146.56		18
140.88		2
127.34		1
126.15	+	17
123.16	+	16
112.81	+	3
112.59	+	6
69.62	-	9

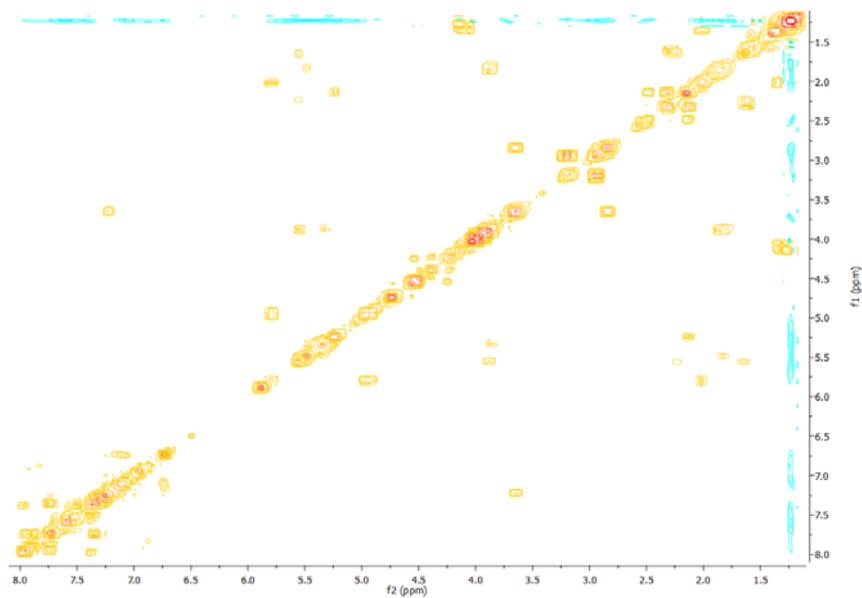
68.19	-	8
57.00	+	7
38.78	-	12
38.47	-	13

Compuesto **8**

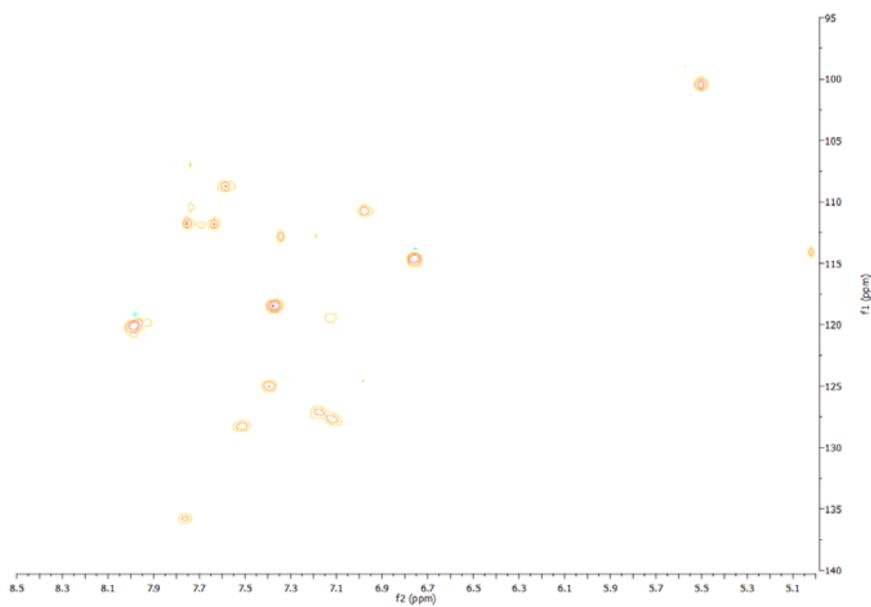
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



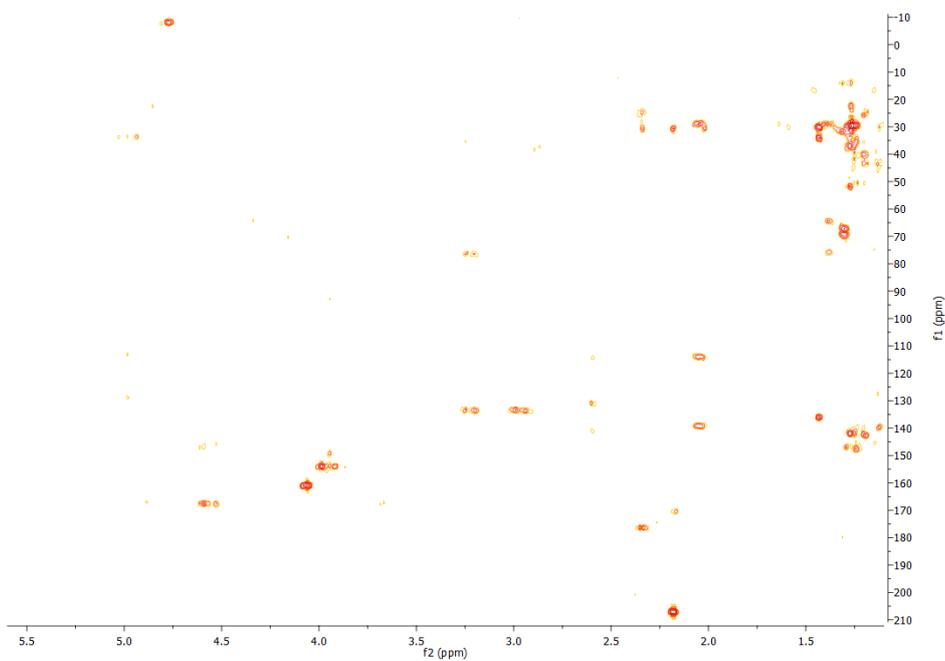
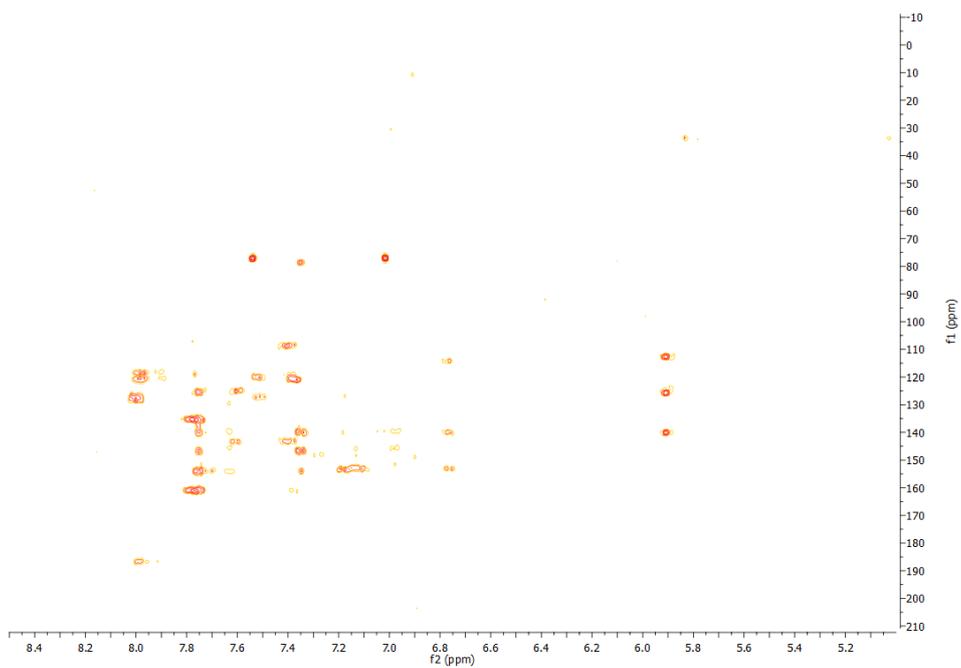
Espectro COSY



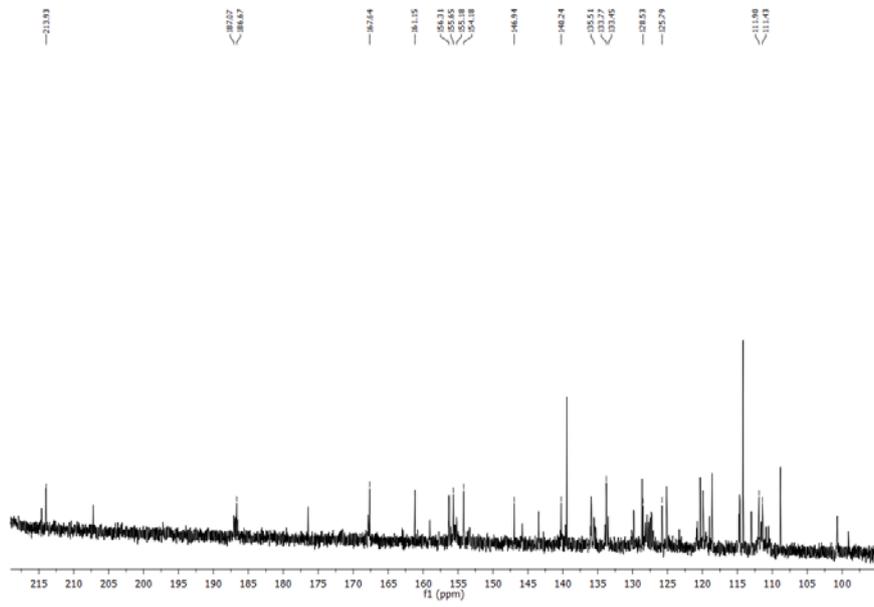
Espectros HSQC



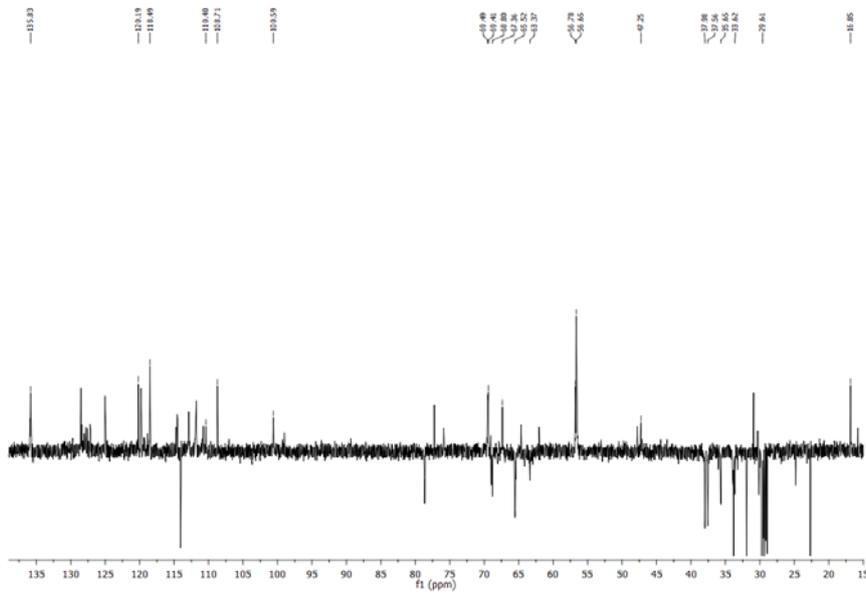




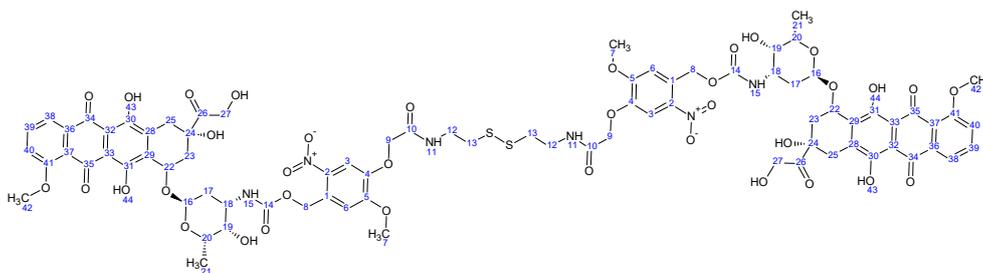
Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Espectro DEPT-135



## Materiales y Métodos



Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) COSY	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HSQC	Desplazamiento químico $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) HMBC	Número del átomo en la estructura
13.93 13.85	1	s			156.31 155.65 133.77 133.45 111.90 111.43	44
13.13 13.07	1	s			156.31 155.65 133.77 133.45 111.90 111.43	43
7.97	1	d	7.73	120.19	187.07 120.97 118.49	38
7.73	1	t	7.97 7.35	135.83	161.15 135.51	39

## *Materiales y Métodos*

7.58	1	s		108.71	154.18 146.94 140.24 128.53	3
7.35	1	d	7.73	118.49	161.21 120.19	40
7.23	1	s	3.66			11
6.96	1	s		110.40	146.94 140.24	6
5.49	1	d	1.88	100.59		16
5.35	2	s		63.37	155.22 139.96 128.02 110.36	8
5.32	1	d	3.90			15
5.24	1	m	2.13	69.49	133.72 76.77	22
4.74	2	s		65.52	213.92	27
4.51	2			68.80	167.64 146.94	9
4.15	1	m	1.27	67.36		20
4.04	3	s		56.78	161.21	42
3.97	3	s		56.65	154.18	7
3.90	1	s	1.81 3.69 5.32	47.25	155.18	18
3.69	1	m	3.90	69.41		19
3.66	2	m	2.85	37.98	47.28	12
3.19	1	d	2.97	33.62	133.77	25

## *Materiales y Métodos*

					133.45 76.67	
2.97	1	d	3.19	33.62	213.92 133.77 133.45	25
2.85	2		3.66	37.56	37.98	13
2.32	1	m	2.13	35.65		23
2.13	1	m	2.32 5.24	35.65		23
1.88	2	m	3.90 5.49	29.61		17
1.27	3	d	4.15	16.85	69.41 67.36	21

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT- 135  Signo de la señal	Número del átomo en la estructura
213.93		26
187.07		35
186.67		34
167.64		10
161.15		41
156.31		31
155.65		30
155.18		10
154.18		5
146.94		4
140.24		2

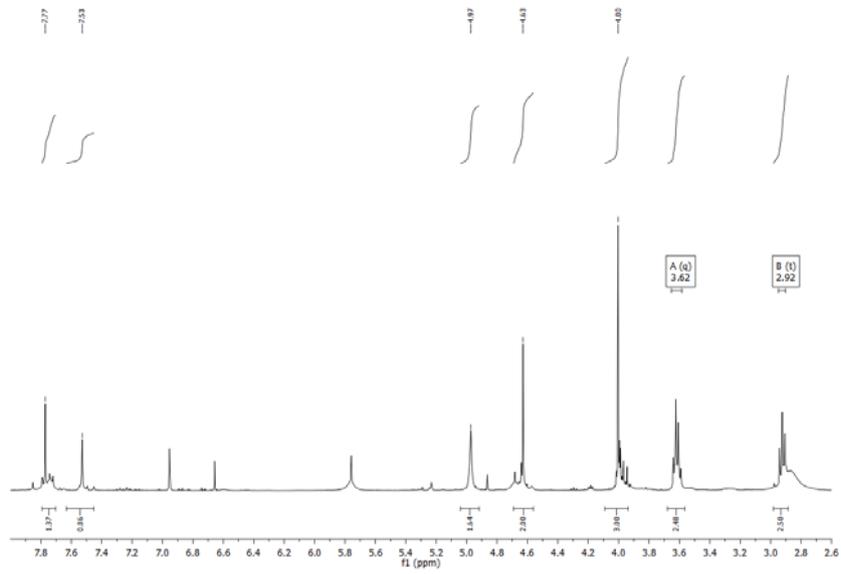
## *Materiales y Métodos*

---

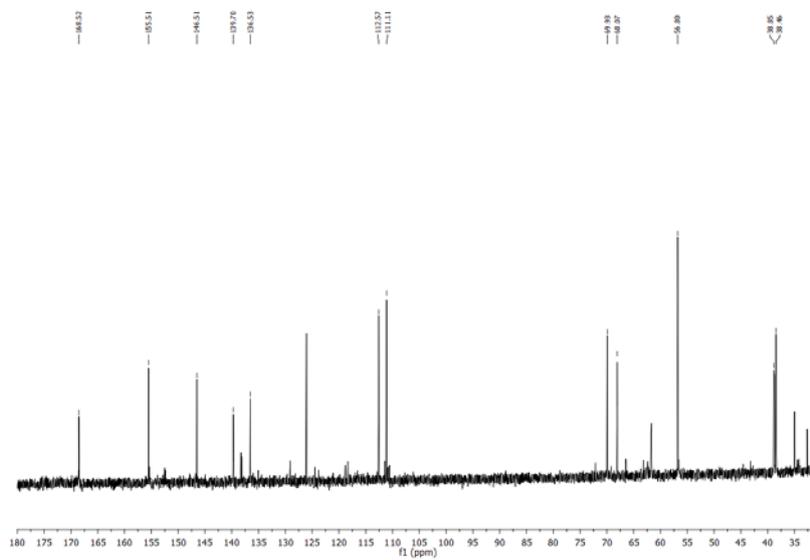
135.83	+	39
135.51		36
133.77		29
133.45		28
128.53		1
125.79		37
120.19	+	38
118.49	+	40
111.90		33
111.43		32
110.40	+	6
108.71	+	3
100.59	+	16
76.67		24
69.49	+	22
69.41	+	19
68.80	-	9
67.36	+	20
65.52	-	27
63.37	-	8
56.78	+	42
56.65	+	7
47.25	+	18
37.98	-	12
37.56	-	13
35.65	-	23
33.62	-	25
29.61	-	17
16.85	+	21

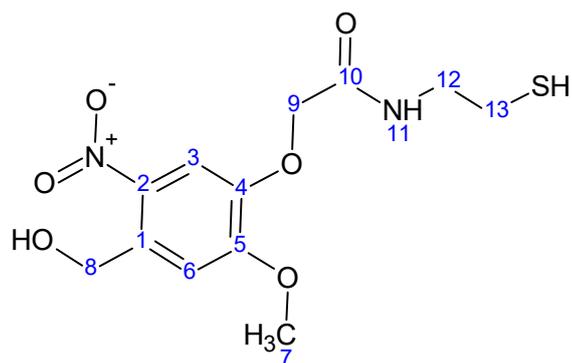
Compuesto 9

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN





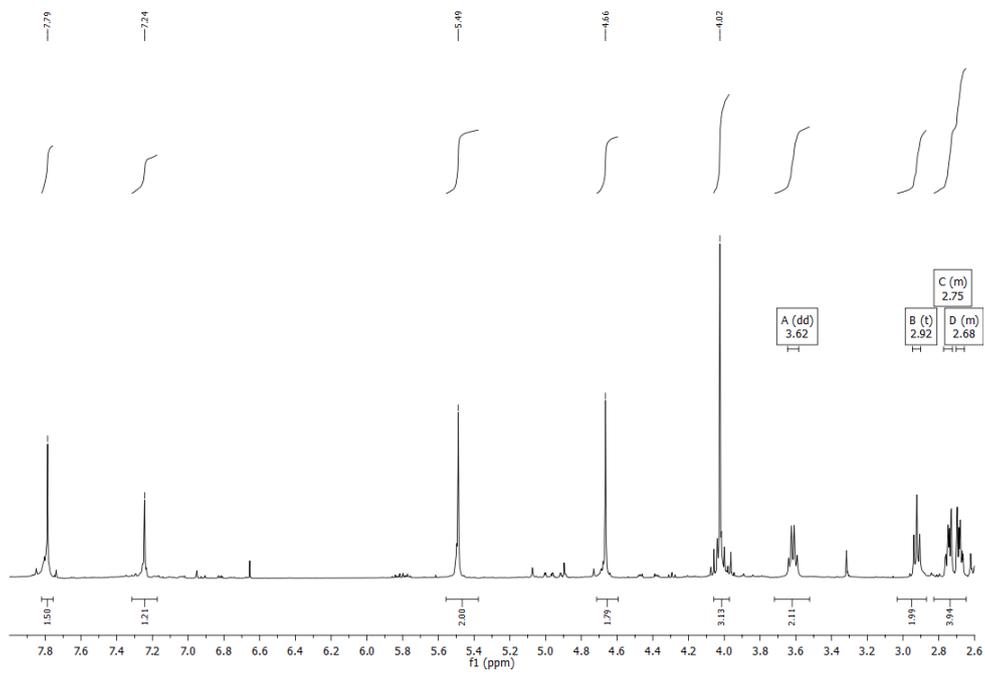
Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
7.77	1	s	11
7.76	1	s	3
7.53	1	s	6
4.97	2	s	8
4.63	2	s	9
4.00	3	s	7
3.62	2	dd (12.84, 6.48)	12
2.92	2	t (6.71)	13

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Número del átomo en la estructura
168.52	10
155.51	5
146.51	4
139.70	2
136.53	1

112.57	3
111.11	6
69.93	9
68.07	8
56.80	7
38.85	12
38.46	13

**Compuesto 10**

**Espectro  $^1\text{H}$ -RMN**





## *Materiales y Métodos*

---

Desplazamiento químico $\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
7.79	1	s	3
7.24	1	s	6
5.49	2	s	8
4.66	2	s	9
4.02	3	s	7
3.62	2	dd (12.84, 6.48)	12
2.92	2	t (6.71)	13
2.75	2	m	15
2.68	2	m	16

Desplazamiento químico $\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	Número del átomo en la estructura
173.97	14
172.65	17
168.62	10
155.38	5

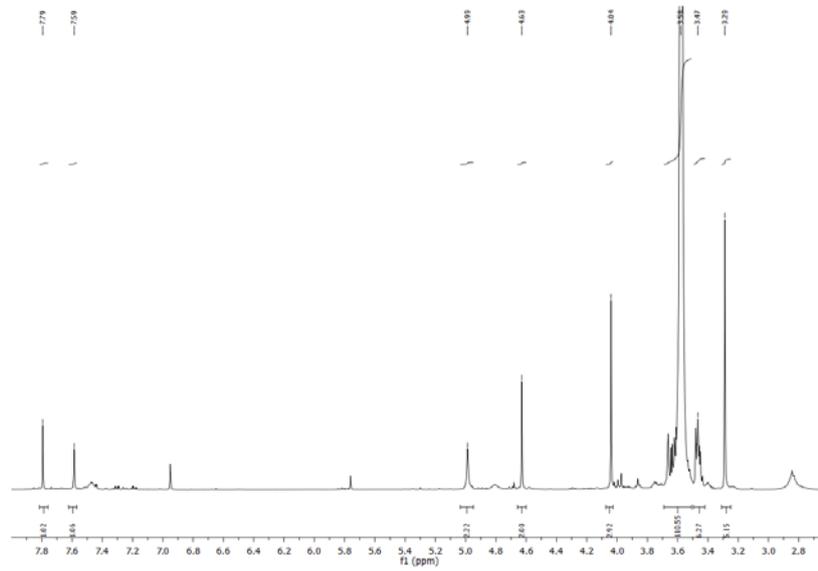
## *Materiales y Métodos*

---

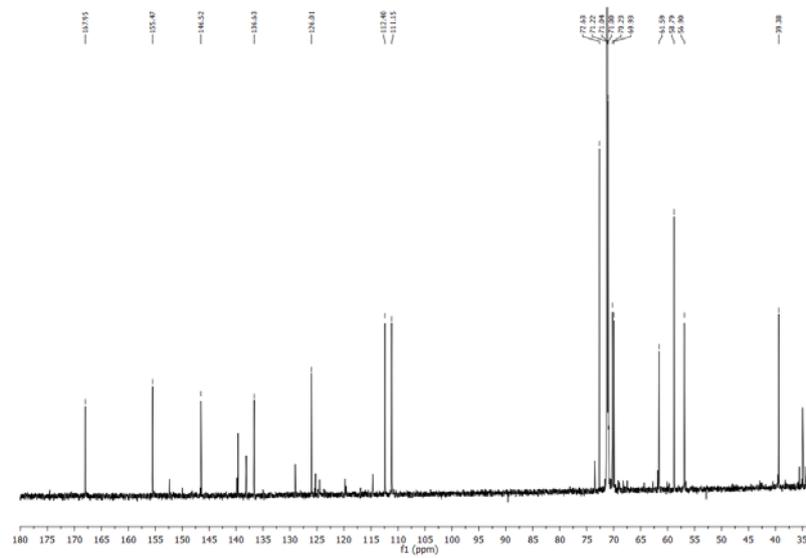
147.20	4
140.36	2
129.79	1
112.61	3
111.62	6
69.71	9
63.52	8
57.08	7
38.91	12
38.40	13
30.71	15
30.59	16

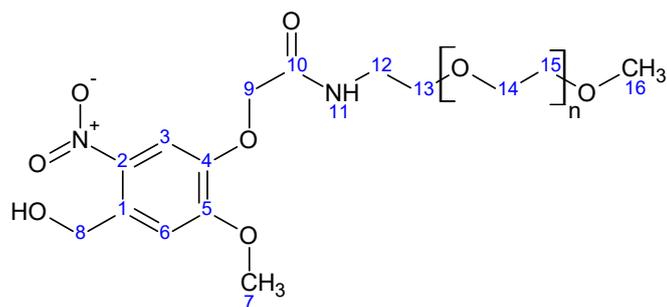
Compuesto 11

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN





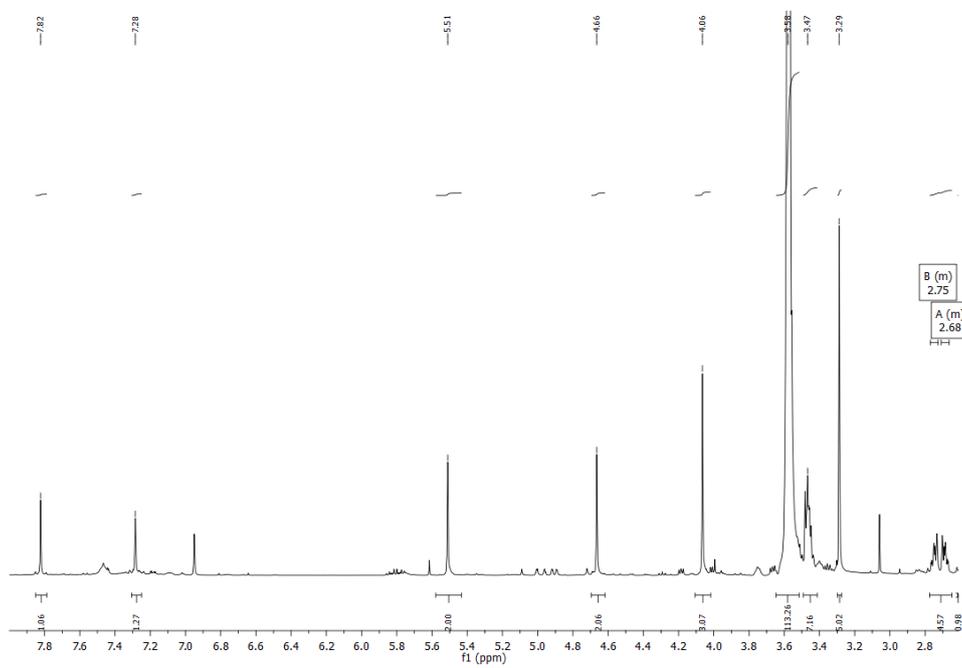
Desplazamiento químico $\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
7.79	1	s	3
7.59	1	s	6
4.99	2	s	8
4.63	2	s	9
4.04	3	s	7
3.58	64	m	14, 15
3.47	4	m	12, 13
3.29	3	s	16

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Número del átomo en la estructura
167.95	10
155.47	5
146.52	4
136.63	2
126.01	1
112.40	3

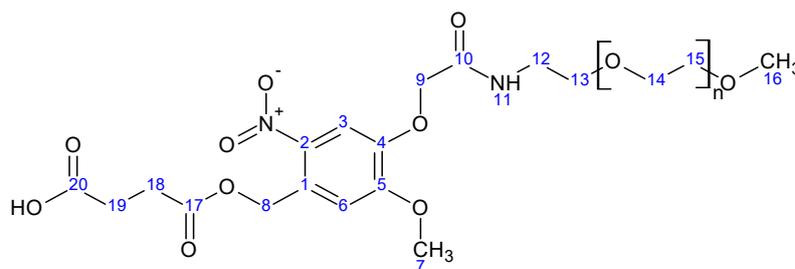
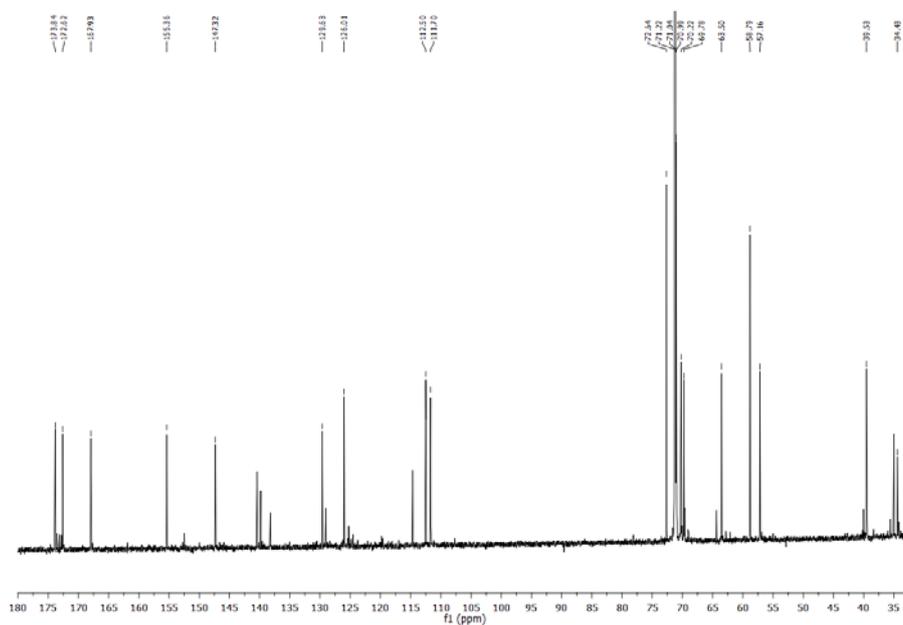
111.15	6
72.63	14
71.22	15
70.23	13
69.93	9
61.59	8
58.79	16
56.90	7
39.38	12

Compuesto 12

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



Desplazamiento químico $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad J (Hz)	Número del átomo en la estructura
7.82	1	s	3
7.28	1	s	6
5.51	2	s	8

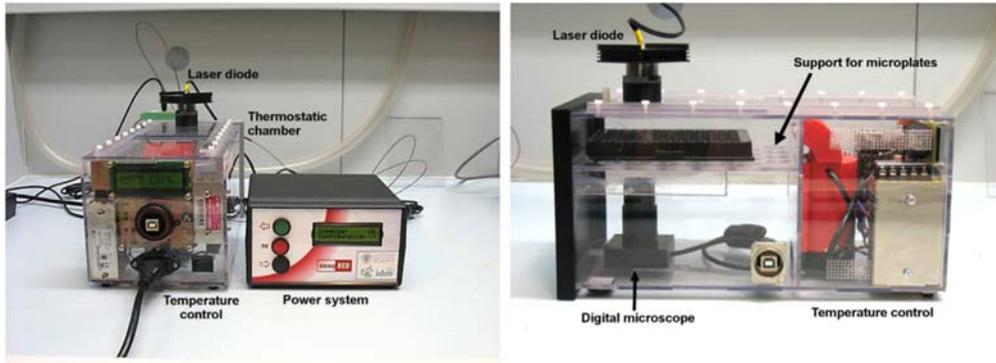
## *Materiales y Métodos*

---

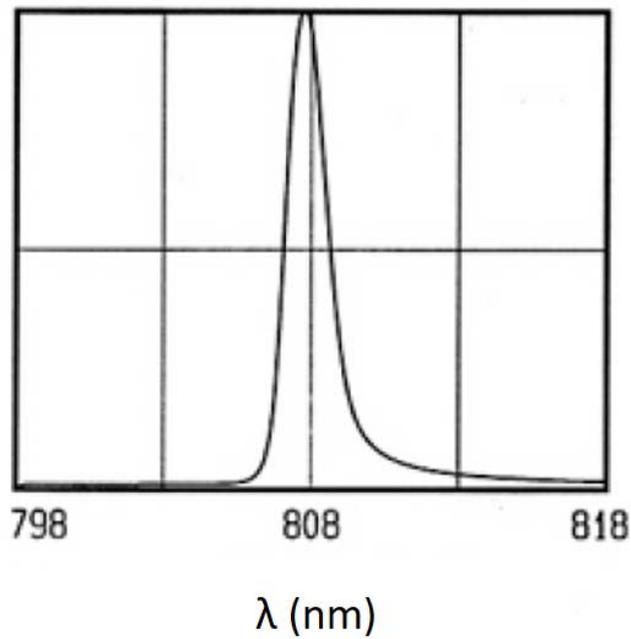
4.66	2	s	9
4.06	3	s	7
3.58	64	m	14, 15
3.47	4	m	12, 13
3.29	3	s	16
2.75	2	m	18
2.68	2	m	19

Desplazamiento químico $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Número del átomo en la estructura
173.84	17
172.62	20
167.93	10
155.36	5
147.32	4
129.63	2
126.01	1
112.50	3
111.70	6
72.64	14
71.22	15
70.22	13
69.78	9
63.50	8
58.79	16
57.16	7
39.53	12
34.43	18
32.59	19

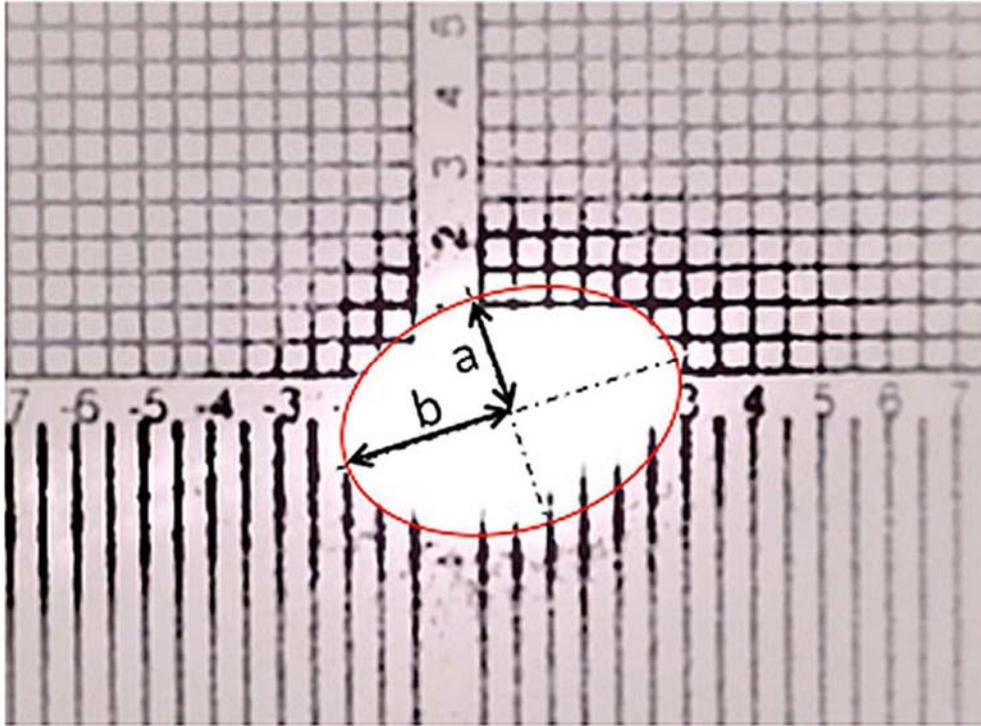
**10. Equipo láser y otras imágenes**



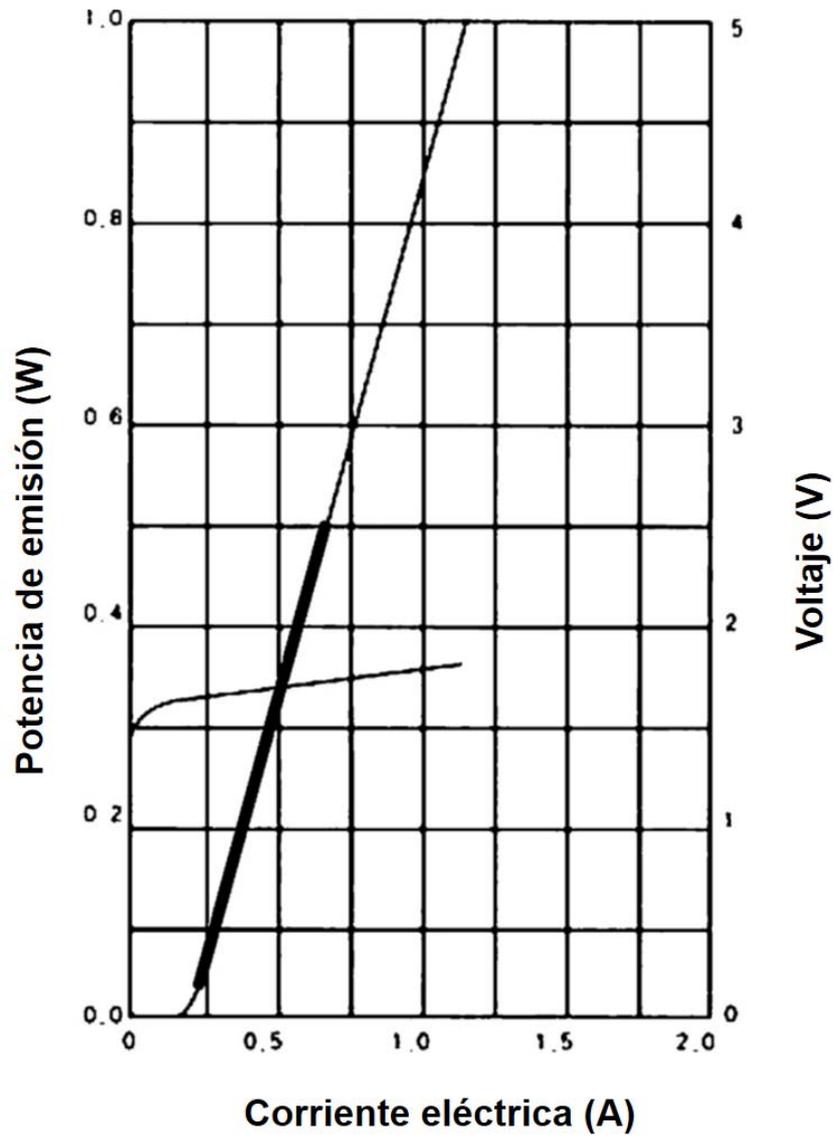
**Figura 1.** Vista frontal y lateral del equipo desarrollado en el instituto para aplicaciones de hipertermia y liberación controlada. El equipo está compuesto del diodo láser, la cámara termostata y el sensor de temperatura de fibra óptica.



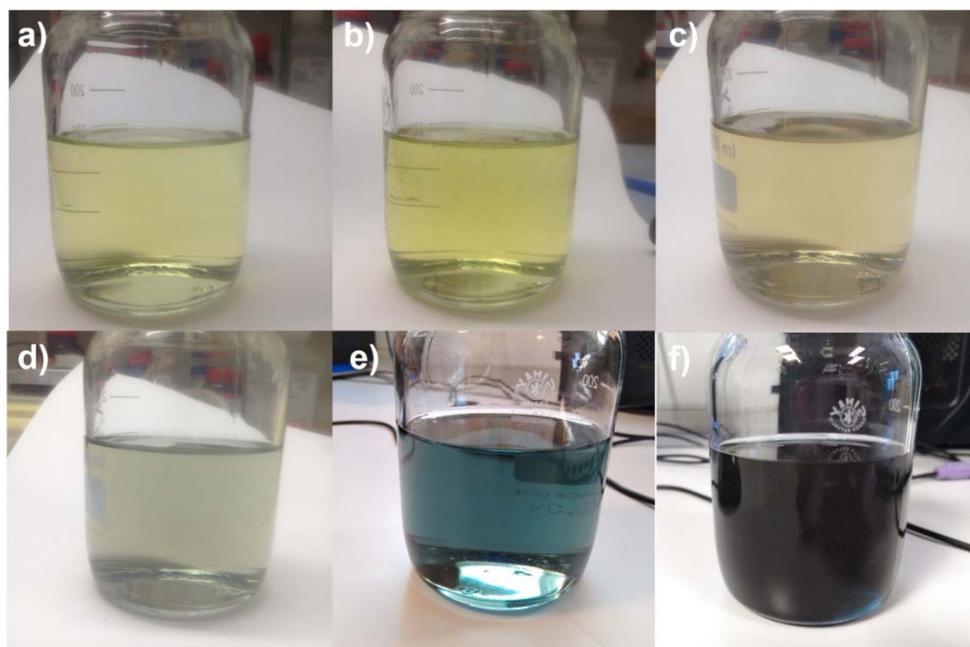
**Figura 2.** Espectro de emisión del láser.



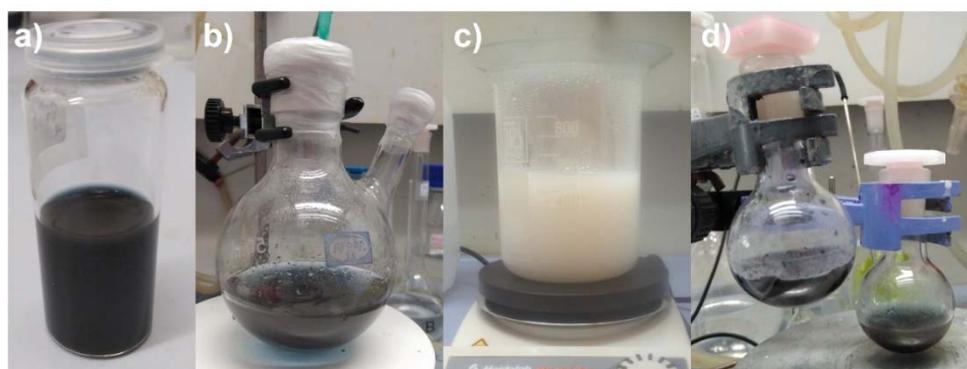
**Figura 3.** Rejilla calibrada para determinar las dimensiones y el área del haz del láser.  
Escala: 0.5 mm.



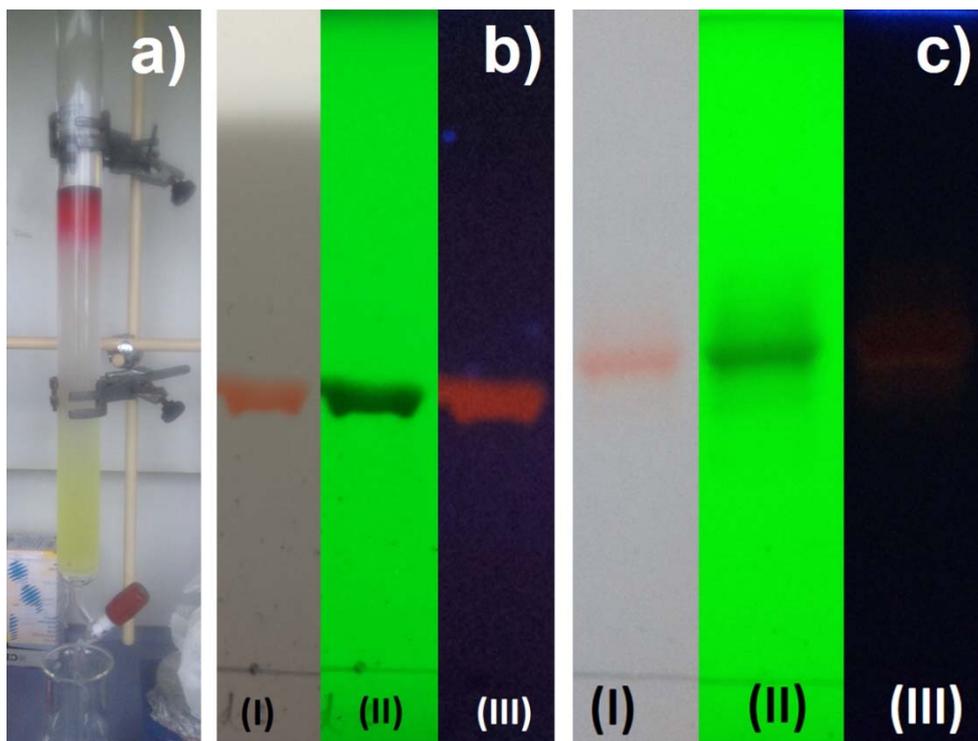
**Figura 4.** Dependencia de la potencia de emisión y del voltaje en función de la corriente del láser. La línea gruesa representa el intervalo de trabajo lineal seleccionado para el láser cuya ecuación es  $P(W) = 1.07 \cdot I(A) - 0.2$ . La densidad de potencia del láser se calcula a partir de la potencia de emisión y del área del haz del láser:  $L = \frac{P}{S} = \frac{P}{\pi \cdot a \cdot b}$ .



**Figura 5.** Imágenes de la mezcla de reacción durante diferentes momentos de la síntesis de las AuNSt: disolución de PVP en DMF (a); después de la adición de la disolución de  $\text{HAuCl}_4$  (b), después de la adición de la suspensión de AuNP (semillas de 15 nm)  $t = 0$  (c),  $t = 1$  h (d),  $t = 3$  h (e),  $t = 5$  h (f).



**Figura 6.** Imágenes de las suspensiones de las diferentes nanopartículas sintetizadas: AuNSt (a), AuNSt@mSiO<sub>2</sub> (b), MSNP (c), Janus AuNSt-MSNP (d).



**Figura 7.** Purificación por columna (a) de los profármacos de la doxorubicina (compuesto **2** y **8**). Análisis por TLC del compuesto **2** (b) y **8** (c); placa vista a la luz visible (I), 254 nm (II) y 365 nm (III); Fase móvil: DCM/MeOH 100/5 v/v.

### Conclusiones Generales

En este trabajo se han desarrollado cinco sistemas de fotoliberación de doxorubicina utilizando radiaciones NIR basados en tres tipos de nanopartículas: AuNSts, AuNSt@mSiO<sub>2</sub> y Janus AuNSt-MSNP con potenciales aplicaciones en la terapia del cáncer.

En primer lugar, se describió la preparación de un novedoso sistema de fotoliberación de fármacos basado en AuNSts recubiertas de una capa mesoporosa de sílice y funcionalizadas con moléculas de parafinas que actúan como puertas moleculares termosensibles. La temperatura alrededor de una AuNSt individual irradiada sobre una bicapa lipídica se incrementó por encima del punto de fusión de la parafina incluso a potencias del láser relativamente bajas. Las AuNSts se recubrieron con una capa mesoporosa de sílice utilizando un método que emplea el surfactante CTAB como plantilla para el crecimiento de la capa mesoporosa a 25 °C. Se evaluaron diferentes condiciones de síntesis incluyendo la relación molar CTAB/TEOS, la temperatura y la atmósfera inerte con el objetivo de preparar finalmente las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> con un mínimo cambio en la morfología del núcleo de oro y en sus propiedades ópticas. Estas nanopartículas se cargaron con doxorubicina y se modificó su superficie externa con ODTMS y heneicosano. Las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>@Dox@parafina no mostraron pérdidas apreciables de la carga en suspensiones acuosas, mientras que se observó una liberación significativa de doxorubicina después la irradiación NIR, incluso utilizando bajas densidades de potencia. Estas nanopartículas no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa hasta que se irradiaron con el láser de 808 nm que provoca la fusión de la parafina asociada a la superficie externa y la liberación de la doxorubicina desde el interior de los poros. El método utilizado en este trabajo para la preparación de las nanopartículas híbridas puede ser utilizado para la síntesis de otros sistemas de fotoliberación con pérdidas mínimas del fármaco encapsulado y que requieren bajas densidades de potencia para la activación de la liberación, dos características necesarias para su implementación en la terapia del cáncer.

## *Conclusiones Generales*

---

También, se describió un nuevo mecanismo para la foto-activación de dos profármacos de la doxorubicina basado en la disociación molecular multifotónica activada por radiaciones NIR de un espaciador 2-nitrobencílico en presencia de las AuNSts. Se sintetizó uno de los profármacos mediante la modificación química de la doxorubicina con el alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico a través de un enlace carbamato. La absorción multifotónica y la disociación de este profármaco en presencia de las AuNSts durante la irradiación NIR produjo la formación de la doxorubicina que se evidenció mediante el análisis por HPLC de las muestras irradiadas. Se sintetizó otro profármaco con un espaciador 2-nitrobencílico y un grupo disulfuro a partir de la vainillina. Se modificaron las AuNSts con este compuesto y se irradiaron utilizando el láser de 808 nm. La fotoliberación de doxorubicina se demostró mediante espectroscopía de fluorescencia, debido también a la disociación multifotónica del espaciador 2-nitrobencílico. Tanto los profármacos de la doxorubicina como las nanopartículas AuNSts y AuNSt@(PLM-Dox)<sub>2</sub> no mostraron citotoxicidad hacia las células HeLa, hasta que se irradiaron con un láser de 808 nm que provocó la foto-ruptura de los profármacos en presencia de las AuNSts y la liberación de la doxorubicina. El funcionamiento adecuado de estos materiales híbridos se basa en el empleo de las AuNSts que favorecen la absorción multifotónica de la radiación NIR y la foto-ruptura del espaciador 2-nitrobencílico que produce la liberación de la doxorubicina. El uso de estos sistemas permite superar las limitaciones asociadas con las elevadas potencias de irradiación requeridas para producir la absorción multifotónica en moléculas orgánicas y mejorar la quimioterapia basada en el tratamiento con doxorubicina del cáncer.

Por último, se desarrollaron dos sistemas de fotoliberación de doxorubicina basados en la foto-ruptura con radiaciones NIR de un espaciador 2-nitrobencílico utilizando nanopartículas Janus AuNSt-MSNP y AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. Las nanopartículas Janus se obtuvieron utilizando una emulsión de parafina en agua que permitió el enmascaramiento de una parte de la superficie de las MSNPs y la funcionalización selectiva de la otra parte de la superficie expuesta al medio. La doxorubicina se encapsuló en las MSNPs y se funcionalizó la superficie externa de los poros con un complejo Bzi-CD que actúa como puerta molecular sensible al pH.

## *Conclusiones Generales*

---

Se modificó las AuNSts con una molécula fotolábil que posee un espaciador 2-nitrobencílico y que permitió unir el ácido succínico a la superficie de las nanopartículas. El sistema híbrido mostró un adecuado perfil de liberación de doxorubicina debido a que la irradiación con un láser de 808 nm produce la fotodescomposición de la molécula fotolábil en la superficie de las AuNSts y la formación del ácido succínico que provoca la disociación del complejo Bzi-CD en la superficie de las MSNPs y la liberación de la doxorubicina. Por otro lado, las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> se obtuvieron mediante recubrimiento directo de las AuNSt con una capa mesoporosa de sílice y funcionalización con grupos aminos. Luego, las nanopartículas se cargaron con doxorubicina y se funcionalizó la superficie externa de los poros con moléculas de polietilenglicol con un espaciador 2-nitrobencílico y un grupo carboxilo que actúan como puertas moleculares fotosensibles. La irradiación de estas nanopartículas provocó la fotodescomposición de la molécula fotolábil, la liberación del PEG y la difusión de la doxorubicina desde el interior de la capa mesoporosa. Ambas nanopartículas híbridas no mostraron toxicidad hacia las células HeLa, demostrando la eficiencia de encapsulación del fármaco en la fase mesoporosa de sílice. La viabilidad celular disminuye después de la irradiación de ambas nanopartículas con un láser de 808 nm, debido a la liberación intracelular de la doxorubicina. El funcionamiento adecuado de estos materiales híbridos se basa en el empleo de moléculas fotolábiles que poseen un espaciador 2-nitrobencílico que puede enlazar a la molécula efectora sobre la superficie de las AuNSts en las nanopartículas Janus o actuar como puertas moleculares sobre la superficie de la capa mesoporosa de sílice en las nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub>. Estas moléculas fotolábiles se disocian durante la irradiación NIR de las nanopartículas provocando en última instancia la liberación de la doxorubicina. La metodología utilizada en este trabajo se puede extender para la síntesis de otros sistemas de fotoliberación de fármacos utilizando radiaciones NIR basados en nanopartículas Janus AuNSt-MSNP empleando otras puertas moleculares sobre la superficie de las MSNPs y otras moléculas efectoras asociadas sobre la superficie de las AuNSts a través de diferentes espaciadores fotolábiles y basados en nanopartículas AuNSt@mSiO<sub>2</sub> empleando otras puertas moleculares fotosensibles

## *Conclusiones Generales*

---

asociadas a la superficie externa de los poros a través de diferentes espaciadores fotolábiles.

### Referencias Bibliográficas

- [1] Y. Liu, H. Yuan, A. M. Fales, J. K. Register, T. Vo-Dinh, *Frontiers in Chemistry* **2015**, *3*, 1-7.
- [2] Y. Liu, J. R. Ashton, E. J. Moding, H. Yuan, J. K. Register, A. M. Fales, J. Choi, M. J. Whitley, X. Zhao, Y. Qi, Y. Ma, G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, D. G. Kirsch, C. T. Badea, T. Vo-Dinh, *Theranostics* **2015**, *5*, 946-960.
- [3] A. M. Fales, H. Yuan, T. Vo-Dinh, *Langmuir* **2011**, *27*, 12186–12190.
- [4] Y. Liu, M. Xu, Q. Chen, G. Guan, W. Hu, X. Zhao, M. Qiao, H. Hu, Y. Liang, H. Zhu, D. Chen, *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *10*, 4747-4761.
- [5] J. Yang, D. Shen, L. Zhou, W. Li, X. Li, C. Yao, R. Wang, A. M. El-Toni, F. Zhang, D. Zhao, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 3030–3037.
- [6] B. Liu, C. Li, Z. Cheng, Z. Hou, S. Huang, J. Lin, *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 890-909.
- [7] D. H. M. Dam, K. S. B. Culver, T. W. Odom, *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 580–587.
- [8] S. Vial, R. L. Reis, J. M. Oliveira, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2017**, *21*, 92-112.
- [9] Z. Wang, S. Zong, J. Yang, J. Li, Y. Cui, *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2883–2889.
- [10] A. Kumar, X. Zhang, X.-J. Liang, *Biotechnology Advances* **2013**, *31* 593–606.
- [11] W. Q. Lim, Z. Gao, *Nano Today* **2016**, *11*, 168-188.
- [12] N. S. Abadeer, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 4691–4716.
- [13] P. d. Pino, B. Pelaz, in *Frontiers of Nanoscience* (Eds.: J. M. d. I. Fuente, V. Grazu), Elsevier Ltd, Oxford, **2012**, pp. 309-335.
- [14] J. Liu, C. Detrembleur, M.-C. D. Pauw-Gillet, S. Mornet, C. Jérôme, E. Duguet, *Small* **2015**, *11*, 2323–2332.
- [15] S. Shen, H. Tang, X. Zhang, J. Ren, Z. Pang, D. Wang, H. Gao, Y. Qian, X. Jiang, W. Yang, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3150-3158.

- [16] A. S. Monem, N. Elbially, N. Mohamed, *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *470*, 1–7.
- [17] G.-F. Luo, W.-H. Chen, Q. Lei, W.-X. Qiu, Y.-X. Liu, Y.-J. Cheng, X.-Z. Zhang, *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 4339–4350.
- [18] S. Harmsen, R. Huang, M. A. Wall, H. Karabeber, J. M. Samii, M. Spaliviero, J. R. White, S. Monette, R. O'Connor, K. L. Pitter, S. A. Sastra, M. Saborowski, E. C. Holland, S. Singer, K. P. Olive, S. W. Lowe, R. G. Blasberg, M. F. Kircher, *Sci Transl Med.* **2015**, *7*, 1-21.
- [19] A. M. Fales, H. Yuan, T. Vo-Dinh, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 2291–2298.
- [20] G. Chirico, M. Borzenkov, P. Pallavicini, (Ed.: S. i. Materials), Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, Springer International Publishing Switzerland, **2015**.
- [21] Y. Wang, K. C. L. Black, H. Luehmann, W. Li, Y. Zhang, X. Cai, D. Wan, S.-Y. Liu, M. Li, P. Kim, Z.-Y. Li, L. V. Wang, Y. Liu, Y. Xia, *ACS Nano* **2013**, *7*, 2068–2077.
- [22] R. Rodríguez-Oliveros, J. A. Sánchez-Gil, *Optics Express* **2012**, *20*, 621-626.
- [23] H. Yuan, J. A. Gomez, J. S. Chien, L. Zhang, C. M. Wilson, S. Li, A. M. Fales, Y. Liu, G. A. Grant, M. Mirotsov, V. J. Dzau, T. Vo-Dinh, *J. Biophotonics* **2016**, *9*, 406–413.
- [24] A. Espinosa, A. K. A. Silva, A. Sánchez-Iglesias, M. Grzelczak, C. Péchoux, K. Desboeufs, L. M. Liz-Marzán, C. Wilhelm, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 1040–1048.
- [25] D. Jaque, L. M. Maestro, B. d. Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. M. Rodríguez, J. G. Solé, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9494-9530.
- [26] H. Yuan, C. G. Khoury, C. M. Wilson, G. A. Grant, A. J. Bennett, T. Vo-Dinh, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2012**, *8*, 1355–1363.
- [27] E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. n. Murguía, R. n. Martínez-Máñez, F. I. Sancenón, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 561–718.

- [28] E. Townsend, G. W. Bryant, *Nano Lett* **2012**, *12*, 429–434.
- [29] D. Bartczak, O. L. Muskens, S. Nitti, T. Sanchez-Elsner, T. Millar, A. G. Kanaras, *Small* **2012**, *8*, 122–130.
- [30] K. M. Schulz, S. Abb, R. Fernandes, M. Abb, A. G. Kanaras, O. L. Muskens, *Langmuir* **2012**.
- [31] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668–677.
- [32] N. G. Khlebtsov, L. A. Dykman, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* **2010**, *111*, 1–35.
- [33] X. Huang, M. A. El-Sayed, *Journal of Advanced Research* **2010**, *1*, 13–28.
- [34] G. Mie, *Ann Phys* **1908**, *25*, 377–445.
- [35] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4212–4217.
- [36] I. Pastoriza-Santos, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, *Eur. J. Inorg. Chem* **2010**, 4288–4297.
- [37] B. Wiley, Y. Sun, J. Chen, H. Cang, Z. Li, X. Li, Y. Xia, *MRS Bull* **2005**, *30*, 356–361.
- [38] B. Lim, Y. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed* **2011**, *50*, 76–85.
- [39] Y.-L. Luo, Y.-S. Shiao, Y.-F. Huang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7796–7804.
- [40] B. N. Khlebtsov, E. V. Panfilova, G. S. Terentyuk, I. L. Maksimova, A. V. Ivanov, N. G. Khlebtsov, *Langmuir* **2012**, *28*, 8994–9002.
- [41] S. Trigari, A. Rindi, G. Margheri, S. Sottini, G. Dellepiane, E. Giorgetti, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 6531–6540.
- [42] P. K. Jain, M. A. El-Sayed, *Chem. Phys. Lett* **2010**, *487*, 153–164.
- [43] I. Blakey, Z. Merican, K. J. Thurecht, *Langmuir* **2013**, *29*, 8266–8274.
- [44] P. S. Kumar, I. Pastoriza-Santos, B. Rodríguez-González, F. J. G. d. Abajo, L. M. Liz-Marzán, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 015606–015612.
- [45] O. M. Bakr, B. H. Wunsch, F. Stellacci, *Chem Mater* **2006**, *18*, 3297–3201.
- [46] F. Hao, C. L. Nehl, J. H. Hafner, P. Nordlander, *Nano Lett* **2007**, *7*, 729–732.
- [47] E. Hao, R. C. Bailey, G. C. Scharz, J. T. Hupp, S. Li, *Nano Lett* **2004**, *4*, 327–330.

- [48] E. M. Perassi, C. Hrelescu, A. Wisnet, M. Doblinger, C. Scheu, F. Jackel, E. A. Coronado, J. Feldmann, *ACS Nano* **2014**.
- [49] J. R. G. Navarro, D. Manchon, F. Lerouge, N. P. Blanchard, S. Marotte, Y. Leverrier, J. Marvel, F. Chaput, G. Micouin, A.-M. Gabudean, A. Mosset, E. Cottancin, P. L. Baldeck, K. Kamada, S. Parola, *Nanotechnology* **2012**, *23*, 1-7.
- [50] C. L. Nehl, H. Liao, J. H. Hafner, *Nano Lett* **2006**, *6*, 683–688.
- [51] L. Rodríguez-Lorenzo, R. Álvarez-Puebla, I. Pastoriza-Santos, S. Mazzucco, O. Stéphan, M. Kociak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4616–4618.
- [52] T. K. Lee, S. K. Kwak, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 5881–5888.
- [53] E. Prodan, C. Radloff, N. J. Halas, P. Nordlander, *Science* **2003**, *302*, 419–422.
- [54] P. Aldeanueva-Potel, E. Carbò-Argibay, N. Pazos-Pérez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, R. A. Álvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1-6.
- [55] L. Rodríguez-Lorenzo, R. A. Álvarez-Puebla, F. J. G. d. Abajo, L. M. Liz-Marzán, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7336–7340.
- [56] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 118–127.
- [57] R. Álvarez-Puebla, L. Liz-Marzán, F. G. Abajo, *J Phys Chem Lett* **2010**, *1*, 2428–2434.
- [58] C. G. Khoury, T. Vo-Dinh, *J Phys Chem C* **2008**, *112*, 18849–18859.
- [59] S. K. Dondapati, T. K. Sau, C. Hrelescu, T. A. Klar, F. D. Stefani, J. Feldmann, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6318-6322.
- [60] J. A. Webb, W. R. Erwin, H. F. Zarick, J. Aufrecht, H. W. Manning, M. J. Lang, C. L. Pint, R. Bardhan, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 3696–3707.
- [61] M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, J. I. Zink, *ACS Nano* **2008**, *2*, 889-896.
- [62] S. D. Perrault, C. Walkey, T. Jennings, H. C. Fischer, W. C. W. Chan, *Nano Lett* **2009**, *9*, 1909-1915.

## Referencias Bibliográficas

---

- [63] C. S. Kim, G. Y. Tonga, D. Solfiell, V. M. Rotello, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 93–99.
- [64] Y. Matsumura, H. A. Maeda, *Cancer Res* **1986**, 46, 6387–6392.
- [65] U. Silván, J. Arlucea, R. Andrade, A. Diez-Torre, M. Silio, M. A. Konerding, J. Arechaga, *Br. J. Cancer* **2009**, 101, 64–70.
- [66] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol* **2008**, 3, 145–150.
- [67] C. Tassa, J. L. Duffner, T. A. Lewis, R. Weissleder, S. L. Schreiber, A. N. Koehler, S. Y. Shaw, *Bioconjugate Chem* **2009**, 21, 14–19.
- [68] C. K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z.-J. Zhu, S. Menichetti, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1360–1361.
- [69] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, 464, 1067–1070.
- [70] Y. Bayazitoglu, S. Kheradmand, T. K. Tullius, *International Journal of Heat and Mass Transfer* **2013**, 67, 469–486.
- [71] L. M. Maestro, P. Haro-González, A. Sánchez-Iglesias, L. M. Liz-Marzán, J. G. Solé, D. Jaque, *Langmuir* **2014**, 30, 1650–1658.
- [72] G. S. Terentyuk, G. N. Maslyakova, L. V. Suleymanova, *J. Biomed. Opt.* **2009**, 14, 210161-210169.
- [73] A. Wijaya, S. B. Schaffer, I. G. Pallares, K. Hamad-Schifferli, *ACS Nano* **2009**, 3, 80-86.
- [74] A. Barhoumi, R. Huschka, R. Bardhan, M. W. Knight, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett* **2009**, 482, 171-179.
- [75] L. Poon, W. Zandberg, D. Hsiao, Z. Erno, D. Sen, B. D. Gates, N. R. Branda, *ACS Nano* **2010**, 4, 6395–6403.
- [76] S. Jelveh, D. B. Chithrani, *Cancers* **2011**, 3, 1081-1110.
- [77] N. M. Kovalchuk, V. M. Starov, *Advances in Colloid and Interface Science* **2012**, 179-182, 99–106.
- [78] Z. Niu, Y. Li, *Chem. Mater.* **2014**, 26, 72–83.
- [79] W. Wang, Q.-Q. Wei, J. Wang, B.-C. Wang, S.-h. Zhang, Z. Yuan, *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, 404, 223–229.

- [80] L. E. v. Vlerken, T. K. Vyas, M. M. Amiji, *Pharmaceutical Research* **2007**.
- [81] B. V. d. Broek, N. Devoogdt, A. D'Hollander, H.-L. Gijs, K. Jans, L. Lagae, S. Muyltermans, G. Maes, G. Borghs, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4319–4328.
- [82] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2012**.
- [83] H. Lee, M.-Y. Lee, S. H. Bhang, B.-S. Kim, Y. S. Kim, J. H. Ju, K. S. Kim, S. K. Hahn, *ACS Nano* **2014**.
- [84] G. Bisker, D. Yeheskely-Hayon, L. Minai, D. Yelin, *Journal of Controlled Release* **2012**, *162*, 303–309.
- [85] D. Bartczak, A. G. Kanaras, *Langmuir* **2011**, *27*, 10119–10123.
- [86] R. K. DeLong, C. M. Reynolds, Y. Malcolm, A. Schaeffer, T. Severs, A. Wanekaya, *Nanotechnology, Science and Applications* **2010**, *3*, 53–63.
- [87] I. H. Lee, J. M. Lee, Y. Jung, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**.
- [88] H. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc* **2006**, *128*, 2115-2120.
- [89] I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Cancer Lett* **2006**, *239*, 129-135.
- [90] M. Everts, V. Saini, J. L. Leddon, R. J. Kok, M. Stoff-Khalili, M. A. Preuss, L. C. Millican, G. Perkins, J. M. Brown, H. Bagaria, D. E. Nikles, D. T. Johnson, V. P. Zharov, D. T. Curiel, *Nano Lett* **2006**, *6*, 587-591.
- [91] I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Nano Lett* **2005**, *5*, 829-834.
- [92] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847– 4854.
- [93] I. M. Lifshitz, V. V. Slyozov, *J. Phys. Chem. Solids* **1961**, *19*, 35– 50.
- [94] H. Zheng, R. K. Smith, Y.-w. Jun, C. Kisielowski, U. Dahmen, A. P. Alivisatos, *Science* **2009**, *324*, 1309–1312.
- [95] F. Wang, V. N. Richards, S. P. Shields, W. E. Buhro, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5–21.
- [96] Y. Zheng, J. Zeng, A. Ruditskiy, M. Liu, Y. Xia, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 22–33.
- [97] S. E. Lohse, N. D. Burrows, L. Scarabelli, L. M. Liz-Marzán, C. J. Murphy, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 34–43.

- [98] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75.
- [99] G. Frens, *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20-22.
- [100] K. M. Bratlie, H. Lee, K. Komvopoulos, P. Yang, G. A. Somorjai, *Nano Lett* **2007**, *7*, 3097-3101.
- [101] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev* **2005**, *249*, 1870-1901.
- [102] A. Sánchez-Iglesias, E. Carbó-Argibay, A. Glaria, B. R.-. González, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. L.-. Marzán, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5558-5563.
- [103] T. K. Sau, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8648-8649.
- [104] L. D. Marks, *Rep. Prog. Phys.* **1994**, *57*, 603-649.
- [105] L. Vitos, A. V. Ruban, H. L. Skriver, J. Kollar, *Surf. Sci.* **1998**, *411*, 186-202.
- [106] F. Kim, S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, P. Yang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3673-3677.
- [107] D. Seo, C. I. Yoo, J. C. Park, S. M. Park, S. Ryu, H. Song, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 763-767.
- [108] M. Mahmoud, C. Tabor, M. El-Sayed, Y. Ding, Z. Wang, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 4590-4591.
- [109] H. Yuan, W. Ma, C. Chen, J. Zhao, J. Liu, H. Zhu, *Chem Mater* **2007**, *19*, 1592-1600.
- [110] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem Mater* **2003**, *15*, 1957-1962.
- [111] S. Chen, L. W. Wang, J. Ballato, S. H. Foulger, D. L. Carroll, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 16186-16187.
- [112] T. K. Sau, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8648-8649.
- [113] I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 679-688.
- [114] S. Barbosa, A. Agrawal, L. Rodríguez-Lorenzo, I. Pastoriza-Santos, R. A. Alvarez-Puebla, A. Kornowski, H. Weller, L. M. Liz-Marzán, *Langmuir* **2010**, *26*, 14943-14950.

- [115] A. Kedia, P. S. Kumar, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 1679–1686.
- [116] A. Kedia, P. S. Kumar, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 23721–23728.
- [117] A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, K. Hoffmann, K. Rurack, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924–5948.
- [118] K. Ariga, S. Ishihara, J. Labuta, J. P. Hill, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 3719–3733.
- [119] S. Koutsopoulos, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 1459–1476.
- [120] G. Bao, S. Mitragotri, S. Tong, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2013**, *15*, 253–282.
- [121] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26*, 62–69.
- [122] J. S. Beck, J. C. VartUli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T.-W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843.
- [123] M. T. Anderson, J. E. Martin, J. G. Odinek, P. P. Newcomer, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 311–321.
- [124] R. I. Nooney, D. Thirunavukkarasu, Y. Chen, R. Josephs, A. E. Ostafin, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 4721–4728.
- [125] Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590–2605.
- [126] M. Grun, I. Lauer, K. K. Unger, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 254–257.
- [127] Y.-S. Lin, K. R. Hurley, C. L. Haynes, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 364–374.
- [128] Z.-A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, Q. Huo, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3823–3829.
- [129] Q. Cai, Z.-S. Luo, W.-Q. Pang, Y.-W. Fan, X.-H. Chen, F.-Z. Cui, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 258–263.
- [130] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, S. Mann, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 649–652.
- [131] Y.-D. Chiang, H.-Y. Lian, S.-Y. Leo, S.-G. Wang, Y. Yamauchi, K. C.-W. Wu, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 13158–13165.

- [132] Y.-S. Lin, Chun-Yi, D. Lu, Y. Hung, C.-Y. Mou, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2628 – 2632.
- [133] S.-H. Wu, C.-Y. Mou, H.-P. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3862-3875.
- [134] F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou, *Small* **2009**, *5*, 1408–1413.
- [135] V. Cauda, C. Argyo, D. G. Piercey, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6484–6486.
- [136] K. Möller, J. Kobler, T. Bein, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 605–612.
- [137] C. Urata, Y. Aoyama, A. Tonegawa, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chem. Commun.* **2009**, 5094–5096.
- [138] V. Valtchev, L. Tosheva, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6734–6760.
- [139] I. Gorelikov, N. Matsuura, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 369-373.
- [140] J.-T. Song, X.-S. Zhang, M.-Y. Qin, Y.-D. Zhao, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 7752-7756.
- [141] R. I. Nooney, D. Thirunavukkarasu, Y. Chen, R. Josephs, A. E. Ostafin, *Langmuir* **2003**, *19*, 7628-7637.
- [142] A. Llopis-Lorente, P. Díez, A. Sánchez, M. D. Marcos, F. Sancenón, P. Martínez-Ruiz, R. Villalonga, R. Martínez-Máñez, *NATURE COMMUNICATIONS* **2017**, *8*, 15511-15517.
- [143] R. Villalonga, P. Díez, A. Sánchez, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, J. M. Pingarrón, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7889 – 7894.
- [144] Y.-S. Wang, D. Shao, L. Zhang, X.-L. Zhang, J. Li, J. Feng, H. Xia, Q.-S. Huo, W.-F. Dong, H.-B. Sun, *Appl. Phys. Lett.* **2015**, *106*, 173705.
- [145] L. Hong, S. Jiang, S. Granick, *Langmuir* **2006**, *22*, 9495-9499.
- [146] A. Perro, F. Meunier, V. Schmitt, S. Ravaine, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2009**, *332*, 57–62.
- [147] M. Lattuada, T. A. Hatton, *Nano Today* **2011**, *6*, 286—308.
- [148] D. Rodríguez-Fernández, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 90–95.
- [149] N. Husain, T. T. Ndou, A. M. d. l. Peña, I. M. Warner, *Applied Spectroscopy* **1992**, *46*, 652-658.
- [150] R. G. Sturgeon, S. G. Schulmann, *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 958.

- [151] H. M. Olson, C. C. Capen, *Lab. Investig* **1977**, *37*, 386.
- [152] P. Ma, R. J. Mumper, *Nano Today* **2013**, *8*, 313–331.
- [153] J. Gautier, E. Allard-Vannier, E. Munnier, M. Soucé, I. Chourpa, *Journal of Controlled Release* **2013** *169*, 48–61.
- [154] X.-q. Zhao, T.-x. Wang, W. Liu, C.-d. Wang, D. Wang, T. Shang, L.-h. Shena, L. Ren, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7240–7247.
- [155] J. You, G. Zhang, C. Li, *ACS Nano* **2010**, *4*, 1033–1041.
- [156] H. Jang, Y.-K. Kim, H. Huh, D.-H. Min, *ACS Nano* **2014**, *8* 467–475.
- [157] L. Jing, X. Liang, X. Li, L. Lin, Y. Yang, X. Yue, Z. Dai, *Theranostics* **2014**, *4*, 858-871.
- [158] M. S. Yavuz, Y. Cheng, J. Chen, C. M. Cobley, Q. Zhang, M. Rycenga, J. Xie, C. Kim, K. H. Song, A. G. Schwartz, L. V. Wang, Y. Xia, *Nat. Mater* **2009**, *8*, 935-939.
- [159] H. Chen, X. Zhang, S. Dai, Y. Ma, S. Cui, S. Achilefu, Y. Gu, *Theranostics* **2013**, *3*, 633-649.
- [160] I. Baginskiy, T.-C. Lai, L.-C. Cheng, Y.-C. Chan, K.-Y. Yang, R.-S. Liu, M. Hsiao, C.-H. Chen, S.-F. Hu, L.-J. Her, D. P. Tsai, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 2396–2410.
- [161] N. Li, Z. Yu, W. Pan, Y. Han, T. Zhang, B. Tang, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 2255–2262.
- [162] H. Li, L.-L. Tan, P. Jia, Q.-L. Li, Y.-L. Sun, J. Zhang, Y.-Q. Ning, J. Yu, Y.-W. Yang, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2804-2808.
- [163] H. Tang, S. Shen, J. Guo, B. Chang, X. Jiang, W. Yang, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 16095-16103.
- [164] Y.-T. Chang, P.-Y. Liao, H.-S. Sheu, Y.-J. Tseng, F.-Y. Cheng, C.-S. Yeh, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3309–3314.
- [165] X. Yang, X. Liu, Z. Liu, F. Pu, J. Ren, X. Qu, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2890–2895.
- [166] Y. Liu, H. Yuan, F. R. Kersey, J. K. Register, M. C. Parrott, T. Vo-Dinh, *Sensors* **2015**, *15*, 3706-3720.

- [167] G. Chirico, M. Borzenkov, P. Pallavicini, (Ed.: S. i. Materials), Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, Springer International Publishing Switzerland, **2015**.
- [168] Z. Zhang, L. Wang, J. Wang, X. Jiang, X. Li, Z. Hu, Y. Ji, X. Wu, C. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1418–1423.
- [169] W. Song, J. Gong, Y. Wang, Y. Zhang, H. Zhang, W. Zhang, H. Zhang, X. Liu, T. Zhang, W. Yin, W. Yang, *J Nanopart Res* **2016**, *18*, 1-10.
- [170] H. Yuan, A. M. Fales, T. Vo-Dinh, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11358–11361.
- [171] H. Chen, L. Shao, T. Ming, Z. Sun, C. Zhao, B. Yang, J. Wang, *Small* **2010**, *6*, 2272–2280.
- [172] P. M. Bendix, L. Jauffred, K. Norregaard, L. B. Oddershede, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **2014**, *20*.
- [173] A. Rørvig-Lund, A. Bahadori, S. Semsey, P. M. Bendix, L. B. Oddershede, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 4183–4188.
- [174] P. M. Bendix, S. N. S. Reihani, L. B. Oddershede, *ACS Nano* **2010**, *4*, 2256–2262.
- [175] A. Kyrsting, P. M. Bendix, D. G. Stamou, L. B. Oddershede, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 888–892.
- [176] H. Ma, P. Tian, J. Pello, P. M. Bendix, L. B. Oddershede, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 612–619.
- [177] J. T. Jørgensen, K. Norregaard, P. Tian, P. M. Bendix, A. Kjaer, L. B. Oddershede, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30076-30086.
- [178] A. Espinosa, A. K. A. Silva, A. Sánchez-Iglesias, M. Grzelczak, C. Péchoux, K. Desboeufs, L. M. Liz-Marzán, C. Wilhelm, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 1040–1048.
- [179] H. Yuan, A. M. Fales, C. G. Khoury, J. Liu, T. Vo-Dinh, *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 234–239.
- [180] L. Rodríguez-Lorenzo, Z. Krpetic, S. Barbosa, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, I. A. Priorc, M. Brustb, *Integr. Biol.* **2011**, *3*, 922–926.
- [181] C. G. Khoury, T. Vo-Dinh, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18849–18859.

- [182] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 118–127.
- [183] J. R. G. Navarro, D. Manchon, F. Lerouge, N. P. Blanchard, S. Marotte, Y. Leverrier, J. Marvel, F. Chaput, G. Micouin, A.-M. Gabudean, A. Mosset, E. Cottancin, P. L. Baldeck, K. Kamada, S. Parola, *Nanotechnology* **2012**, *23*, 1-7.
- [184] C. L. Nehl, H. Liao, J. H. Hafner, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 683-688.
- [185] H. Goldenberg, C. J. Tranier, *J. Appl. Phys.* **1952**, *3*, 296-298.
- [186] G. Baffou, P. Berto, E. B. Ureña, R. Quidant, S. Monneret, J. Polleux, H. Rigneault, *ACS Nano* **2013**, *7*, 6478–6488.
- [187] R. W. Powell, C. Y. Ho, P. E. Liley, *National Standard Reference Data Series- National Bureau of Standards* **1966**.
- [188] R. Montes-Robles, A. Hernández, J. Ibáñez, R. Masot-Peris, C. d. l. Torre, R. Martínez-Mañez, E. García-Breijo, R. Fraile, *Sensors and Actuators A* **2017**, *255*, 61–70.
- [189] Z. Teng, G. Zheng, Y. Dou, W. Li, C.-Y. Mou, X. Zhang, A. M. Asiri, D. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2173 –2177.
- [190] M. N. O’Brien, M. R. Jones, K. A. Brown, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7603–7606.
- [191] A. Kedia, P. S. Kumar, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 4540-4549.
- [192] H. Petrova, J. P. Juste, I. Pastoriza-Santos, G. V. Hartland, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 814–821.
- [193] J. Rodríguez-Fernández, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzán, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14257-14261.
- [194] M. N. Sanz-Ortiz, K. Sentosun, S. Bals, L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano* **2015**, *9*, 10489-10497.
- [195] N. S. Abadeer, M. R. Brennan, W. L. Wilson, C. J. Murphy, *ACS Nano* **2014**, *8*, 8392–8406.
- [196] Q. Zhan, J. Qian, X. Li, S. He, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 055704.
- [197] T. Zhang, Z. Ding, H. Lin, L. Cui, C. Yang, X. Li, H. Niu, N. An, R. Tong, F. Qu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 2277–2284.

- [198] C. Wu, Q.-H. Xu, *Langmuir* **2009**, *25*, 9441–9446.
- [199] K. Sentosun, M. N. S. Ortiz, K. J. Batenburg, L. M. Liz-Marzán, S. Bals, *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, *32*, 1063–1067.
- [200] W. Liu, Z. Zhu, K. Deng, Z. Li, Y. Zhou, H. Qiu, Y. Gao, S. Che, Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9659–9664.
- [201] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, *Pure & Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603–619.
- [202] E. Aznar, L. Mondragón, J. V. Ros-Lis, F. Sancenón, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. Pérez-Payá, P. Amorós, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11368–11371.
- [203] G. Jalani, R. Naccache, D. H. Rosenzweig, L. Haglund, F. Vetrone, M. Cerruti, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1078–1083.
- [204] B. Yan, J.-C. Boyer, N. R. Branda, Y. Zhao, *J. AM. CHEM. SOC.* **2011**, *133*, 19714–19717.
- [205] S. Ibsen, E. Zahavy, W. Wrasdilo, M. Berns, M. Chan, S. Esener, *Pharm Res* **2010**, *27*, 1848–1860.
- [206] N. Fomina, C. McFearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9540–9542.
- [207] I. Cohanoschi, F. E. Hernández, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14506–14512.
- [208] V. Voliani, F. Ricci, G. Signore, R. Nifosi, S. Luin, F. Beltram, *Small* **2011**, *7*, 3271–3275.
- [209] V. Voliani, G. Signore, O. Vittorio, P. Faraci, S. Luin, J. Perez-Prieto, F. Beltram, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4225–4230.
- [210] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333–6335.
- [211] F. B. Peters, A. Brock, J. Wang, P. G. Schultz, *Chemistry & Biology. Brief Communication* **2009**, *16*, 148–152.
- [212] B. Amit, U. Zehavi, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 192–196.
- [213] X. Bai, Z. Li, S. Jockusch, N. J. Turro, J. Ju, *PNAS* **2003**, *100*, 409–413.
- [214] P. K. Jain, D. Karunakaran, S. H. Friedman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1404–1409.

- [215] M. W. Pandori, D. A. Hobson, J. Olejnik, E. Krzymanska-Olejnik, K. J. Rothschild, A. A. Palmer, T. J. Phillips, T. Sano, *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 567–573.
- [216] J. Olejnik, S. Sonar, E. Krzymanska-Olejnik, K. J. Rothschild, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7590-7594.
- [217] S. Laimgruber, W. J. Schreier, T. Schrader, F. Koller, W. Zinth, P. Gilch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7901–7904.
- [218] P. Klán, T. s. Šolomek, C. G. Bochet, A. I. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [219] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865 – 6879.
- [220] J. Zhao, T. D. Gover, S. Muralidharan, D. A. Auston, D. Weinreich, J. P. Y. Kao, *Biochemistry* **2006**, *45*, 4915-4926.
- [221] F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, J. Wang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3679–3692.
- [222] M. Grinda, T. Legigan, J. Clarhaut, E. Peraudeau, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, M. Thomas, F. Guilhot, S. Papot, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7129-7133.
- [223] W. Wu, Y. Dong, J. Gao, M. Gong, X. Zhang, W. Kong, Y. Li, Y. Zeng, D. Si, Z. Wei, X. Ci, L. Jiang, W. Li, Q. Li, X. Yi, C. Liu, *Cancer Sci* **2015**, *106*, 747–756.
- [224] T. Cui, J.-J. Liang, H. Chen, D.-D. Geng, L. Jiao, J.-Y. Yang, H. Qian, C. Zhang, Y. Ding, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 8569–8580.
- [225] I. Khan, P. F. Agris, M. V. Yigit, M. Royzen, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6174-6177.
- [226] L. Kovar, T. Etrych, M. Kabesova, V. Subr, D. Vetvicka, O. Hovorka, J. Strohalm, J. Sklenar, P. Chytil, K. Ulbrich, B. Rihova, *Tumor Biol* **2010**, *31*, 233–242.
- [227] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370-2380.
- [228] N. Z. Knezevic, V. S.-Y. Lin, *Nanoscale* **2013**, *5*, 1544–1551.

- [229] X. Wan, T. Liu, J. Hu, S. Liu, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 341–347.
- [230] U. Mahmood, R. Weissleder, *Molecular Cancer Therapeutics* **2003**, *2*, 489–496.
- [231] R. Weissleder, *Nature biotechnology* **2001**, *19*, 316–317.
- [232] M. R. Hamblin, T. N. Demidova, *Proc. SPIE* **2006**, *6140*, 614001–614013.
- [233] Q. Lin, Q. Huang, C. Li, C. Bao, Z. Liu, F. Li, L. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10645–10647.
- [234] V. Voliani, F. Ricci, S. Luin, F. Beltram, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 14487–14493.
- [235] C. Park, K. Lee, C. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275–1278.
- [236] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462–3463.
- [237] J. Lai, X. Mu, Y. Xu, X. Wu, C. Wu, C. Li, J. Chen, Y. Zhao, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7370–7372.
- [238] A. Sánchez, P. Díez, P. Martínez-Ruíz, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, *Electrochemistry Communications* **2013**, *30*, 51–54.
- [239] M. Xue, X. Zhong, Z. Shaposhnik, Y. Qu, F. Tamanoi, X. Duan, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8798–8801.
- [240] A. Llopis-Lorente, P. Díez, C. d. l. Torre, A. Sánchez, F. Sancenón, E. Aznar, M. D. Marcos, P. Martínez-Ruíz, R. Martínez-Mañez, R. Villalonga, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4276–4281.
- [241] H. Meng, M. Xue, T. Xia, Y.-L. Zhao, F. Tamanoi, J. F. Stoddart, J. I. Zink, A. E. Nel, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12690–12697.
- [242] A. Boujakhrou, E. Sánchez, P. Díez, A. Sánchez, P. Martínez-Ruiz, C. Parrado, J. M. Pingarrón, R. Villalonga, *ChemElectroChem* **2015**, *2*, 1735–1741.
- [243] A. Llopis-Lorente, B. d. Luis, A. García-Fernández, P. Díez, A. Sánchez, M. D. Marcos, R. Villalonga, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6734–6739.

## Referencias Bibliográficas

---

- [244] Y. Cui, H. Dong, X. Cai, D. Wang, Y. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 3177–3183.
- [245] J. Zhang, M. Niemelä, J. Westermarck, J. M. Rosenholm, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 4115–4126.
- [246] J. Gu, S. Su, M. Zhu, Y. Li, W. Zhao, Y. Duan, J. Shi, *Microporous and Mesoporous Materials* **2012**, *161*, 160-167.
- [247] B. V. Enustun, J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3317-3328.
- [248] N. G. Bastús, J. Comenge, V. Puentes, *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- [249] C. Graf, D. L. J. Vossen, A. Imhof, A. v. Blaaderen, *Langmuir* **2003**, *19*, 6693-6700.
- [250] L. Scarabelli, M. Grzelczak, L. M. Liz-Marzán, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 4232–4238.
- [251] T. Hendel, M. Wuithschick, F. Kettemann, A. Birnbaum, K. Rademann, J. r. Polte, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11115-11124.