



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de  
Fibroína de Seda para el Transporte de Fármacos

**D. Guzmán Augusto Carissimi Nacaratto**  
**2021**



# Universidad de Murcia

Facultad de Química

Departamento de Ingeniería Química

*Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Fibroína  
de Seda para el Transporte de Fármacos*

---

*Synthesis and Characterization of Silk Fibroin  
Nanoparticles for Drug Delivery*

Memoria que presenta

**Guzmán Augusto Carissimi Nacaratto**

Ingeniería Química, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia

2021



La presente tesis ha estado subvencionada por la Comisión Europea (FEDER/ERDF) y el Ministerio de Economía y Competitividad español (Ref. CTQ2017-87708-R), el programa de apoyo a la investigación de la Fundación Séneca de Ciencia y Tecnología de Murcia, España (Ref. 20977 / PI / 18) y el apoyo de la Universidad de Murcia a través de la beca de líneas de actuación Mare Nostrum para 2018-2019 (R-421-2019)

De esta forma, queremos mostrar nuestro agradecimiento a dichas instituciones



## Agradecimientos

No quisiera dejar pasar la oportunidad de plasmar en este documento agradecimientos especiales a personas aún más especiales, que de uno u otro modo han contribuido a mi formación profesional y personal.

En primer lugar, debo agradecer a mis padres Helena Nacaratto y Carlos Carissimi a quienes parece he dedicado mi vida a preocuparlos con mis locuras, pero que incondicionalmente siempre me han apoyado en todas y cada una de mis aventuras. A ellos les debo el gran ejemplo del trabajo duro, esfuerzo y perseverancia.

A mi directora y tutora, la Profesora Gloria Villora, debo agradecerles los conocimientos transmitidos y el tiempo dedicado, estaré eternamente en deuda. También pedirte perdón por todos los dolores de cabezas que mi testarudez hayan generado y volverte a agradecer por no rendirte. Quiero dejar registro de que sin la confianza que me depositaste, no hubiese sido capaz de realizar ni siquiera una pequeña fracción de este trabajo. Es tu interminable carisma el que me ha impulsado a felizmente trabajar horas extra, espero que eso nunca cambie.

A la Doctora Mercedes García Montalban, por aceptar ser mi cotutora y su inmensurable dedicación. Has sido un ejemplo de Directora, Investigadora y Persona que recordare siempre.

Al Profesor Guillermo Díaz-Baños, por iniciar este largo viaje conmigo y enseñarme su forma de ver la ciencia. My most sincere gratitude to Professor Andreas Barth, from Stockholm University (Sweden) for his warm welcome, and enlightening discussions during my 3-month stay and the following year. A Antonio Abel Lozano-Pérez del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario (España), por su interminable apoyo científico y humano. A todo el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, donde la excelencia humanitaria excede la académica y a quienes debo un trato excepcional, nunca los olvidare. A Eduardo Méndez, Fernanda Cerda, Santiago Botasini y Laura Luzuriaga del Laboratorio de Biomateriales, Universidad de la República (Uruguay), donde tengo mis raíces. Ellos me enseñaron a crear cosas tan pequeñas y mantener valores tan grandes.

A Eduardo Laborda, quien es el responsable de que hoy me encuentre aquí. Fue mi nexo para ingresar a esta Universidad y desde antes de llegar a España estuvo siempre a la orden para darme una mano. A María del Mar Collado-González, quien desde el primer día estuvo presente y dispuesta para ayudarme y asesorarme sobre lo que sea. Al los Profesores José Ginés (Universidad de Murcia) y Enrique Millan (Universidad de los Andes) por su amistad. A José María Gómez Gil, José Manuel Olmos y Marta García Fuster, mis colegas y amigos. Al club

de rugby Las Torres de Cotilla, donde encontré amigos que nunca olvidare. A todo el Club Universitario Rugby de Murcia, en especial a la familia Jiménez-Fontes en su totalidad. Al Carrasco Polo Club, mi segunda familia en mi tierra, con quienes he compartido momentos tanto amargos como felices.

A Ari, a quien no pensaba encontrar y sin embargo no encuentro palabras para describir lo importante que eres para mí y lo importante que fuiste durante el desarrollo de este trabajo y por eso te quiero dar las gracias. Espero que esto sea solo el comienzo de algo mucho más grande.

Finalmente, a toda mi familia y amigos, que en la inmediatez o la distancia siempre estuvieron, están y sé que estarán presentes.

A todos,

Gracias, Gracias, ¡Gracias!

*A mi familia*

*A mis amigos*

*A mis mentores*



Los resultados de la labor de investigación desarrollada durante la presente Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de varios artículos en revistas científicas, un capítulo de libro y diversas comunicaciones (oral o póster) a congresos especializados de ámbito nacional e internacional.

#### **Artículos publicados en revistas científicas, arbitradas de carácter internacional:**

1. **Carissimi, G.**; Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; Villora, G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019, 11, 2045.
2. **Carissimi, G.**; Baronio, C.M.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. On the Secondary Structure of Silk Fibroin Nanoparticles Obtained Using Ionic Liquids: An Infrared Spectroscopy Study. *Polymers (Basel)*. 2020, 12, 1294.
3. **Carissimi, G.**; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. Direct Quantification of Drug Loading Content in Polymeric Nanoparticles by Infrared Spectroscopy. *Pharmaceutics* 2020, 12, 912.

#### **Capítulos de libro:**

1. Montalbán, M.G.; **Carissimi, G.**; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.; Coburn, J.M.; Kaplan, D.L.; Villora, G. Biopolymeric Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids. In *Recent Advances in Ionic Liquids*; IntechOpen, 2018; pp. 3–26.

#### **Comunicaciones a Congresos de ámbito nacional e internacional:**

1. **Carissimi G.**, Montalbán M.G., Squires W., Díaz-Baños F.G., Martín-Gullón I., Villora G., Naringenin-loaded silk fibroin nanoparticles as a platform for controlled drug release synthesis and characterization, 6th international Congress on Green Process Engineering, Toulouse, Francia, 2018, Oral
2. Montalbán M.G., **Carissimi G.**, Díaz-Baños F.G., Villora G., Silk fibroin-based nanoparticles as nanocarriers for the controlled release of silibinin, 6th international Congress on Green Process Engineering, Toulouse, Francia, 2018, Poster

3. **Carissimi G.**, Montalbán M.G., Díaz-Baños F.G., Vllora G., Silibinin-silk fibroin nanoparticles produced by supercritical antisolvent method, 6th International Congress on Green Process Engineering, Toulouse, Francia, 2018, Poster
4. **Carissimi G.**, Montalbán M.G., Díaz Baños F.G., Vllora G., Síntesis de nanopartículas de silibinina-fibroína de seda mediante tecnología supercrítica para aplicaciones biomédicas, Jornadas Doctorales – Universidad de Murcia, Murcia, España, 2018, Oral
5. **Carissimi G.**, Lozano-Pérez A.A., Montalbán M.G., Aznar-Cervantes S.D., Cenis J.L., Vllora G., Process optimization of drug loaded silk fibroin nanoparticles synthesis using ionic liquids, 13<sup>th</sup> International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Tenerife, España, 2019, Oral
6. **Carissimi G.**, Lozano-Pérez A.A., Montalbán M.G., Aznar-Cervantes S.D., Cenis J.L., Vllora G., Effects of Silk Degumming in Fibroin Nanoparticle Synthesis, 13<sup>th</sup> International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Tenerife, España, 2019, Poster
7. **Carissimi G.**, Montalbán M.G., Lozano-Pérez A.A., Aznar-Cervantes S.D., Cenis J.L., Vllora G., Silk nanoparticles for drug delivery obtained by ionic liquids, State of the Art of Silk Biomaterials for Bioengineering, Madrid, España, 2019, Oral
8. **Carissimi G.**, Montalbán M.G., Lozano-Pérez A.A., Cenis J.L., Vllora G., Silk fibroin nanoparticles as a platform for controlled drug release, ANQUE 3<sup>rd</sup> International congress of chemical Engineering, Santander, España, 2019, Oral
9. **Carissimi G.**, Collado-González M. García Beltrán J.M., Montalbán M.G., Esteban A., Díaz-Baños F.G., Vllora G., Chitosan Enhance Silk Fibroin Nanoparticles Uptake in gilthead seabream (*Sparus aurata*) head-kidney leucocytes, ANQUE 3rd International Congress of Chemical Engineering, Santander, España, 2019, Poster

10. **Carissimi G.**, Fuster M.G., Montalbán M.G., Chaala M., Vllora G., Barth A., Infrared study of the secondary structure of silk fibroin during nanoparticles production, I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, Murcia, España, 2020, Oral
  
11. **Carissimi G.**, Fuster M.G., Montalbán M.G., Vllora G., Barth A., Direct Quantification of Drug Loading Content in Polymeric Nanoparticles by Infrared Spectroscopy, I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, Murcia, España, 2020, Poster



# Índice

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>5</b>
<b>Estructura del Trabajo.....</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo 1 - Antecedentes.....</b>	<b>9</b>
1.1.  Introducción a la nanotecnología y la nanomedicina.....	9
1.2.  Tipos de nanopartículas .....	11
1.2.1  Nanopartículas metálicas .....	11
1.2.2  Liposomas.....	12
1.2.3  Nanocristales .....	13
1.2.4  Nanopartículas poliméricas .....	13
1.3.  Ventajas de las nanopartículas para la distribución de fármacos.....	14
1.3.1  Penetración celular y retención aumentada (EPR) .....	15
1.3.2  Transporte de fármacos insolubles .....	18
1.3.3  Libración controlada.....	20
1.4.  Diseño de las nanopartículas.....	21
1.5.  Vías de administración de nanopartículas.....	23
1.5.1  Parenteral.....	24
1.5.2  Oral .....	24
1.5.3  Pulmonar.....	25
1.5.4  Transdérmico .....	25
1.6.  Eliminación de nanopartículas .....	26
1.6.1  Eliminación renal.....	26
1.6.2  Eliminación hepática y el sistema retículo endotelial .....	27
1.7.  La seda como biomaterial .....	29
1.8.  Estructura de la seda .....	30
1.9.  Biocompatibilidad.....	34
1.9.1  Respuesta inmunitaria e inflamatoria .....	35
1.9.2  Degradación de la fibroína de seda in vivo .....	37
1.10.  Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda.....	39
1.10.1  Solubilización de la fibroína de seda.....	39

## Índice

1.10.2	Regeneración de la fibroína en nanopartículas.....	41
1.10.3	Antisolvatación en disolventes orgánicos.....	41
1.10.4	Antisolvatación en Fluidos Supercríticos.....	43
1.10.5	Electropulverización.....	44
1.10.6	Microfluidos.....	44
1.10.7	Salting-out.....	45
1.11.	Mecanismo de formación de nanopartículas en procesos de antisolvatación....	45
1.12.	Carga de fármacos en nanopartículas.....	47
<b>Capítulo 2 - Síntesis de nanopartículas biopoliméricas en líquidos iónicos .....</b>		<b>65</b>
2.1.	Introducción.....	67
2.1.1	Nanopartículas biopoliméricas para aplicaciones biomédicas.....	67
2.1.2	Líquidos iónicos como disolventes para la síntesis de nanopartículas.....	68
2.1.3	Métodos de síntesis.....	70
2.2.	Síntesis de nanopartículas de biopolímero utilizando ILs.....	71
2.2.1	Celulosa.....	71
2.2.2	Xilano.....	75
2.2.3	Almidón.....	76
2.2.4	Quitosano.....	77
2.2.5	Fibroína de seda.....	78
2.2.6	Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con curcumina utilizando IL.....	85
2.3.	Conclusiones.....	89
<b>Capítulo 3 - Influencia del proceso de desgomado en las propiedades de las nanopartículas de fibroína de seda.....</b>		<b>97</b>
3.1.	Introducción.....	99
3.2.	Materiales y Métodos.....	101
3.2.1	Materiales.....	101
3.2.2	Métodos de desgomado.....	102
3.2.3	Preparación de nanopartículas de fibroína de seda.....	103
3.2.4	Electroforesis en gel.....	103
3.2.5	Caracterización de fibras y nanopartículas de fibroína.....	104
3.2.6	Análisis Estadístico.....	106

3.3.	Resultados y discusión.....	106
3.3.1	Resultados del Desgomado.....	106
3.3.2	Análisis del índice de cristalinidad de la fibroína de seda.....	108
3.3.3	Electroforesis en gel .....	109
3.3.4	Propiedades Térmicas.....	111
3.3.5	Tamaño y morfología de las nanopartículas de fibroína de seda .....	112
3.4.	Conclusiones.....	115
3.5.	Información suplementaria Capítulo 3.....	123
<b>Capítulo 4 - Estructura secundaria de nanopartículas de fibroína de seda obtenidas con líquidos iónicos: un estudio de espectroscopia infrarroja .....</b>		<b>125</b>
4.1.	Introducción .....	127
4.2.	Materiales y métodos .....	130
4.2.1	Materiales .....	130
4.2.2	Disolución de fibroína de seda .....	131
4.2.3	Preparación de nanopartículas de fibroína de seda.....	131
4.2.4	Espectroscopia infrarroja.....	132
4.2.5	Análisis espectral y ajuste de curvas .....	133
4.2.6	Cálculos computacionales de la banda Amida I.....	133
4.3.	Resultados y discusión.....	135
4.3.1	Fibras de fibroína de Seda .....	135
4.3.2	Disolución de fibroína de seda en líquido iónico y líquido iónico acuoso.....	141
4.3.3	Nanopartículas de fibroína de seda.....	142
4.4.	Conclusiones.....	145
4.5.	Información suplementaria Capítulo 4.....	155
<b>Capítulo 5 - Cuantificación directa del contenido de fármaco en nanopartículas poliméricas mediante espectroscopía infrarroja.....</b>		<b>157</b>
5.1.	Introducción .....	159
5.2.	Materiales y Métodos.....	161
5.2.1	Materiales .....	161
5.2.2	Preparación de solución stock de nanopartículas y fármaco .....	162
5.2.3	Muestras de calibración para NAR en SFN.....	162

## Índice

5.2.4	Muestras de SFN cargadas con NAR .....	162
5.2.5	Adquisición de espectros y pretratamiento de datos .....	164
5.3.	Resultados y Discusión .....	165
5.3.1	Especificidad de la espectroscopia ATR-FTIR para identificar fármacos en SFN .....	165
5.3.2	Identificación de la mejor banda marcadora de NAR en muestras de SFN <sub>NAR</sub> .....	166
5.3.3	Curva de calibrado .....	169
5.3.4	Parámetros para la validación del método .....	171
5.3.5	Cuantificación de fármaco en SFN cargadas con NAR .....	175
5.4.	Conclusiones .....	177
<b>Capítulo 6 - Conclusiones generales y perspectivas futuras .....</b>		<b>187</b>
6.1.	Conclusiones Generales .....	187
6.2.	Perspectivas futuras .....	190
<b>Resumen en inglés de la Tesis Doctoral .....</b>		<b>195</b>

Tabla I. Abreviaturas

[bmim <sup>+</sup> ][C <sub>8</sub> OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	Octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio
[dmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de dimetilimidazolio
[eim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de etilimidazolio
[emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazolio
[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio
[emim <sup>+</sup> ][EtSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio
[emim <sup>+</sup> ][TfO <sup>-</sup> ]	Trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio
[hmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-hexil-3- metilimidazolio
[mim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de metilimidazolio
[omim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio
[pmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-propil-3- metilimidazolio
A549	Línea celular de adenocarcinoma epiteliales basales alveolares humanas
ATR-FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica <i>Biopharmaceutical Classification System</i>
C <sub>3</sub>	Proteína del complemento
CD	Dicroísmo circular
CI	Índice de cristalinidad
C-RCN	Nanopartículas de algodón
Curc-SFN	SFN cargadas con curcumina
DLC	Contenido de carga de fármaco
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EA.hy926	Línea celular endoteliales de cordón umbilical humana

EE	Eficiencia de encapsulación
EPR	Penetración celular y retención aumentada del inglés <i>Enhanced Penetration and Retention</i>
ETAN	Nitrato de etilamonio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe-SEM	Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo
FWHH	Ancho completo a la mitad de la altura
H	Cadena pesada de la fibroína
HeLa	Línea células cancerígenas de cuello de útero
HFIP	Hexafluoroisopropanol
IgM, IgG e IgA	Inmunoglobulinas M, G y A, respectivamente
IL	Líquido iónico
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
L	Cadena liviana de la fibroína
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de Cuantificación
LS174T	Línea celular de adenocarcinoma de colon humano caucásico
MCC	Celulosa microcristalina
M-RCN	Celulosa microcristalina
Mw	Peso molecular
NAR	Naringenina
P25	Glicoproteína P25
PALS	Análisis de fase por dispersión de luz
PdI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico

PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
RES	Sistema reticuloendotelial
RGD	Péptido lineal arginina-glicina-ácido aspártico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSD	Desviación estándar relativa
SC	Capullo de seda
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SF	Fibroína de seda
SF/IL	Fibroína de seda disuelta en líquido iónico
SF-[emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ]	SF disuelta en [emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ]
SF-[emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ]/D <sub>2</sub> O	SF disuelta en una mezcla de [emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ] y dióxido de deuterio
SF-[emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ]/H <sub>2</sub> O	SF disuelta en una mezcla de [emim <sup>+</sup> ][AcO <sup>-</sup> ] y agua
SFN	Nanopartículas de fibroína de seda
SFN <sub>NAR</sub>	SFN cargadas con NAR
SS	Sericina de seda
SU	Universidad de Estocolmo
TDA-DTA	Análisis termogravimétrico - análisis térmico diferencial
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF	Factor de necrosis tumoral
U87MG	Línea celular de glioblastoma primario humano
UMU	Universidad de Murcia
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VEGF	Factores de crecimiento endotelial vascular
<i>Z-average</i>	Diámetro hidrodinámico medio ponderado por intensidad

Tabla II. Símbolos

---

$\sigma$	Desviación estándar
$\rho$	Densidad de carga superficial
$T_{dm}$	Temperatura de descomposición media
$DLC_{LOQ}$	Límites de cuantificación para la DLC
$DLC_{LOD}$	Límites de detección para la DLC
$Da$	Número de Damköhler
$A_{LOQ}$	Valor medido de absorbancia más pequeño que puede cuantificarse
$A_{LOD}$	Valor medido de absorbancia más pequeño que puede detectarse
$A$	Absorbancia
$\tau_{prec.}$	Tiempo total de precipitación
$\tau_{mix}$	Tiempo de mezcla
$\bar{A}$	Promedio de absorbancia

# Introducción

La academia y la industria han conseguido avances extraordinarios en una gran variedad de áreas debido al desarrollo de la nanotecnología y el control de estructuras a niveles nanoscópicos. Particularmente, en el campo de la medicina, la nanotecnología tiene el potencial de generar un impacto significativo en la salud humana pudiendo mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades. En este campo, la nanotecnología busca encapsular fármacos y/o compuestos trazadores en nanopartículas con el fin de aumentar la eficacia de los mismos al permitir un suministro directo en tejidos diana; al mismo tiempo que reducen su toxicidad evitando la acumulación y los consiguientes efectos secundarios en tejidos sanos. La encapsulación de fármacos también permite su liberación controlada pudiendo así evitar máximos de concentraciones elevadamente dañinas o subterapéuticas. Sumado a esto, las nanopartículas han demostrado ser de gran valor en el transporte de fármacos con baja solubilidad en agua; el cual resulta ser el principal problema a la hora de introducir nuevos medicamentos al mercado debido a que este hecho limita su biodisponibilidad en el organismo.

La Comisión Europea, define los nanomateriales como aquellos de origen natural, accidental o manufacturados que contengan partículas en un estado abundante, como agregados o aglomerados en los cuales, al menos el 50% de las partículas, según su distribución de tamaño por número tengan una o más dimensiones externas comprendidas entre 1 y 100 nm [1], aunque, no existe una definición universalmente aceptada. Debido a que se requiere una definición operativa a efecto de este estudio, se definirá el término de nanomedicina en base a la propuesta de Etheridge y colaboradores [2] que definen la nanomedicina como “el uso en medicina de materiales a nanoescala o nanoestructurados, diseñados para tener efectos médicos únicos basados en sus estructuras, en los que al menos una de sus dimensiones sea menor de 300 nm”. Los materiales en esta escala de tamaño suelen presentar propiedades distintas a sus homólogos macroscópicos, tanto en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas como a sus interacciones fisiológicas.

Dependiendo de la aplicación final del sistema, es posible emplear una gran variedad de materiales para la preparación de nanopartículas. Las nanopartículas inorgánicas basadas en metales suelen presentar una estabilidad elevada y un tamaño reducido lo que les atribuye una elevada penetrabilidad celular. No obstante, su uso prolongado suele ser tóxico si el organismo no es capaz de eliminarlas correctamente. Los polímeros sintéticos biodegradables como el

## Introducción

alcohol polivinílico o el ácido poliláctico suelen ser alternativas atractivas, dado que pueden ser descompuestos en el organismo y su elevada pureza hace que la preparación de nanopartículas sea altamente reproducible. A pesar de esto, muchos de los productos de degradación de estos polímeros suelen ser tóxicos y su síntesis está asociada al uso de una gran cantidad de disolventes y productos químicos agresivos. Además, estos polímeros suelen tener un elevado coste. En contraste, los polímeros naturales suelen ser biocompatibles, biodegradables, económicos y su procesado suele requerir condiciones de operación suaves y reactivos seguros de manipular.

La fibroína de seda (SF) del gusano de seda de la especie *Bombyx mori* es un polímero natural, proteico, que presenta una interesante combinación de propiedades mecánicas, tales como flexibilidad y resistencia que aún son difíciles de conseguir con polímeros sintéticos. Además, la SF es biodegradable y biocompatible, lo que la convierte en un excelente material para la producción de nanopartículas para la administración de fármacos. Las nanopartículas de SF (SFN) son capaces de cargar una amplia variedad de compuestos terapéuticos y diversas macromoléculas, penetrar membranas biológicas y ser modificadas químicamente para ampliar su funcionalidad.

Si bien la notable resistencia mecánica de la SF es una de las propiedades atractivas del biomaterial, el proceso de síntesis de nanopartículas se encuentra obstaculizado por su elevada estabilidad, proveniente del alto número de enlaces de hidrógeno en su estructura secundaria, mayoritariamente, en forma de lámina  $\beta$  antiparalela. Un método reciente, desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente tesis doctoral, basado en la utilización de líquidos iónicos para disolver la SF nativa, ha permitido la producción de nanopartículas en un proceso fácil y escalable a la industria. Los líquidos iónicos son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperaturas inferiores a 100 °C y que están formados habitualmente por un catión orgánico (frecuentemente sales de dialquilimidazolio y tetraalquilamonio) y un anión inorgánico u orgánico (por ejemplo,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ ). Los líquidos iónicos han surgido como disolventes prometedores para su uso en una amplia variedad de procesos químicos y bioquímicos por sus propiedades extraordinarias, que incluyen una presión de vapor prácticamente nula, elevada estabilidad térmica y química, menor toxicidad que muchos disolventes orgánicos convencionales y la posibilidad de modular sus propiedades fisicoquímicas en base a la apropiada elección del catión y el anión que lo constituyen. Además, los líquidos iónicos pueden ser separados de otros disolventes mediante destilación simple debido a su alto punto de ebullición, lo que los hace fácilmente reciclables.

El proceso de síntesis de SFN consta de varias etapas. En primer lugar, se lleva a cabo la purificación de la SF, mediante la eliminación de la sericina (método conocido como desgomado). En segundo lugar, la SF debe ser disuelta en sus unidades monoméricas y, por último, ésta es regenerada en forma de nanopartículas. Cada uno de estos procesos puede tener efectos significativos en la estructura secundaria de la proteína y dadas las implicaciones que ésta tiene en la resistencia, degradabilidad y biocompatibilidad del producto final, su estudio resulta indispensable.

Por otro lado, para la correcta administración de dosis terapéuticas, los fármacos cargados en las nanopartículas deben ser cuantificados con precisión. Hasta la fecha, se han utilizado principalmente dos enfoques para esta tarea basados en una medición directa o indirecta del contenido de carga de fármaco en la nanopartícula. Sin embargo, ambos adolecen de las ineficiencias de la extracción del fármaco y del proceso de separación sólido-líquido, así como de errores de dilución.

Dadas las consideraciones anteriores, esta **Tesis doctoral** se centra en el estudio de las SFN como nanotransportadores de fármacos, su proceso de síntesis utilizando líquidos iónicos, la caracterización de la estructura secundaria de la proteína durante todo el proceso de síntesis y la cuantificación de la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas.

### Referencias

1. European Union Law 32011H0696. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32011H0696> (accessed on Aug 30, 2020).
2. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9*, 1–14.



# Objetivos

La presente **Tesis Doctoral** presenta cuatro objetivos globales: El estudio del (i) proceso de síntesis de SFN utilizando líquidos iónicos, (ii) la influencia del proceso de purificación de la SF de seda en el proceso de síntesis, (iii) la caracterización de la estructura secundaria de la proteína durante todo el proceso de síntesis y (iv) la cuantificación de la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas. Estos objetivos globales se han desglosado en objetivos específicos tal y como se indica a continuación:

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre la síntesis de nanopartículas biopoliméricas utilizando líquidos iónicos.
  - a. Estudiar la capacidad de los líquidos iónicos para disolver biopolímeros que sean interesantes para la síntesis de nanopartículas en la administración de fármacos. Entre ellos: celulosa, xilano, almidón, quitosano, queratina y SF.
  - b. Evaluar el proceso de síntesis de SFN mediante su disolución en el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolío acelerada por ultrasonidos de alta potencia.
  - c. Examinar los procesos de carga de la curcumina en SFN mediante coprecipitación y adsorción.
  
2. Estudiar la influencia del proceso de desgomado de la seda sobre las características estructurales de las nanopartículas.
  - a. Purificar SF de seda mediante cuatro de los métodos de desgomado más representativos dentro de la bibliografía: autoclave, ebullición alcalina corta e intensiva (30 y 120 min, respectivamente) y ultrasonidos de alta potencia.
  - b. Evaluar la eficiencia de la eliminación de la sericina de los métodos utilizados.
  - c. Evaluar la degradación de la SF después de los tratamientos de desgomado mediante electroforesis en gel.
  - d. Estudiar la morfología, tamaño medio, distribución de tamaño, potencial-Z y densidad de carga superficial de las partículas resultantes de las SFs tratadas con los diferentes métodos de desgomado y correlacionar estos parámetros con la integridad de la SF y la cantidad de sericina en las fibras.

3. Desarrollar un método basado en espectroscopía infrarroja que permita analizar la estructura secundaria de la SF en todas las etapas de síntesis de nanopartículas.
  - a. Estudiar la estructura secundaria de la SF en sus estados de fibra nativa, disuelta en líquido iónico y regenerada en forma de nanopartícula.
  - b. Comparar los resultados experimentales con modelos computacionales para la asignación de bandas a estructuras de láminas  $\beta$  apiladas.
  - c. Comparar la estructura secundaria de la fibra de SF nativa con las SFN regenerada.
  
4. Desarrollar un método para la cuantificación directa de fármacos cargados en nanopartículas poliméricas.
  - a. Identificar una señal en el espectro infrarrojo de absorbancia característica del fármaco cargado y construir una curva de calibración.
  - b. Validar el método de cuantificación según las indicaciones de la IUPAC. Definir los parámetros de límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, rango lineal y precisión.
  - c. Construir una curva de calibración utilizando la segunda derivada del espectro de absorbancia como alternativa para resolver picos superpuestos para poder ampliar la aplicabilidad del método a otros sistemas.

## Estructura del Trabajo

De acuerdo con estos objetivos específicos, el trabajo se ha articulado en los siguientes capítulos:

En el **Capítulo 1** se presentan antecedentes junto con una revisión bibliográfica del estado del arte de los tipos de nanopartículas que se han propuesto para el transporte de fármacos. Se comenzará por un breve repaso histórico de la nanotecnología incluyendo el mecanismo de penetración aumentada y de retención propuesto por Matsumura y Maeda en 1986, considerado como el comienzo de la nanomedicina. A continuación, se tratarán conceptos clave como las ventajas aportadas por los nanotransportadores, así como principios de diseño y se analizarán distintas vías de administración y eliminación de estos. Posteriormente, se revisarán las características de la SF y sus aplicaciones como biomaterial, su estructura, biocompatibilidad y degradabilidad. Por último, se considerarán los métodos de síntesis de SFN y los métodos de carga de fármacos.

En el **Capítulo 2** se abordará la síntesis de nanopartículas utilizando líquidos iónicos y diferentes biopolímeros dedicando especial atención a las producidas a partir de SF. Se expondrán los estudios recientes del grupo que describen cómo los ultrasonidos de alta potencia son capaces de acelerar el proceso de disolución de proteínas de seda en líquidos iónicos y cómo las SFN pueden obtenerse directamente a partir de la solución de SF/líquido iónico mediante una rápida desolvatación en disolventes orgánicos polares. Como ejemplo, se presenta la posible aplicación biomédica de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con curcumina para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

En el **Capítulo 3** se llevará a cabo el estudio de la influencia que tiene el método de purificación de la SF - conocido como desgomado - en el proceso de producción de nanopartículas. Se utilizaron cuatro métodos basados en (i) el uso de autoclave, (ii) ebullición alcalina corta ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), (iii) ebullición alcalina larga ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y (iv) ultrasonidos. Las fibras resultantes fueron disueltas en el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y se usaron para la síntesis de nanopartículas por desolvatación rápida en metanol. La eficiencia relativa de los procesos de desgomado y la integridad de las fibras de fibroína resultantes fueron analizadas por pérdida de masa, microscopía óptica, análisis termogravimétrico, espectroscopía

## Estructura del Trabajo

infrarroja y electroforesis (SDS-PAGE). Los tamaños de partícula y la morfología se analizaron por dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

En el **Capítulo 4** se estudia la estructura secundaria de las SFN resultantes, ya que su conocimiento permitirá garantizar el mantenimiento de las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de las mismas. En este apartado, se presentará un nuevo método basado en espectroscopía de infrarrojos para estudiar la estructura secundaria de la SF en diferentes etapas del proceso de producción: en su estado de fibra nativa, disuelta en líquido iónico y después de la regeneración en forma de nanopartículas. El análisis experimental está basado en el ajuste simultáneo de la banda de absorción de amida I y su derivada segunda. A diferencia del ajuste habitual realizado exclusivamente al espectro de absorción, este nuevo enfoque explota toda la información espectral contenida en el espectro y proporciona resultados más robustos.

En el **Capítulo 5** se presenta el desarrollo de un método simple y robusto para la cuantificación directa de fármacos en nanopartículas poliméricas basado en la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR). Además, el método propuesto puede ser fácilmente adaptado a una amplia variedad de sistemas de administración de fármacos. Actualmente, para la cuantificación de fármacos cargados en nanopartículas se utilizan dos técnicas basadas en la medida directa o indirecta de los mismos. Sin embargo, como se discutirá en el capítulo, dicha cuantificación no se encuentra libre de controversia debido a la ineficiencia de la extracción del medicamento y al proceso de separación sólido-líquido, así como a errores de dilución.

Por último, en el **Capítulo 6** se recogen las conclusiones globales extraídas de los capítulos anteriores y se realiza una propuesta de las perspectivas futuras en la línea de investigación de esta Tesis Doctoral.

Cabe destacar, finalmente, que cada uno de los capítulos presenta al final la bibliografía correspondiente a cada uno de los temas objeto de estudio.

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1. Introducción a la nanotecnología y la nanomedicina

La nanomedicina es una disciplina relativamente nueva que surge de la intersección entre la nanotecnología y la medicina basada en el control de la materia a escala nanométrica para aplicaciones en el ámbito de la salud humana. El uso de materiales en este rango ha supuesto un gran avance al modificar propiedades fundamentales como la solubilidad, la difusividad, la vida media de la circulación sanguínea, perfiles de liberación y distribución de fármacos [1–4]. Aunque la producción y el uso de materia de tamaño nanométrico data desde hace cientos de años [5,6], la nanomedicina como ciencia interdisciplinar moderna se estableció por primera vez a finales del siglo pasado. Muchos autores consideran el inicio de la nanotecnología en la famosa conferencia del físico y premio Nobel Richard P. Feynman en 1959 para la *American Physical Society* titulada: “*There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*” [7]. En ella, Feynman presentó una visión futurista de la tecnología que conduce hacia la escala atómica y hacia los límites finales establecidos por las leyes físicas. Se expusieron ideas revolucionarias, tales como reducir los circuitos integrados de un ordenador hasta diámetros comprendidos entre 10 y 100 átomos. Para comprender el alcance de sus predicciones, basta recordar que, en el momento de presentar estas ideas, un ordenador ocupaba una sala entera si no varias. Sin embargo, la palabra (o el prefijo) nano no fue mencionado ni una sola vez en su presentación, Feynman se ciñó a describir la miniaturización de máquinas y sus posibles aplicaciones. El honor de haber acuñado el término “nano” es otorgado a Norio Taniguchi, por su presentación “On the basic concept of nanotechnology” en 1974 [8].

Es importante enfatizar que el término nanotecnología aplicado al estudio de nanopartículas consiste simplemente en renombrar el estudio de las dispersiones coloidales, en cuyo campo destacan las aportaciones de renombrados científicos como Michael Faraday, quien en 1857 difunde la primera síntesis de nanopartículas de oro y otros metales [9]. En el artículo, Faraday pone de manifiesto su asombro por los cambios en las propiedades ópticas de estos materiales nanométricos. Estas propiedades, fueron explicadas en 1908 por Gustav Mie quien daría solución a la ecuaciones de Maxwell para partículas con un volumen finito [10]. En 1925, Richard Zsigmondy sería galardonado con el Premio Nobel de Química por su demostración de la naturaleza heterogénea de las dispersiones coloidales [11]. Sus aportaciones en términos

metodológicos se han convertido desde entonces en fundamentales para el estudio de la química coloidal moderna y de la nanotecnología.

En 1981, Eric Drexler [12] propone lo que hoy en día es conocido como un enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up*), donde los átomos son autoensamblados para crear estructuras de mayor orden jerárquico. El mismo contrasta con la aproximación propuesta por Feynman, quien concibe el comienzo de la nanotecnología desde un enfoque de arriba hacia abajo (*top-down*), construyendo máquinas cada vez más pequeñas que, en última instancia, son usadas para manipular la materia con precisión atómica. En especial, el enfoque *bottom up* resulta de gran interés en la síntesis de nanopartículas, donde las propiedades de autoensamblaje, producto de las interacciones químicas y físicas naturales entre las moléculas, pueden ser explotadas para dar lugar a características definidas. Es este concepto el que abre un gran abanico de posibilidades hacia la síntesis de nanopartículas con una amplia variedad de funcionalidades. Desde este punto de vista, la ingeniería de nanopartículas se basa en “programar” con instrucciones predeterminadas el autoensamblado de los átomos o moléculas de tal manera que las nanopartículas deseadas sean el producto final.

Diferentes autores ven entrecruzados los caminos de la nanotecnología y la medicina en 1986, cuando Matsumura y Maeda [13] observaron que una proteína anticancerígena unida a nanopartículas poliméricas presentaba mayor acumulación en tejidos tumorales que en tejidos sanos. Este descubrimiento dio lugar a la teoría de permeabilidad y retención aumentadas como consecuencia de la fisiología tumoral y del tamaño de las nanopartículas (<200 nm), que son capaces de penetrar en las células tumorales por su reducido tamaño y a la vez ser retenidas [13]. El descubrimiento sienta las bases para el desarrollo de distintas teorías sobre la liberación dirigida mediante transporte pasivo hacia tejidos tumorales y a una gran cascada de avances en el diseño de nanoportadores de fármacos. En 1995, la primera nanoestructura, basada en liposomas para la distribución del fármaco doxorubicina fue aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.) bajo el nombre comercial de Doxil® [14]. Desde entonces y hasta abril del 2016, más de 50 nanomedicinas de diferente índole han sido aprobadas por la FDA y se prevé que éste sea sólo el principio de un futuro cercano [15]. En el momento de escribir esta tesis, una de las estimaciones de capitalización de mercado más conservadoras estiman que el valor del conjunto de las nanomedicinas está comprendido en 47.500 millones de dólares y se espera que aumente hasta los 164.000 millones para el 2027 impulsado por la crisis sanitaria del SARS-CoV-2 [16].

## 1.2. Tipos de nanopartículas

Las modernas y avanzadas técnicas de síntesis han dado lugar a la preparación de gran variedad de nanopartículas con diversas formas y tamaños junto con la utilización de una gran diversidad de materiales. La clasificación de las nanopartículas puede basarse en diferentes parámetros físicos y/o químicos. Aquí se presenta un breve resumen de las características y funciones más importantes de diferentes tipos de nanopartículas usadas en biomedicina, clasificadas en base a los materiales utilizados en su síntesis.

### 1.2.1 *Nanopartículas metálicas*

Las nanopartículas metálicas han atraído gran interés para su utilización en medicina como agentes anticancerígenos [17], agentes de contraste para imágenes [18] y portadores de fármacos [19]. Una de las propiedades más explotadas de éstas es el incremento en las absorptividades molares que presentan las dispersiones coloidales debido a la intensidad de la resonancia de su plasmón superficial [20], siendo ejemplos clásicos de esto las nanopartículas de metales como el oro, la plata o el cobre. La resonancia de plasmón puede irradiar luz (dispersión de Mie), proceso que encuentra una gran utilidad en los campos ópticos y de imágenes, o puede convertirse rápidamente en calor (absorción). Este último mecanismo puede ser utilizado para convertir a las nanopartículas metálicas en fuentes de calor activadas por luz para ser utilizadas en medicina en fototermólisis láser selectiva de células cancerígenas [21–23]. Las propiedades del plasmón de resonancia pueden ser ajustadas mediante el tamaño, morfología y naturaleza de los metales utilizados para la síntesis de nanopartículas, pudiendo de esta forma servir para diferentes propósitos [17]. Sus propiedades ópticas y elevada capacidad para catalizar reacciones y transferencia de electrones también les confieren aplicaciones como biosensores [20] que mediante ingeniosas modificaciones son capaces de amplificar significativamente las señales [24].

Las nanopartículas metálicas también son de interés como vehículos para la administración de fármacos y otros principios activos debido a su elevada relación superficie-volumen, estabilidad y funcionalidad a través de modificaciones químicas de su superficie y relativa inocuidad. Por ejemplo, Libutti y colaboradores [25], funcionalizar la superficie de nanopartículas de oro de 27 nm con factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y polietilenglicol. Las nanopartículas lograron acumularse pasivamente en los tejidos cancerosos, y debido a esto, los investigadores fueron capaces de administrar dosis del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  que previamente eran consideradas tóxicas. Las nanopartículas de óxido de hierro han sido

aprobadas por la FDA para el tratamiento de la anemia [26]. Recientemente, estudios de *docking* molecular plantean la reutilización de estas nanopartículas para combatir la actual pandemia mundial de SARS-CoV-2 [27]. Los estudios revelaron que tanto las nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  como de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  interactúan de manera eficaz con diferentes proteínas y glicoproteínas del virus. Se espera que estas interacciones asociadas con cambios conformacionales en las proteínas resulten en la inactivación del virus.

Sin embargo, a pesar del gran auge de las nanopartículas metálicas debido a su larga historia y a la sencillez en lo que a su síntesis se refiere, estas presentan problemas de toxicidad en usos prolongados al no poder ser biodegradadas [28–30]. Además, diferentes autores ya han expresado su preocupación en relación a la neurotoxicidad de estas partículas al ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica [31,32].

### 1.2.2 Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de una o más membranas concéntricas de bicapas lipídicas con un compartimento interno que normalmente contiene agua. Los liposomas tienen la capacidad de encapsular tanto moléculas lipofílicas en su membrana como hidrofílicas en su membrana o en su cavidad interna. El tamaño de estas vesículas puede variar desde unos pocos nanómetros hasta varios micrómetros. Sin embargo, los liposomas para uso médico oscilan entre 50 y 450 nm [33]. Estos fueron descubiertos en la década de los años 60 [34] y ostentan ser las primeras nanopartículas en ser utilizadas para la administración de nanomedicinas después de la aprobación de Doxil® por la FDA en 1995 [14]. En la actualidad, se han producido avances tecnológicos que han logrado utilizar diversos lípidos naturales o sintéticos, así como surfactantes, para modificar las propiedades fisicoquímicas de los liposomas dando lugar a la segunda y tercera generación de liposomas [35]. Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los liposomas influyen en su interacción con las células, la vida media en circulación, la capacidad para penetrar tejidos y su destino final *in vivo* [35]. Por ejemplo, al cambiar en los liposomas una bicapa de fosfolípidos en fase líquida por una bicapa en fase sólida mediante la incorporación de colesterol (efecto tensor de la bicapa) o esfingomielina, aumenta la retención del fármaco cargado en los liposomas, retrasando la liberación.

Desde la redacción de esta tesis, las empresas BioNTech/Pfizer y Moderna utilizan liposomas para el transporte de ARNm en una vacuna pionera contra el SARS-CoV-2 [36,37]. Los liposomas protegen a el material genético frente a la degradación y aumentan la eficiencia de translocación hacia el interior de las células presentadoras de antígenos. Además, estas

nanopartículas permiten la coadministración de adyuvantes para iniciar una respuesta inmune coordinada [36].

Sin embargo, éstos han presentado varios problemas e implicaciones farmacológicas bajo el uso prolongado. Un gran inconveniente de los liposomas convencionales es su rápida captura por el sistema reticuloendotelial [38]. Los liposomas se acumulan principalmente en el hígado y el bazo, debido a su abundante irrigación sanguínea y a la abundancia de células fagocíticas residentes en estos tejidos [39]. El marcado aumento en la retención y acumulación de fármacos liposomales en estos órganos puede retrasar la eliminación de los fármacos anticancerosos lipofílicos de la circulación [40]. Además, durante la quimioterapia, puede conducir a un agotamiento parcial de los macrófagos e interferir con las importantes funciones de defensa del huésped en este tipo de células [41].

### *1.2.3 Nanocristales*

Los nanocristales son quizás las formas más simples de nanomedicina, es decir nanopartículas compuestas al 100% del fármaco. La gran relación superficie/área ofrecidas por la escala nanométrica consigue aumentar la velocidad de disolución permitiendo mejorar perfiles farmacocinéticos. El reducido tamaño de las nanopartículas incrementa la penetración de los nanocristales a barreras biológicas como el tracto digestivo, aumentando de esta manera la biodisponibilidad de fármacos insolubles. Los problemas de solubilidad relacionados con una serie de compuestos farmacológicos se han mejorado mediante su conversión en nanocristales y se comercializan para una variedad de indicaciones [42]. El molino de perlas desarrollado por Elan Nanosystems se empleó para producir los primeros tres nanocristales aprobados por la FDA: Rapamune®, Tricor® y Emend®, y se espera que sea aplicable de una manera casi universal a una variedad de medicamentos que presentan problemas de solubilidad, que se estima que son entre el 70-90% de los compuestos farmacológicos potenciales [43]. La producción de nanopartículas cristalinas para su uso en medicina también abarca materiales inorgánicos [42–44]. Aunque las nanopartículas inorgánicas aprobadas por la FDA (año 2016) se limitan a hidroxapatita y fosfato de calcio para su uso como sustitutos de injertos óseos y óxido de hierro, para el tratamiento del glioblastoma y la anemia, por deficiencia de hierro en enfermedades renales [15].

### *1.2.4 Nanopartículas poliméricas*

Las nanopartículas poliméricas son partículas coloidales de naturaleza sólida que, dependiendo del método de preparación, pueden formar dos tipos de estructuras: nanoesferas

o nanocápsulas [45]. Las nanoesferas consisten en un sistema de matriz en el que el fármaco puede adsorberse en la superficie o coprecipitarse con el polímero [46], mientras que en las nanocápsulas el fármaco está incluido en una cavidad interna rodeada por una membrana polimérica [47]. Los polímeros naturales como carbohidratos y proteínas varían sus propiedades entre hidrofílicos, hidrofóbicos e incluso anfifílicos. Por otro lado, los polímeros sintéticos son mayoritariamente de naturaleza hidrofílica y pueden presentarse en forma prepolimerizada o ser polymerizados durante el proceso de síntesis de las nanopartículas. Los polímeros sintéticos, a su vez, pueden ser subdivididos en dos clases, biodegradables y no biodegradables. El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) es un polímero biodegradable ampliamente utilizado para la administración fármacos [48,49]. Por otra parte, los poliacrilatos son polímeros no biodegradables que también han sido estudiados para administración de fármacos [50,51], aunque en menor medida en comparación con los polímeros biodegradables por claras razones de biocompatibilidad [52].

Las nanopartículas poliméricas tienen un inmenso potencial como portadores de fármacos, ya que pueden administrarlos en diferentes órganos, protegen a los fármacos contra la degradación *in vitro* e *in vivo*; liberan el fármaco de forma controlada y también ofrecen la posibilidad de dirigir los fármacos a tumores pasivamente u otros tejidos activamente [45]. El uso de nanopartículas poliméricas para la distribución de fármacos es un enfoque universal para aumentar el rendimiento terapéutico de aquellos que son poco solubles en cualquier vía de administración.

### **1.3. Ventajas de las nanopartículas para la distribución de fármacos**

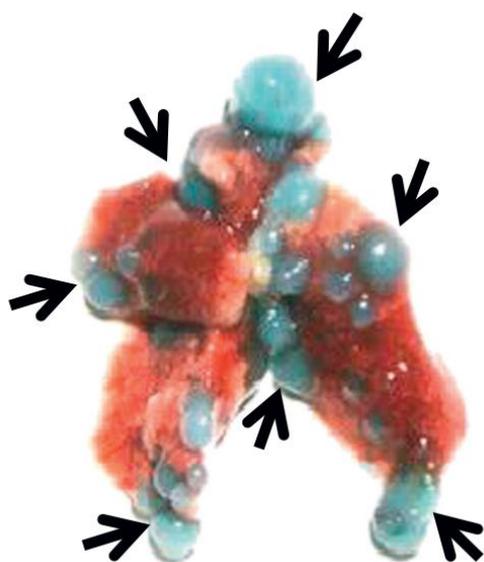
Las nanopartículas aportan al campo de la medicina un nuevo nivel de ingeniería y control al poder modificar parámetros tales como la solubilidad, difusividad, vida media, toxicidad, farmacocinética y biodistribución de fármacos y capacidad de diagnóstico. Las aplicaciones de las nanopartículas son muy diversas y se espera que aumenten con el avance de la tecnología. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado la capacidad de las mismas para funcionar como sensores [53], portadores de fármacos [54–56] y agentes de diagnóstico [1,57]. Recientes esfuerzos han logrado integrar tratamientos y diagnósticos en una sola aplicación, dando lugar a los procedimientos conocidos como “teranósticos”.

La justificación del uso de nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco yacen en al menos tres mecanismos: (i) la permeabilidad y retención aumentadas (EPR, del inglés *Enhanced Permeability and Retention*) de las nanopartículas en tumores sólidos; (ii) la

posibilidad de transportar fármacos insolubles en la sangre mediante sistemas coloidales estables y (iii) la liberación controlada del mismo. En esta sección se desarrollarán las posibles ventajas de cada uno de estos puntos.

### 1.3.1 Penetración celular y retención aumentada (EPR)

El término EPR fue acuñado por Matsumura y Maeda en 1986 [13]. En su trabajo, los investigadores observaron que la proteína anticancerígena, neocarzinostatina conjugada a una matriz polimérica presentaba mayor acumulación en los tejidos tumorales que la neocarzinostatina por si sola. Mediante la aplicación de macromoléculas marcadas en ratones portadores de tumores observaron que la concentración de éstas era hasta 5 veces mayor en las zonas tumorales que en la sangre en un periodo de entre 19 y 72 h [13]. Los autores afirman que la acumulación pasiva en los tumores de estas macromoléculas es debido a la fisiología anormal asociada a las masas tumorales: la hipervascularización fenestrada con permeabilidad aumentada a las macromoléculas (o nanopartículas) y la poca recuperación a través de los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos [58]. Posteriormente, se demostró que otras proteínas plasmáticas de más de 40 kDa (equivalente a un diámetro de *ca.* 5-6 nm en el caso de una proteína globular) son capaces de acumularse pasiva y diferencialmente en zonas tumorales [59]. El efecto EPR puede ser demostrado en ratones con la inyección intravenosa del marcador Azul Evans, el cual se une a la albúmina plasmática formando un complejo que demuestra la acumulación diferencial en las zonas tumorales [60], tal y como se muestra en la Figura 1.1.

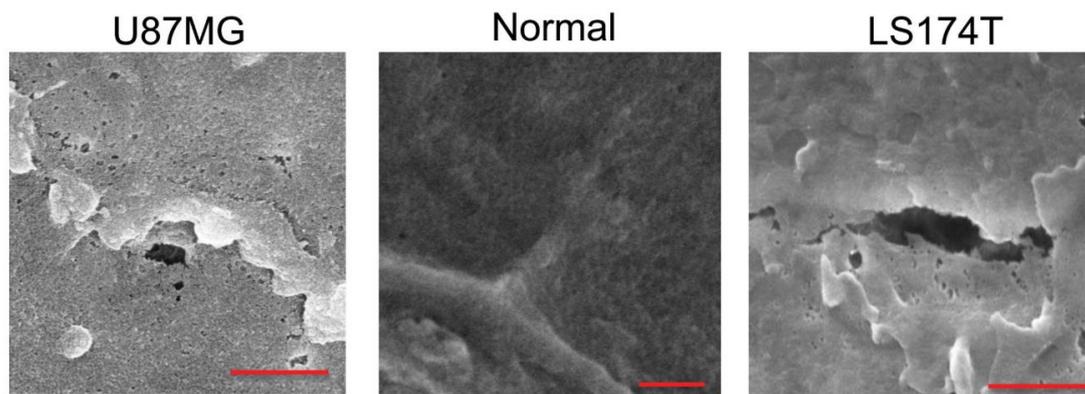


**Figura 1.1.** Fotografía de un cáncer metastásico de pulmón originado de 26 tumores de colon implantados en la piel dorsal de un ratón. El ratón fue sacrificado 3 meses después del implante y 10 horas antes de sacrificarlo, se inyectó por vía intravenosa una solución de azul de Evans (5%) para permitir que el efecto EPR se hiciera visible. El complejo albúmina - azul de Evans (70 kDa o *ca.* 7.3 nm de diámetro hidrodinámico) se acumulaba preferentemente en los nódulos tumorales metastásicos, como en los tumores primarios. Las flechas apuntan a los nódulos tumorales metastásicos [61]

## Capítulo 1

Para que la acumulación pasiva mediante el efecto EPR sea importante, se necesitan diferentes requisitos. En primer lugar, las nanopartículas deben permanecer en circulación por un tiempo superior a 6 horas [61,62]. Esto generalmente puede ser alcanzado mediante la funcionalización de las nanopartículas con polietilenglicol (PEG) [63]. Por otro lado, el mecanismo también depende de que las partículas tengan un tamaño suficientemente pequeño como para poder penetrar las membranas biológicas pero lo suficientemente grande como para ser retenidas. Yuan y colaboradores [64] midieron la permeabilidad microvascular de varias macromoléculas en el adenocarcinoma de colon humano LSI74T trasplantado en ratones con inmunodeficiencia. Los resultados indicaron que el límite de tamaño (*cut-off*) del poro ronda los 400-600 nm, dependiendo de propiedades fisicoquímicas como carga e hidrofobicidad de las nanopartículas. Respecto al tamaño mínimo, Maeda y colaboradores [59] estiman que el tamaño de la nanopartícula debe ser superior a 40 kDa para mostrar una retención significativa en la zona tumoral.

La extravasación vascular también resulta altamente dependiente de la morfología y del tipo específico de tumor. En la Figura 1.2 se muestran micrografías electrónicas de barrido de un epitelio vascular normal y dos epitelios asociados a distintos tumores. Como se puede observar, los epitelios asociados a tumores presentan poros (fenestraciones) importantes y su tamaño depende del tipo de tumor. Smith y colaboradores [65] estudiaron la capacidad de extravasación de *quantum-dots* (20-25nm) y nanotubos de carbón de pared simple (2-3 x 200 nm) en tumores implantados en orejas de ratón. La superficie de ambos tipos de nanopartículas fue modificada por PEG para evitar diferencias de carga o química de la superficie y que los resultados fueran únicamente debidos a la morfología de las partículas. Los autores encontraron que los *quantum-dots* esféricos son capaces de extravasar el endotelio de tumores LS174T, mientras que los nanotubos cilíndricos son capaces de extravasar en tumores U87MG. Sorprendentemente, los autores no fueron capaces de ver extravasación de los nanomateriales en endotelio normal. Esto sugiere que la morfología de las nanopartículas puede ser un factor determinante para penetrar ciertos tumores, mientras que los endotelios sanos son capaces de evitar el trasvase de las nanopartículas.



**Figura 1.2.** Microscopía de exploración por emisión de tumores y vasos sanguíneos normales. Las imágenes SEM muestran poros en la vasculatura tumoral U87MG y LS174T en el límite aparente entre las células endoteliales. No se observan poros en el límite de la vasculatura de una oreja de ratón sin tumor. Barras de escala: U87MG (500 nm), Normal (1  $\mu\text{m}$ ) y LS174T (1  $\mu\text{m}$ ) [65].

Aunque el modelo de EPR se ha probado en roedores con grandes masas tumorales inducidas [60,66], estos modelos difieren ampliamente en morfología y fisiología de los posibles tumores en humanos y como consecuencia, aún se encuentra gran controversia respecto al mismo [56,61,67]. En primer lugar, se han reportado tumores de hasta un 10% del peso corporal en ratones. Si hacemos una analogía con un humano de 70 kg, el tumor tendría el tamaño de un balón de baloncesto [68], cuando realmente tienen un tamaño entre los milímetros y centímetros en el momento del diagnóstico y tratamiento [69]. Semejantes masas tumorales filtran una proporción significativa de la dosis inyectada de un fármaco y actúan como un depósito para el mismo, acentuando la eficacia mientras mitigan la toxicidad. Sumado a esto, el microambiente tumoral en humanos presenta diferencias fisiológicas importantes en comparación con los tumores murino: (i) falta de fenestraciones en el endotelio tumoral para el ingreso de nanopartículas, (ii) heterogeneidad del flujo sanguíneo a través de los tejidos, lo que hace que las regiones se vuelvan ácidas o hipóxicas [70], (iii) cobertura de pericitos más baja, (iv) membrana basal heterogénea y (v) densidad más alta y heterogénea de la matriz extracelular. Esto conduce a un presión intersticial elevada y por ende que el principal mecanismo de transporte de materia sea por difusión y no por transporte convectivo que es más eficiente [70,71].

Por estas razones, no es posible trasladar directamente los resultados obtenidos en roedores a humanos, principalmente debido a que la penetración celular depende de que las nanopartículas lleguen desde el punto de aplicación hasta la masa tumoral y sean capaces de interactuar con las células para ser internalizadas. Actualmente, se están investigando

## Capítulo 1

diferentes métodos para aumentar el efecto EPR. Por ejemplo, Fang y colaboradores [72] implementaron agentes capaces de generar selectivamente moléculas vasodilatadoras (monóxido de carbono) en zonas tumorales, consiguiendo un aumento de la concentración del nanoportador de entre 2 y 3 veces mayor en estas, mientras que no se detectó un aumento en tejidos sanos. Resultados similares se han conseguidos con nanoportadores capaces de liberar óxido nítrico [73,74]. El aumento de la presión sanguínea resulta en un incremento de la presión osmótica, lo que promueve la filtración de las partículas hacia las zonas tumorales, por lo que al coadministrar angiotensina II con los nanoportadores se aprecia un incremento de la trasvasación y acumulación en las zonas tumorales [75].

En contraste con la acumulación pasiva de los nanoportadores de fármacos en las zonas tumorales por el mecanismo EPR, se presenta el direccionamiento activo, el cual se basa en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con moléculas de reconocimiento como anticuerpos [76,77] o ligandos [78,79] capaces de unirse específicamente a moléculas sobreexpresadas en el sitio objetivo [80]. En la estrategia de direccionamiento activo, se pueden distinguir dos objetivos celulares: (i) el direccionamiento a células cancerosas, que presentan sobreexpresión de moléculas como transferrina, folato, receptor del factor de crecimiento epidérmico o receptores de glucoproteínas y (ii) el direccionamiento al endotelio tumoral, que cuentan con sobreexpresión de los factores de crecimiento endotelial vascular (del inglés, VEGF), las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , la molécula de adhesión celular vascular-1 (del inglés, VCAM-1) o las metaloproteinasas de matriz [67,81]. En algunos casos, ambos receptores se encuentran sobreexpresados en las células y el endotelio canceroso y pueden ser explotados simultáneamente [81]. Sumado a esto, el diseño de los sistemas de direccionamiento activo de nanoportadores puede conllevar el acoplamiento de moléculas de reconocimiento como receptores de superficie capaces de iniciar endocitosis, lo que aumentará la internalización celular en contraste con la simple acumulación [82]. Esto no solo aumentaría la eficacia antitumoral de muchos fármacos, si no que podría ser utilizada para la entrega de material genético [83].

### *1.3.2 Transporte de fármacos insolubles*

La mayoría de los medicamentos de administración oral solubles en agua y capaces de penetrar membranas biológicas durante el paso del tracto gastrointestinal llegarán finalmente a ser biodisponibles en el organismo. Por el contrario, los fármacos insolubles en agua generalmente no estarán biodisponibles después de la ingestión oral al no poder disolverse y atravesar la barrera gastrointestinal. En la misma línea, debido a la baja solubilidad, éstos no

pueden ser administrados por vía intravenosa y la administración mediante vía parenteral no siempre resulta en un aumento de la biodisponibilidad [84]. Se estima que el 90% de los fármacos en vías de desarrollo son insolubles en agua, mientras que tan solo el 40% de los fármacos en el mercado comparten esta característica [85]. Estas estadísticas podrían indicar que una gran cantidad de fármacos en vías de desarrollo no encuentra su administración a pacientes debido a su baja solubilidad en agua. Esto no sólo implica la merma del capital invertido en investigación y desarrollo, sino también las oportunidades de tratamiento perdidas. El desarrollo de un fármaco en 2011 fue estimado entre 92 millones y 1800 millones de dólares [86] prolongándose por un periodo de entre 11.4 y 13.5 años en promedio [87]. A la luz de estos números podemos ver que la baja solubilidad en agua representa un reto y una oportunidad formidable para la nanotecnología.

Existen tres factores que determinan la velocidad y el grado de absorción de los fármacos de administración oral: (i) velocidad de disolución, (ii) solubilidad y (iii) permeabilidad intestinal, los cuales son agrupados según el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS, de sus siglas en inglés *Biopharmaceutical Classification System*) en las categorías [88]:

Clase I: Alta Solubilidad - Alta Permeabilidad

Clase II: Baja Solubilidad - Alta Permeabilidad

Clase III: Alta Solubilidad - Baja Permeabilidad

Clase IV: Baja Solubilidad - Baja Permeabilidad

El criterio establecido por el BCS clasifica un fármaco como soluble cuando es capaz de disolver una dosis terapéutica entera en 250 mL de agua, siendo este volumen equivalente al promedio de agua que encontraremos en el estómago [88].

Como se puede deducir, las posibilidades de introducir en el mercado un fármaco de la clase I son substancialmente mayores que las del resto de categorías, sin embargo, una posible solución a estos problemas radica en el desarrollo de portadores de fármacos capaces de transportar a los mismos en una dispersión coloidal estable y con partículas capaces de atravesar membranas biológicas [89]. Como ejemplo, Atovaquone (Wellvone®) es una medicación antimicrobiana utilizada para el tratamiento de *Pneumocystis carinii*, leishmaniasis y *P. falciparum* malaria, sin embargo, su baja solubilidad limita su absorción. Mediante la formulación de una dispersión de nanopartículas de este fármaco, se logró aumentar la absorción del 15 al 40% con una dosis de fármaco 3 veces menor [90]. Xie y colaboradores [91] prepararon SFN cargadas con curcumina para aumentar la velocidad de disolución del

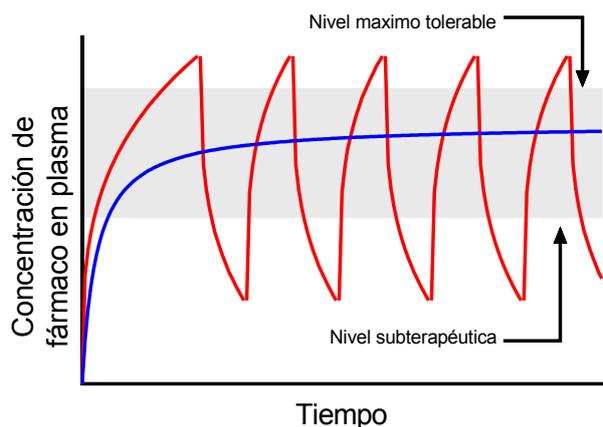
## Capítulo 1

fármaco y la masa del mismo en dispersión. Resultados recientes de nuestro grupo de investigación revelan que las SFN son un excelente vehículo para el transporte del fármaco natural naringenina, con propiedades anticancerígenas [92], el cual presenta una baja solubilidad en agua. Los resultados indican que este fármaco cargado en las nanopartículas es 1.7 veces más efectivo en reducir la viabilidad de células cancerígenas de cuello de útero (HeLa) que por sí solo. Estos resultados pueden ser atribuidos a la baja solubilidad y lenta disolución de la naringenina libre, la cual al ser cargada en las SFN se mantiene estable en dispersión, aumentando su penetración celular y mejorando el perfil de disolución.

### 1.3.3 *Libración controlada*

Las nanopartículas pueden ser utilizadas como reservorios de fármacos para su liberación controlada en el tiempo, lo que ofrece numerosas ventajas comparadas con la administración convencional de múltiples dosis. Entre ellas, podemos destacar el aumento de la eficacia, reducción de la toxicidad y mejora en la cooperación del paciente [93]. Las dos primeras pueden ser considerada como el incremento de la actividad terapéutica en comparación con la intensidad de los efectos secundarios, mientras que la última ofrece la ventaja de reducir el número de aplicaciones necesarias durante el tratamiento.

La liberación controlada es especialmente beneficiosa para aquellos medicamentos cuya vida media en sangre es relativamente baja debido a una alta tasa de metabolización y eliminación por parte del organismo. Este efecto puede observarse en el esquema de la Figura 1.3, donde se representa la concentración de un fármaco en sangre aplicado por un método convencional (línea roja) frente a un sistema de liberación controlada (línea azul). Como se puede apreciar, el fármaco administrado de manera convencional se encuentra sólo una fracción del tiempo en la zona considerada terapéutica, mientras fluctúa entre concentraciones subterapéuticas y por encima del nivel máximo tolerable. El sistema de liberación controlado, por otro lado, si bien tarda más tiempo en alcanzar la ventana de concentración terapéutica, se mantiene estable dentro de ella. El objetivo del sistema es igualar la tasa de eliminación con la de liberación en la zona de concentración terapéutica. En la clínica, esto se traduce en una inmensidad de beneficios, por ejemplo, en el caso de la administración de analgésicos, se podría evitar que la concentración baje a niveles subterapéuticos y por ende que el paciente sienta dolor. Esto es trasladable a otra gran cantidad de fármacos incluidos antiinflamatorios, antibióticos, anestésicos, hormonas, quimioterapéuticos, etc.



**Figura 1.3.** Esquema de la concentración sanguínea de un fármaco después de múltiples administraciones como inyección convencional (línea roja) y como sistema de liberación controlada (línea azul).

Existen diferentes mecanismos por los cuales las nanopartículas poliméricas pueden permitir una liberación de fármaco controlada. Por una parte, la liberación puede ser retrasada mediante la utilización de un polímero soluble en agua como matriz, cuya velocidad de disolución sea lenta y a consecuencia de ello libere el fármaco a la velocidad de disolución de éste. En el caso de polímeros insolubles, los mismos pueden actuar como barrera de difusión, ralentizando la liberación del fármaco desde el interior de la nanopartícula hacia el medio. La liberación también puede ser controlada por un flujo osmótico generado por una membrana semipermeable, la cual es en sí misma el nanosistema, como es el caso de los liposomas. Por último, se podría conseguir un sistema de liberación que responda a estímulos internos o externos, lo cual sería de gran utilidad, por ejemplo, en pacientes diabéticos en los que el nanosistema liberaría insulina bajo demanda de la concentración de glucosa en sangre [94]. Volpatti y colaboradores [95] han conseguido sintetizar nanopartículas cuya liberación de insulina es sensible a los niveles de glucosa mediante la adición de glucosa oxidasa y catalasa en las mismas. Estos investigadores demostraron que una sola inyección subcutánea proporciona 16 h de control glucémico en ratones diabéticos. Cheng y colaboradores [96] desarrollaron SFN capaces de cargar el fármaco antitumoral paclitaxel (3%) y liberarlo sostenidamente durante 14 días.

#### 1.4. Diseño de las nanopartículas

Desde el punto de aplicación hasta el lugar de acción, las nanopartículas se enfrentan a una gran cantidad de desafíos. En primer lugar, son diluidas en aproximadamente 5 L de sangre que circula a 5 L/min por el sistema circulatorio de unos  $10^6$  km de largo, donde la velocidad en vaso sanguíneo y arterias puede encontrarse entre los 1.5-33 cm/s [97] dificultando la interacción entre nanopartículas y el tejido objetivo. Los fluidos intersticiales, presentan una

velocidad mucho más reducida, de apenas unos  $\mu\text{m/s}$ , donde las interacciones se verían favorecidas. Sin embargo, llegar a ellos significa atravesar barreras biológicas, lo cual no es una tarea sencilla. Por último, a todo lo anterior se le añade que cuando las nanopartículas entran en el organismo son tratadas hostilmente por el sistema inmunitario. Por estos motivos, se aplican diferentes principios de diseño a las nanopartículas para intentar sortear diferentes obstáculos dependiendo de la aplicación final de las mismas.

Como se ha mencionado anteriormente, tan pronto como las nanopartículas entran al organismo, se encuentran expuestas al sistema de fagocitos mononucleares que consiste en un sistema de células fagocíticas, predominantemente macrófagos residentes en el bazo, los ganglios linfáticos y el hígado, que secuestran las nanopartículas inmediatamente después de su administración [98]. Este proceso comienza con la opsonización de las nanopartículas basado en la adsorción de proteínas plasmáticas, incluyendo albúmina, proteínas del sistema complementario, receptores de reconocimiento de patrones e inmunoglobulinas. Este proceso es relativamente rápido y puede ocurrir en periodos de tiempo tan cortos como 30 segundos [99]. Esta "funcionalización natural" es conocida como la formación de la corona de proteínas y claramente puede alterar la función o el destino de las nanopartículas al perturbar diferentes parámetros como tamaño, carga y química de la superficie, así como la hidrofobicidad. Esta corona de proteínas puede incluso enmascarar los receptores o ligandos unidos a las nanopartículas [100].

Se han desarrollado diferentes estrategias de diseño para evitar la opsonización y posterior eliminación por el sistema inmunitario. Dicha evasión del sistema inmunitario intenta aumentar el tiempo de circulación de las nanopartículas en el organismo y consecuentemente aumentar las posibilidades de que encuentre el tejido objetivo mientras circulan por el torrente sanguíneo. Una de las estrategias más fáciles y directas es la PEGilación, basada en la funcionalización de moléculas de polietilenglicol (PEG) en la superficie de las nanopartículas donde las unidades de polímero forman asociaciones muy fuertes con las moléculas de agua generando una capa de hidratación y una barrera estérica a la opsonización [101,102]. Una estrategia alternativa puede ser la de funcionalizar las nanopartículas con señales endógenas normalmente presentes en células sanas. Rodríguez y colaboradores [103] han funcionalizado partículas víricas con la proteína de membrana CD47, la cual actúa como una señal de "no fagocitación" [104] consiguiendo prolongar el tiempo de circulación. Otra estrategia similar a la anterior es biomimetizar las partículas con membranas celulares naturales [105,106]. Otra vía para aumentar el tiempo de circulación es la propuesta por Nikitin y colaboradores [107], basada en una leve y transitoria supresión del sistema de fagocitos mononucleares mediante la

administración de anticuerpos anti-eritrocitos. Los investigadores lograron aumentar la vida media en circulación de diferentes nanosistemas hasta 32 veces a través de la supresión de *ca.* 5% de los hematocritos.

La SF presenta propiedades únicas de baja respuesta inmunológica, lo que le permite evadir el sistema inmunitario. Esto puede ser ejemplificado con el estudio de Catto y colaboradores [108], quienes implantaron matrices tubulares basadas en SF en ratones, detectando pocos macrófagos marcados con anticuerpos anti-ED1, indicando una respuesta inflamatoria baja. La ausencia de reclutamiento de linfocitos T (anticuerpos anti-CD4) demostró que no hubo una respuesta inmunológica mediada por células. Recientemente, bajo un diseño de vanguardia, Tan y colaboradores [109] han diseñado un nanosistema de liberación de doxorubicina utilizando la SF como caballo de Troya. Los investigadores sintetizaron nanopartículas de carbonato de calcio amorfo cargadas con el fármaco y las recubrieron con SF. Ésta previene la liberación prematura de la doxorubicina y ayuda a evadir el sistema inmunitario. Gracias al mecanismo EPR, las nanopartículas son acumuladas en los tejidos cancerosos y finalmente internalizadas por los lisosomas. El pH ácido de estos últimos promueve la generación de CO<sub>2</sub> a partir del carbonato cálcico resultando en el estallido del lisosoma por la expansión del gas y la liberación de la doxorubicina en el interior de la célula blanco. Los resultados en ratones revelaron que las nanopartículas recubiertas con SF son más efectivas para reducir la masa tumoral y prevenir efectos secundarios en los ratones con respecto a la doxorubicina libre o las nanopartículas de carbonato cálcico sin recubrimiento. Sumado a esto, las pruebas de inmunotoxicidad indicaron que las nanopartículas no iniciaron una respuesta inmune al no aumentar la cantidad de células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) ni IgM, IgG o IgA respecto al grupo control. Más información sobre la liberación de fármacos intracelular puede encontrarse en la revisión de Fenghua y colaboradores [110].

## **1.5. Vías de administración de nanopartículas**

Las SFN han demostrado ser extremadamente versátiles para el transporte de compuestos terapéuticos como pequeños fármacos hasta proteínas y moléculas de ADN [111]. La funcionalidad de estos compuestos se encuentra en estrecha relación con la vía de administración. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser inyectadas en el torrente sanguíneo y hacer uso del efecto EPR para su acumulación pasiva en tumores metastásicos o pueden ser inyectadas directamente en la masa tumoral [112]. Por otro lado, las mismas pueden ser aplicadas tópicamente para el tratamiento de cáncer de piel [113] y de manera similar para

## Capítulo 1

tratamientos pulmonares [114,115]. Las SFN se han utilizado en una amplia variedad de vías de administración [55]. En aras de simplicidad, se mencionará sólo las principales rutas de administración: Parenteral, oral, transdérmico y pulmonar, y se citarán algunos de los estudios que abordan la utilización de SFN para estas diferentes vías de administración como prueba de concepto.

### 1.5.1 Parenteral

Las formas de dosificación parenteral están referidas a la administración como inyección, la cual puede ser subdividida en intravenosa (en una vena), intramuscular (en el músculo), subcutánea (debajo de la piel) o intradérmica (en la piel). La administración parenteral actúa más rápidamente que la administración tópica o enteral, y el inicio de la acción ocurre a menudo en un rango de segundos a minutos. Esencialmente, la biodisponibilidad del fármaco inyectado es del 100% y su distribución es sistémica, lo que significa que potencialmente es capaz de llegar a todo el organismo. Este último concepto emparejado con el efecto EPR como se mencionó anteriormente es de especial interés para el tratamiento de masas tumorales. Por ejemplo, ZhuGe y colaboradores [116], prepararon SFN con su superficie funcionalizada por proantocianidinas y cargadas con verde de indocianina. La indocianina es capaz de absorber luz infrarroja cercana (650-900 nm) y producir un efecto térmico tanto *in vitro* como *in vivo*. Este compuesto fototérmico está aprobado por la FDA y puede ser utilizado para matar células por fototermólisis. Para probar su funcionalidad, los investigadores inyectaron las nanopartículas cargadas por vía intravenosa a ratones portadores de glioma C6. El estudio farmacocinético mostró que las nanopartículas lograron llegar a los gliomas después de la administración intravenosa *in vivo*, mientras que el estudio farmacológico demostró una inhibición del crecimiento tumoral después de irradiación con luz infrarroja cercana. Por otro lado, las nanopartículas también ofrecen un control de liberación temporal. Recientemente, en otro estudio, Zhan y colaboradores [117] administraron Celastrol cargado en SFN a ratas por vía intravenosa. Los resultados demostraron que la nanoencapsulación del fármaco produjo un aumento del tiempo de exposición total al fármaco, al incrementar su tiempo de residencia y reducir su metabolización.

### 1.5.2 Oral

La administración oral es la vía más común y probablemente la preferida por los pacientes a la hora de recibir medicamentos. Sin embargo, las formulaciones convencionales, como comprimidos y cápsulas, pueden liberar los fármacos de forma rápida y poco controlada, lo

que puede resultar en la degradación y alteración del fármaco debido al entorno del tracto gastrointestinal (variaciones del pH y la presencia de enzimas digestivas y microbiota). Además, el mecanismo común de absorción de fármacos a través del tracto gastrointestinal es la difusión pasiva. En consecuencia, la mayor parte de la dosis inicial no se absorbe, sino que es metabolizada y excretada. Las SFN poseen características favorables para superar los problemas mencionados y convertirse en candidatas de interés para la administración oral de compuestos terapéuticos. Debido a su capacidad mucoadhesiva, las SFN pueden adherirse firmemente a la mucosa gastrointestinal o a las células epiteliales intestinales (células M linfáticas de Peyer), seguidas de la internalización celular a través de endocitosis [118]. Por tanto, los fármacos encapsulados pueden entrar en el torrente sanguíneo de forma eficaz e intacta. Zhan y colaboradores [117] lograron más que duplicar la biodisponibilidad absoluta de Celastrol del 3.14% al 7.56%, al cargar el fármaco en SFN y administrarlo oralmente a roedores.

### 1.5.3 Pulmonar

El pulmón es un objetivo potencial para la administración de fármacos tanto para tratamientos locales como sistémicos. Localmente, se pueden tratar enfermedades pulmonares y respiratorias (ejemplo: cáncer pulmonar, tuberculosis) con una dosis reducida y menores efectos secundarios en comparación con las formas de dosificación convencionales. A nivel sistémico, debido a la gran superficie del pulmón, el fármaco puede absorberse rápida y eficazmente sin ser degradado por el metabolismo de primer paso como en la administración oral [119]. En 2015, Kim y colaboradores [114] prepararon micropartículas de SF cargadas con cisplatino para el tratamiento de cáncer pulmonar. Las partículas mostraron compatibilidad con la línea celular de adenocarcinoma epiteliales basales alveolares humanas (A549). Los resultados indican que el cisplatino cargado en las partículas aumenta la citotoxicidad respecto al fármaco aplicado por sí solo. Los investigadores concluyeron que las partículas muestran un alto rendimiento de aerosolización a través de la medición de la deposición pulmonar *in vitro*, que está al nivel de los inhaladores de polvo seco disponibles en el mercado.

### 1.5.4 Transdérmico

La administración transdérmica de fármacos mejora su biodisponibilidad y es capaz de tratamiento sistémico y local como en la aplicación pulmonar. Takeuchi y colaboradores [120] evaluaron la permeabilidad de nanopartículas de 40nm de SF a través de la piel *in vivo*

utilizando ratones y demostraron que las partículas son capaces de llegar a la dermis en 6 horas además del estrato córneo, los folículos pilosos y la epidermis que los rodea.

### **1.6. Eliminación de nanopartículas**

El uso de nanopartículas en humanos eleva grandes dudas sobre la seguridad y la capacidad de eliminación de éstas. Si la eliminación es muy rápida, las nanopartículas no residirán el tiempo necesario como para cumplir su función. Por el contrario, si la retención es muy elevada, la concentración de nanopartículas puede aumentar hasta el punto de convertirse en perjudicial. Por consiguiente, una pregunta relevante en el uso de nanopartículas en humanos es ¿cómo estos sistemas biológicos son capaces de eliminar las nanopartículas una vez cumplidas sus funciones? Las propiedades de las nanopartículas que afectan a su eliminación se basan principalmente en el tamaño, forma, composición, carga y química superficial. Estos aspectos se discutirán brevemente dentro de las dos principales vías de eliminación (i) renal y (ii) eliminación hepática para obtener una visión global del proceso.

#### *1.6.1 Eliminación renal*

Los riñones tienen la potencialidad de una rápida eliminación de partículas del sistema vascular sin la necesidad de descomposición. La eliminación renal involucra los mecanismos de filtración glomerular y secreción tubular para finalizar en la excreción urinaria [121]. Las nanopartículas llegan a las nefronas mediante la arteriola aferente, donde se encuentran con tres barreras endoteliales: el endotelio fenestrado; la membrana basal glomerular altamente cargada negativamente; y extensiones de podocitos de células epiteliales glomerulares. El epitelio fenestrado presenta poros con un diámetro fisiológico funcional de entre 9 y 10 nm, y unos pocos (*ca.* 1%) poros de 15 a 23 nm de diámetro [122], lo que significa que las nanopartículas con diámetros menores a 10 nm pueden difundir libremente independientemente de su carga. La segunda barrera presentada por la membrana basal glomerular filtra partículas entre 6 y 8 nm dependiendo de las interacciones electrostáticas entre la nanopartícula y la membrana [123]. De esta manera, las nanopartículas con baja carga o cargadas positivamente pueden difundir con mayor libertad. Después de la filtración glomerular, las nanopartículas entran al lumen de la cápsula de Bowman, donde pueden ser reabsorbidas. Debido a que el epitelio del tubo proximal está cargado negativamente, las nanopartículas con carga positiva pueden ser más fácilmente reabsorbidas.

Choi y colaboradores [124] administraron *quantum-dots* (nanopartículas inorgánicas) vía intravenosa a roedores para estudiar su eliminación renal. Los resultados indican que partículas con un diámetro hidrodinámico menor a 5.5 nm presentan eliminación rápida y el incremento de este diámetro es inversamente proporcional al tiempo de retención de los *quantum-dots* en el organismo.

### 1.6.2 Eliminación hepática y el sistema retículo endotelial

Aquellas nanopartículas que son demasiado grandes para ser excretadas por el sistema renal deben ser eliminadas por el sistema hepatobiliar. En 1924 Karl Albert Ludwig Aschoff acuñó el término de sistema reticuloendotelial (RES) para describir un sistema funcional celular ampliamente distribuido en el organismo, compuesto de macrófagos sésiles y circulantes de origen mesenquimatoso. Estas células tienen una marcada capacidad fagocítica hacia materia particulada. Los macrófagos almacenados en el RES pueden ser encontrados en el sistema nervioso central (microglía), en el bazo, nodos linfáticos, amígdalas, en la médula ósea (células reticulares) y particularmente en el hígado (90% del total de macrófagos) [125]. Las estructuras exógenas son sometidas a una fagocitosis muy intensiva por el RES al igual que las proteínas extrañas de mayor peso molecular. El flujo sanguíneo total debe pasar por el hígado, convirtiéndolo en un órgano central para controlar la sangre en busca de sustancias endógenas, extrañas y partículas que deben eliminarse por razones fisiológicas. Para poder desempeñar sus funciones, las células del RES poseen habilidades especiales como: fagocitosis, pinocitosis, liberación de sustancias señal (citoquinas, eicosanoides) y eliminación de endotoxinas, entre otras [125]. Además, éstas están equipadas con numerosos poros de varios diámetros, dependiendo de sus diferentes funciones, lo que les otorga la capacidad de filtrar moléculas y partículas más grandes, manteniéndolas alejadas del parénquima hepático. Las células de Kupffer y del seno endotelial se encuentran en una posición privilegiada para fagocitar cualquier coloide extraño para el organismo. Para este propósito, las células de Kupffer están equipadas con superficies ramificadas y ciliadas que actúan como mecánicos de captura. Además, poseen receptores específicos para los componentes de carbohidratos, así como para la región Fc de la IgG y para el complemento C<sub>3</sub> permitiéndoles diferenciar la materia opsonizada. También poseen enzimas lisosomales, aunque en cantidades mucho más bajas que las células endoteliales sinusales.

Poon y colaboradores [126], proponen un algoritmo para inferir cómo las nanopartículas pueden ser eliminadas *in vivo* (Figura 1.4). La mayoría de las nanopartículas con diámetros menores al límite de tamaño de filtración glomerular (~5.5 nm) son eliminadas por los riñones

y salen del cuerpo a través de la orina [124] aunque también se observa eliminación fecal de pequeñas nanopartículas [126]. Los nanoportadores o nanopartículas biodegradables de más de 5.5 nm pueden descomponerse [127,128] o metabolizarse [129] y pueden volver a la circulación sistémica. La mayoría de las nanopartículas no biodegradables de más de 5.5 nm quedan retenidas a largo plazo en las células de Kupffer [130]. Si las nanopartículas pueden evadir las células de Kupffer o si las células de Kupffer están incapacitadas, las nanopartículas pueden sufrir eliminación hepatobiliar. Similar al límite de tamaño de filtración glomerular, los autores proponen que hay un límite de tamaño de filtración en los endotelios sinusoidales hepáticos. Las nanopartículas más grandes que el tamaño de las fenestras de los endotelios sinusoidales del hígado tienen acceso restringido a los hepatocitos, mientras que las nanopartículas más pequeñas tienen mejor acceso a través de las fenestras para entrar en el espacio perisinusoidal. En general, las nanopartículas deben escapar de estas barreras establecidas por las células no parenquimatosas del hígado antes de que tengan el potencial de entrar al espacio de perisinusoidal e interactuar con los hepatocitos para su eliminación. Una vez que las nanopartículas interactúan con éxito con ellos, pueden transitar para ingresar a los conductos biliares. Finalmente, las nanopartículas ingresan al intestino y son eliminadas del cuerpo a través de las heces.

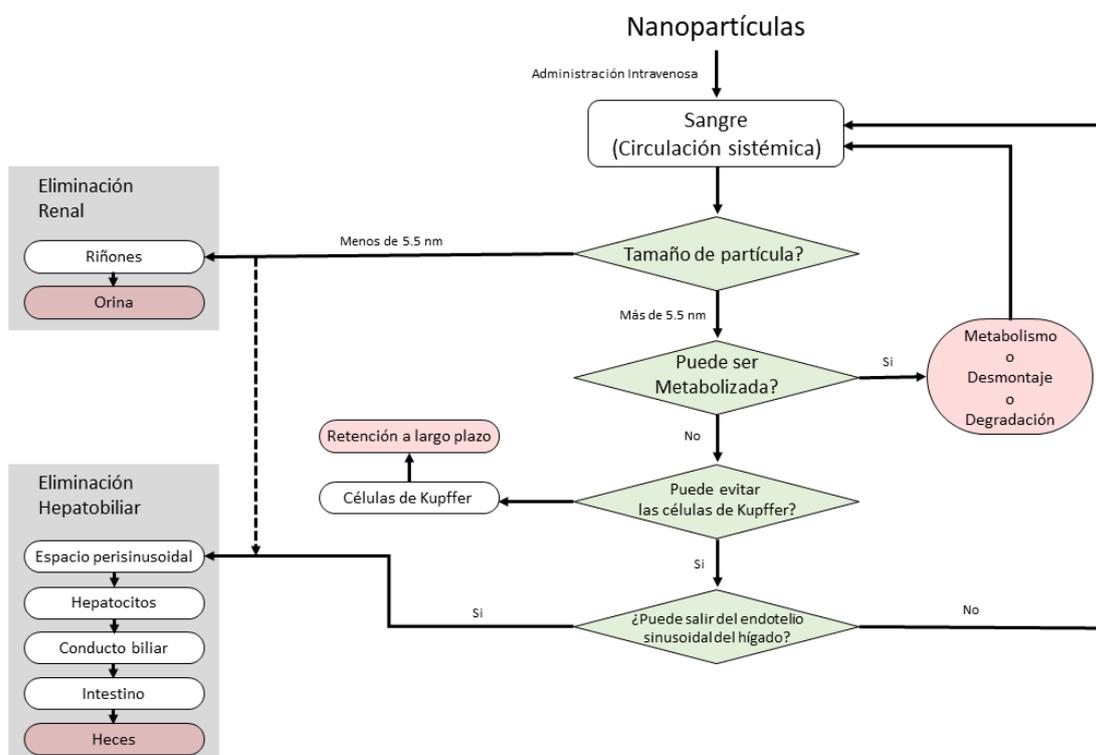


Figura 1.4. Diagrama de flujo para la eliminación de las nanopartículas *in vivo* [126].

## 1.7. La seda como biomaterial

La seda es un material ancestral utilizado desde el 2.450 AC [131] para la confección de tejidos. Después de haber sido un motor económico de varios imperios y acuñar el nombre a la ruta comercial que unía Asia, Europa y África, la seda sufrió una debacle a mediados del siglo XIX al introducirse los polímeros sintéticos derivados de los hidrocarburos, mucho más económicos. Sin embargo, en la actualidad, motivados por su biocompatibilidad y excelentes propiedades mecánicas, investigadores de todo el mundo intentan producir biomateriales basados en este biopolímero para diversidad de aplicaciones biomédicas, entre los cuales destacan, películas con rugosidades superficiales que aumentan la adhesión celular, estructuras 3D para implantes óseos, hidrogeles para protección de heridas y nanopartículas para la distribución de fármacos como ya se ha mencionado, entre otros [132–135].

Probablemente, la SF recibe una gran atención por parte del público general debido a sus propiedades mecánicas, por lo que se dedicará un breve espacio a comparar las mismas con otras fibras naturales y materiales de ingeniería. En la Tabla 1.1 se recogen valores de tensión a la rotura, elasticidad y porcentaje de deformación nominal a la rotura de la SF junto con los valores de otros biomateriales y materiales sintéticos. Excluyendo los biomateriales mineralizados (huesos), las fibras de Kevlar y carbono, la SF de *B. mori* junto con la seda de araña de *N. clavipes* son los biomateriales con mayor tensión a la rotura. Si bien la lista de biomateriales está incompleta, es justo decir que las fibroínas se encuentran entre los biomateriales poliméricos más resistentes (deformación a la rotura) y fuertes (tensión a la rotura) que se conocen. Ahora bien, la tensión a la rotura de la SF está muy por debajo de la del Kevlar y fibra de carbono, materiales de ingeniería que se emplean comúnmente para transmitir y soportar fuerzas de tracción. A primera vista, podríamos interpretar esta información como una indicación de que la fibroína es superior a otros biomateriales, como el colágeno, pero no tan "buena" como el Kevlar y las fibras de carbono. Sin embargo, esta interpretación está basada en el supuesto de que "bueno" significa rígido y fuerte. Observando detenidamente la Tabla 1.1, puede comprobarse que la SF es bastante extensible, presentando una deformación máxima de aproximadamente 18 %, mientras que los materiales de ingeniería fallan en deformaciones del orden de 1-3%. La gran extensibilidad de la fibroína hace que la misma sea más resistente que los materiales de ingeniería.

**Tabla 1.1.** Comparación de las propiedades mecánicas de distintas fibras naturales y sintéticas utilizadas comúnmente en la actualidad. Adaptada de [135].

<b>Material</b>	<b>Tensión a la rotura (MPa)</b>	<b>Elasticidad (GPa)</b>	<b>% deformación nominal a la rotura</b>	<b>Ref.</b>
<b>Seda <i>B. Mori</i> (c/sericina)</b>	500	5-12	19	[136]
<b>Fibroína de seda <i>B. mori</i></b>	610-690	15-17	4-16	[136]
<b>Seda de araña <i>N. clavipes</i></b>	875-972	11-13	17-18	[137]
<b>Colágeno<sup>a</sup></b>	0.9-7.4	0.0018-0.046	24-68	[138]
<b>Colágeno<sup>b</sup></b>	42-72	0.4-0.8	12-16	[138]
<b>PLA<sup>c</sup></b>	28-50	1.2-3.0	2-6	[139]
<b>Tendón (mayoritariamente colágeno)</b>	150	1.5	12	[140]
<b>Hueso</b>	160	20	3	[140]
<b>Kevlar (49 fibras)</b>	3600	130	2.7	[140]
<b>Fibra de carbono</b>	4000	300	1.3	[140]
<b>Caucho sintético</b>	50	0.001	850	[140]

<sup>a</sup> Fibras extruidas de colágeno tipo I de cola de rata ensayadas después de estirar desde 0% a 50%.

<sup>b</sup> Colágeno de cola de rata entrecruzado y testado después de estirarlo de 0% a 50%.

<sup>c</sup> Ácido poliláctico con pesos moleculares que oscilan entre 50.000 y 300.000 unidades.

Es especialmente notable que los gusanos de seda pueden producir fibras fuertes y rígidas a temperatura ambiente y a partir de una solución acuosa, mientras que los materiales sintéticos con propiedades comparables deben procesarse a elevadas temperaturas altas y/o con disolventes menos benignos. Además, las fibras de polímeros sintéticos normalmente requieren un estiramiento posterior al hilado para garantizar el grado necesario de orientación molecular en su estructura [141]. En cambio, esto no es necesario en el proceso natural de hilado de la seda. Esto se debe a su impresionante secuencia aminoacídica que da lugar a una extraordinaria estructura secundaria polimórfica que se estudiará a continuación.

## 1.8. Estructura de la seda

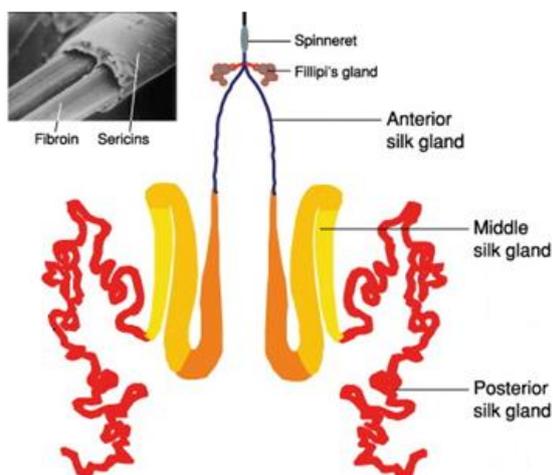
La seda es un biopolímero proteico sintetizado por una gran variedad de lepidópteros y arácnidos en glándulas especializadas. Sin embargo, es importante remarcar que este trabajo se centra en la SF proveniente del gusano de seda *Bombyx mori* de la familia *Bombycidae*, alimentado únicamente a base de hojas de morera (*Morus alba L*). Esto es importante debido a

que la secuencia aminoacídica varía de especie en especie y con ella sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas, las cuales pueden tener grandes implicaciones en diferentes aplicaciones.

Las proteínas de la seda son sintetizadas en una glándula que se extiende por el abdomen del gusano, como se ilustra en la Figura 1.5, y se divide en tres secciones, posterior, media y anterior, tal y como se ilustra en la Figura 1.6. Las células que recubren la glándula posterior secretan la SF, alcanzando una concentración aproximada del 12% en peso. En este momento, la proteína se encuentra en un estado soluble en agua [142], con una estructura secundaria parcialmente ordenada compuesta por estructuras irregulares y giros  $\beta$  tipo II [143], comúnmente conocida como *silk I*. Esta proteína es empujada a la glándula media, donde las células que recubren el lumen secretan las sericinas junto con otros flavonoides (asimilados por los gusanos en la dieta) [144]. La SF y la sericina se concentran al 25% en peso y son impulsadas hacia la glándula anterior donde experimentan gradientes de pH (mantenido a través de la secreción de anhidrasa carbónica por las células) y de fuerza iónica. Estos factores contribuyen a la elongación de la SF (en este punto, 30% en peso) en dos filamentos delgados y promueven la cristalización de dominios repetitivos. Por último, durante el proceso de hilado, la solución proteica no newtoniana es sometida a cristalización inducida por cambios en el pH y fuerza iónica a lo largo de la glándula [145] y por el esfuerzo cortante que genera un frente de presión que se opone al flujo, generando un gradiente de velocidad desde la entrada (0.334 mm/s) hasta la salida (13.8 mm/s) del órgano hilador [146]. Durante todo el proceso, la SF inicialmente secretada con una estructura parcialmente ordenada (*silk I*) sufre una transición a una compuesta mayoritariamente (58%) [147] por láminas  $\beta$  antiparalelas, adoptando una estructura cristalina e insoluble conocida como *silk II* [148,149].

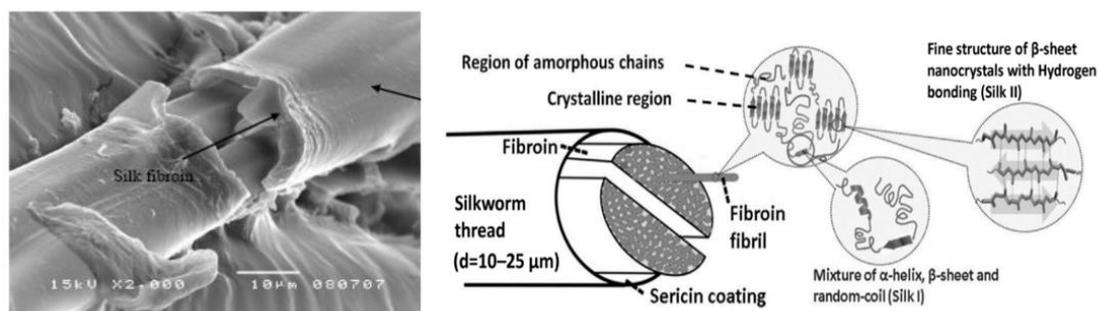


**Figura 1.5.** Anatomía del gusano de seda *Bombyx mori* [150].



**Figura 1.6.** Esquema de la glándula de seda [151]

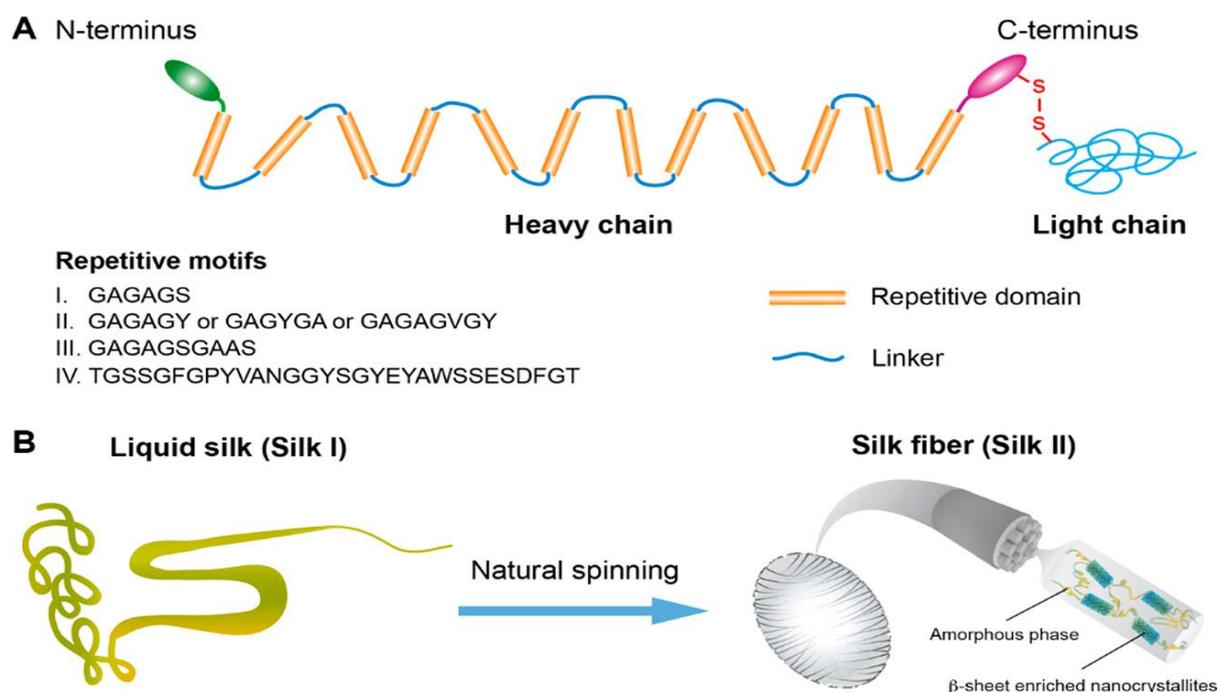
Para entender las formidables propiedades de este biopolímero se debe estudiar su estructura en detalle. Un capullo de seda está compuesto de una única fibra de seda de entre 1000 y 1500 m de longitud con un diámetro de entre 10 y 25  $\mu\text{m}$  [152]. Dicha fibra está compuesta por un núcleo de dos filamentos de fibroína, cada uno de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  recubiertos por una capa de sericinas que mantienen a las fibras unidas, tal como se ilustra en la Figura 1.7 izquierda, aportándole una mayor resistencia al conjunto de la fibra. A su vez, las fibras de fibroína están compuestas por nanofibrillas enrolladas de entre 20 y 25 nm lo que le aporta una mayor resistencia a la tensión [153] (Figura 1.7, derecha).



**Figura 1.7.** Izquierda, Imagen de microscopio electrónico de barrido (aumento de 2.000x) de una fibra de seda, que contiene dos fibras de fibroína recubiertas por sericina [134]. Derecha, representación esquemática de la estructura de la SF. Los recuadros muestran la estructura general de las fibrillas y la alineación de las láminas  $\beta$  antiparalela [154].

La SF, representa aproximadamente un 75% del peso del capullo y es una proteína lineal e insoluble en agua con una alta resistencia tensil. Por otro lado, la sericina, que representa aproximadamente un 25% del peso del capullo, es una proteína globular, soluble en agua cuya función es mantener las fibras de fibroína unidas [155]. La SF está constituida por tres

componentes, una cadena pesada (391 kDa) y una cadena ligera (26 kDa) unidas por un puente disulfuro y una glicoproteína P25 (25-30 kDa) la cual se compleja con las cadenas pesada y ligera en una relación molar 6:6:1 para dar lugar a una mega estructura de 6.3 MDa [156]. En la Figura 1.8 se representa esquemáticamente la estructura primaria de la cadena pesada de la SF. Esta cadena está compuesta por 5.263 aminoácidos divididos en dominios N- y C-terminal, ambos hidrofílicos y 12 dominios hidrofóbicos flanqueados por 11 dominios cortos e hidrofílicos. Los dominios hidrofóbicos contienen secuencias altamente conservadas y repetitivas del tipo GAGAGS, GAGAGY y GAGAGVGY que forman las estructuras de lámina  $\beta$  que, además, son empaquetados en zonas cristalinas [145]. El 86% de los aminoácidos de la cadena pesada de la SF son Glicina (45%), Alanina (29%) y Serina (12%) [157], los cuales, en su mayoría se encuentran en las regiones hidrofóbicas y altamente repetitivas. El gran sesgo que presenta la secuencia primaria de la fibroína hacia aminoácidos con residuos poco voluminosos como Glicina y Alanina promueve la formación de láminas  $\beta$  antiparalelas, que se empaquetan mayoritariamente en las zonas cristalinas.



**Figura 1.8.** Organización de la secuencia aminoacídica dentro de la SF. A) En verde y magenta, se presenta los dominios N- y C-terminal, respectivamente. Las secuencias repetitivas del tipo GAGAGS que dan lugar a los dominios cristalinos de la SF son representados con cilindros naranjas y en azul, las secuencias hidrofílicas que flanquean las regiones cristalinas. B) Esquema representando la transición de seda soluble en agua (*silk I*) a fibras de seda cristalinas después del proceso de biohilado. En la fibra de seda se representan las regiones amorfas (44%) y las regiones cristalinas ricas en láminas  $\beta$  antiparalela (56%) [158].

La estructura secundaria de la SF contiene un total aproximado de 58% de lámina  $\beta$  [147], de la cual aproximadamente el 33% corresponde a láminas  $\beta$  antiparalelas organizadas en estructuras cristalinas. Las fibras de fibroína son generalmente descritas como una matriz de estructuras desordenadas con cristales de lámina  $\beta$  incrustados en ella [158], tal y como se representa en la Figura 1.8B. La red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares aportan la fuerza y la resistencia a latensión al biopolímero, mientras que las regiones amorfas, aportan la flexibilidad y elasticidad [159]. En la bibliografía, existe una gran variabilidad en los tamaños reportados para estos cristales [160–163]. Para ilustrar el tamaño de éstos, se puede hacer referencia a las medidas de difracción de rayos-X y microscopía electrónica de transmisión de bajo voltaje realizadas por Drummy y colaboradores [160]. Estas técnicas han determinado que los cristales dentro de las fibras de fibroína tienen unas dimensiones de 21 x 6 x 2 nm y su eje mayor se encuentra alineado paralelamente con el eje de las fibras.

La estructura secundaria de la SF con conformación *silk II* es extremadamente estable gracias al gran número de enlaces de hidrógeno lo que la vuelve insoluble en la mayoría de los disolventes, incluyendo en condiciones ácidas y alcalinas moderadas. Como el contenido de grupos ácidos y básicos es bajo en la SF, el factor electrostático no es decisivo en la formación de la estructura secundaria, sin embargo, puede ser decisivo en la disolución de la SF. Los métodos de síntesis que implican la disolución de la SF se encuentran recogidos en el **Capítulo 2** de esta Tesis Doctoral. La estructura secundaria de la SF no sólo es relevante en el proceso de síntesis de biomateriales debido a la necesidad de su disolución, sino también por su influencia en las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los biomateriales resultantes. Por ejemplo, Wang y colaboradores [164] prepararon micro y nanopartículas de SF y polivinilpirrolidona para la liberación controlada de fármacos y concluyeron que los perfiles de liberación pueden ser ajustados mediante la modulación de la cantidad de láminas  $\beta$  en la estructura secundaria de la SF. La estructura de la SF será estudiada con más detalle en el **Capítulo 4**.

### 1.9. Biocompatibilidad

La SF es un material atractivo para numerosas aplicaciones biomédicas, ya que, debido a sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas, abarcan aplicaciones tales como la administración de fármacos, la ingeniería de tejidos y dispositivos implantables. Sin embargo, además de las funcionalidades necesarias para aplicaciones específicas, un factor clave necesario para el éxito clínico de cualquier biomaterial son las interacciones apropiadas con el cuerpo *in vivo* o

biocompatibilidad. Dentro de las cuales puede destacarse (i) la respuesta inmunitaria e inflamatoria y (ii) la biodegradabilidad.

### 1.9.1 Respuesta inmunitaria e inflamatoria

Tal y como ya se ha mencionado, la fibra de seda se compone esencialmente de dos proteínas, fibroína y sericina. Mientras la SF es altamente biocompatible [132,133,165] con una baja respuesta inmunológica [108,166], la sericina puede presentar reacciones alérgicas adversas no deseadas [167,168]. Por este motivo, normalmente se elimina mediante distintos procedimientos, conocidos como desgomado [169]. Según el formato del material y la ubicación de la implantación, la SF puede inducir una respuesta inflamatoria leve que disminuye a las pocas horas/días de la implantación [170]. La respuesta implica el reclutamiento y la activación de macrófagos y puede incluir la activación de una respuesta de cuerpo extraño leve con la formación de células gigantes multinucleadas, nuevamente, según el formato del material y la ubicación de la implantación [166]. El número de células inmunes presentes disminuye con el tiempo y el tejido granular, si se forma, es reemplazado por tejido endógeno no fibroso, aunque estas respuestas están reservadas para películas, hidrogeles e implantes óseos [166].

El estudio realizado por Meinel y colaboradores [170], indica que los películas de colágeno implantadas en ratas producen una reacción inflamatoria del tejido más notoria que películas equivalentes preparadas con SF después de 6 semanas. En otro estudio en el que se comparan membranas de SF y membranas de poli (estireno) y poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), Santin y colaboradores [171] demostraron que las primeras presentan una respuesta inmunológica más leve que las segundas. Los resultados indican que a la membrana de SF se unieron niveles más bajos de fibrinógeno que a los dos polímeros sintéticos, mientras que se detectaron las mismas cantidades de fragmento del complemento de plasma humano C<sub>3</sub> e IgG adsorbido. La activación de las células mononucleares por la SF, medida como producción de interleucina 1 $\beta$ , fue menor que la de los materiales sintéticos. Otro estudio indicó que la SF trenzada utilizada para la reconstrucción del ligamento anterior cruzado produce una respuesta inflamatoria leve tras siete días de implantación *in vivo*, mientras que un implante equivalente producido con el polímero biodegradable ácido poliglicólico (PGA) produjo una respuesta más aguda [172]. En este caso, aunque la carga de rotura para el implante PGA resultó el doble que para el injerto de SF, la unión inicial y el crecimiento de las células en el ligamento prostético fue superior en este último.

En el caso de la SF en formato de nanopartículas, la bibliografía no es tan extensa como para otros formatos del mismo material. Como ya fue discutido brevemente en la *sección 3 “Diseño de las nanopartículas”*, estudios de Tan y colaboradores [109] demostraron que nanopartículas recubiertas con SF apenas produjeron respuesta inmunitaria y el sistema inmune adaptativo no fue activado. En otro estudio, Totten y colaboradores [102], utilizaron ensayos *in vitro* y metabolómicos basados en resonancia magnética nuclear para examinar el fenotipo inflamatorio y los perfiles metabólicos de los macrófagos después de su exposición a SFN PEGiladas y no modificadas. Los macrófagos internalizaron ambos tipos de nanopartículas, pero mostraron diferentes respuestas fenotípicas y metabólicas. Las SFN sin modificar indujeron la regulación positiva de varios procesos, incluida la producción de mediadores proinflamatorios (como citoquinas), la liberación de óxido nítrico y la promoción de la actividad antioxidante. Estas respuestas estuvieron acompañadas de cambios en los perfiles metabolómicos de los macrófagos que fueron consistentes con un estado proinflamatorio y que indicaron un aumento de la glucólisis y reprogramación del ciclo del ácido tricarboxílico y la vía de la creatinina/fosfocreatina. Por el contrario, las SFN PEGiladas indujeron cambios más leves en los perfiles inflamatorios y metabólicos, lo que sugiere que la inmunomodulación de macrófagos con SFN es dependiente de la PEGilación. Esto indicaría que la PEGilación de SFN reduce las respuestas inflamatorias y metabólicas iniciadas por los macrófagos. En un estudio reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación [92], las líneas celulares cancerígenas de cuello de útero (HeLa) y células humanas endoteliales de cordón umbilical (EA.hy926) fueron incubadas *in vitro* con hasta 250 µg/mL de SFN con un tamaño de *ca.* 160 nm. La viabilidad fue estudiada mediante ensayos de reducción de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) tetrazolio y los resultados no mostraron variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. En el caso de micropartículas (10-200 µm) de SF preparadas por digestión enzimática, Panilaitis y colaboradores [168] hallaron que la suspensión de las partículas indujo una liberación significativa de citoquinas TNF. En contraste, los macrófagos cultivados en presencia de fibras de SF no regularon al alza los niveles de transcripción para una amplia gama de citoquinas proinflamatorias en un grado significativo. La combinación de resultados de estos dos estudios podría indicar que la respuesta inmunitaria es dependiente del tamaño del biomaterial, excluyendo a los materiales en la nanoescala y la macroescala, pero no en la microescala.

Estudios recientes indican que nanopartículas cargadas con resveratrol han mostrado propiedades inmunomoduladoras y efectos antiinflamatorios en modelos murinos con enfermedad intestinal inflamatoria [173] y periodontal [174]. En otro estudio similar [175], se

realizaron tratamientos con SFN funcionalizadas con el péptido lineal arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y se observó que reducía el daño colónico en ratas, reducían la infiltración de neutrófilos y mejoraban el estado oxidativo comprometido del colon. También se comprobó que solo las ratas tratadas con RGD-SFN mostraban una reducción significativa en la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias (interleucina-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) y óxido nítrico sintasa inducible en comparación con el grupo de control tratado con TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico). Además, la expresión tanto del quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas-1 como de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 disminuyó significativamente con el tratamiento con RGD-SFN.

### 1.9.2 Degradación de la fibroína de seda *in vivo*

Las fibras de SF implantadas en el cuerpo humano retienen más del 50% de sus propiedades mecánicas después de 60 días, por lo que la Farmacopea Norteamericana cataloga este material como no biodegradable [176]. Sin embargo, la velocidad a la que la SF se degrada depende del tamaño del material implantado, su morfología, condiciones mecánicas y biológicas del lugar de implantación, la estructura secundaria de la proteína y la distribución del peso molecular de las cadenas de SF. Particularmente, para la aplicación de las SFN al transporte de fármacos, se deben tener en cuenta fundamentalmente tres de estos parámetros: (i) el tamaño, (ii) la distribución del peso molecular y (iii) la estructura secundaria de la proteína. Pero antes de analizar cada una de ellas, se discutirán las posibles vías de degradación de la SF para posteriormente mencionar cómo estos parámetros son capaces de influenciar la degradación.

La SF por ser una proteína, exhibe degradación frente a proteasas capaces de degradar los enlaces amida incluyendo  $\alpha$ -quimiotripsina, colagenasa IA, proteasa XIV y metalo proteasas [177–179]. Los residuos del proceso de degradación son los aminoácidos correspondientes de las proteínas, por lo que son fácilmente absorbidos *in vivo* y no generan toxicidad. La hidrólisis parcial de la proteína por las enzimas en pequeños fragmentos tampoco es un problema, debido a que éstos pueden ser fácilmente fagocitados por macrófagos [168]. En un estudio realizado por Li y colaboradores [178] se observó que el peso molecular medio de los productos de películas de SF después de la degradación con las tres enzimas siguió el orden proteasa XIV > colagenasa IA >  $\alpha$ -quimiotripsina. El mecanismo de degradación se basa en un proceso de dos etapas, basado en que las enzimas encuentren dominios de unión en la superficie de los materiales y su posterior hidrólisis [180]. De esta manera, distintas enzimas tienen diferentes resultados para la degradación de diferentes estructuras dentro de la SF. Por ejemplo, la quimiotripsina se ha utilizado para degradar las regiones amorfas de la SF y obtener SF

altamente cristalizada [178]. La colagenasa degrada preferentemente el contenido de la láminas  $\beta$  en los hidrogeles [177]. Por otro lado, tras la incubación de SF con Proteasa XIV se encontró que la masa se redujo significativamente [178]. Brown y colaboradores [177] concluyen que la capacidad de las enzimas para descomponer un biomaterial no sólo depende de que los sitios de escisión estén presentes en la estructura primaria de la proteína, sino que también la estructura secundaria y el formato del material juegan un papel fundamental. Esto indica que la degradabilidad de la SF puede ser modulada mediante el control de la abundancia relativa de sus estructuras secundarias. De esta forma, por ejemplo, al reducir el contenido de estructuras altamente cristalinas de láminas  $\beta$  apiladas, puede acelerarse la degradación, ya que tanto la Proteasa XIV como la quimotripsina pueden actuar simultáneamente en estas zonas. De aquí el interés e importancia de estudiar dicha estructura que constituye la base del **Capítulo 4**.

En un estudio realizado por Horan y colaboradores [176] se concluyó que fibras electrohiladas presentan una degradación predecible y dependiente del diámetro de las fibras. De modo que, como es de esperar, al disminuir el diámetro y, por ende, aumentar la relación superficie/volumen, la degradación se produce a mayor velocidad. La disminución del tamaño desde fibras macroscópicas a nanopartículas claramente aumenta aún más esta relación, lo que permite un mayor acceso a la degradación enzimática y fagocitosis por macrófagos. La degradación de SFN con y sin funcionalización con PEG por enzimas proteolíticas (proteasa XIV y  $\alpha$ -quimotripsina) y papaína, así como la proteasa de cistina, fueron estudiadas por Wongpinyochit y colaboradores [181]. Ambas clases de partículas presentaron similares patrones de degradación en un periodo de 20 días, estableciéndose el orden de degradación de las partículas por medio de las enzimas como: Proteasa XIV > papaína >>  $\alpha$ -quimotripsina. Los autores reportan que, al cabo de 1 día, las SFN y SFN-PEG incubadas con Proteasa XIV perdieron el 60 y 40 % de su masa, respectivamente, reduciendo en el contenido de estructura secundaria amorfa. En contraste, 10 días de incubación fueron necesarios para conseguir degradaciones similares con papaína y 20 con  $\alpha$ -quimotripsina. Las SFN también fueron expuestas a una mezcla compleja de enzimas lisosomales de hígado de rata *ex vivo*, encontrándose que las SFN perdieron un 45% de su masa en 5 días.

Por último, cabe destacar que las modificaciones en la distribución de pesos moleculares de las cadenas de SF pueden alterar la velocidad de degradación [182]. Una disminución del peso molecular puede alterar el orden de entrecruzamiento entre los polímeros y potencialmente resultar en una degradación más rápida [183]. Por este motivo, la purificación y posterior procesamiento de la SF no sólo afecta a las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de

los biomateriales resultantes [184] (como se explicará con más detalle en el **Capítulo 3**), sino que también pueden ser utilizados para modular su biodegradabilidad.

### 1.10. Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda

Las partículas de SF de seda pueden ser producidas desde el enfoque *top-down*, así como *bottom-down*. El primero de estos involucra la molienda de las fibras de SF para reducir su tamaño. Esto puede lograrse a través de molienda con bolas [185,186], fresado de cuentas [187], por chorro de aire [188] así como irradiando el material con un haz de electrones [189]. Sin embargo, estos métodos suelen producir partículas en el rango de los micrómetros y con una distribución de tamaños amplia, por lo que en el resto de esta sección nos centraremos en el enfoque *bottom-up* el cual ofrece un mayor control sobre las partículas producidas. Como se mencionó al comienzo de este capítulo, el enfoque *bottom-up* se basa en el auto ensamblado de las unidades más pequeñas que componen una nanopartícula. En el caso particular de las SFN, se disuelve en primer lugar la fibra de SF para obtener sus unidades constituyentes individuales y, posteriormente, tienen lugar su reensamblado en formato de nanopartículas. Esto es logrado normalmente mediante un proceso de desolvatación, el cual puede conseguirse de diferentes formas que se expondrán en esta sección junto con algunos ejemplos; pero antes se tratará la disolución de la SF, la cual no es tarea fácil debido a su alta estabilidad estructural y que merece un análisis detallado que será expuesto a continuación.

#### 1.10.1 Solubilización de la fibroína de seda

La preparación de la mayoría de los biomateriales depende de conseguir una completa disolución de SF. Este proceso ha sido referido por algunos autores como ingeniería inversa [190], ya que se intenta obtener SF soluble en agua con estructura *silk I*, partiendo de fibras con estructura *silk II*. Sin embargo, solo un número limitado de disolventes son capaces de disolver la SF. Ejemplos de estos son fuertes disoluciones ácidas (fosfórico, fórmico, sulfúrico, hidrocórico) o disoluciones acuosas/orgánicas concentradas en sales (LiCNS, LiBr, CaCl<sub>2</sub>, Ca(CNS)<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>CNS, CuSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) [191–197]. La dificultad de la disolución de las fibras de SF se debe a la presencia de la gran red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y su alta cristalinidad derivadas de su estructura secundaria como fue expuesto en la *sección 1.8 “Estructura de la seda”*.

En general, en la bibliografía se describe la disolución de la SF en disoluciones concentradas de sales como un proceso en dos etapas [191,194]. En la primera, la estructura

compacta y cristalina de las fibras de SF se hincha debido a la difusión de las moléculas de disolvente. En la segunda, comienza la dispersión de las moléculas de SF debido al colapso de la interacción intermolecular y su consecuente disolución [194]. Durante la disolución, las secciones amorfas con alto contenido de aminoácidos con residuos masivos o grupos polares se disuelven primero. Los cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) forman complejos quelatos estables con grupos hidroxilo de las cadenas laterales de serina y tirosina y también con el oxígeno de los carbonilos, rompiendo los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas polipeptídicas resultando en la disolución de la proteína que adopta una estructura *silk I* [195,197,198].

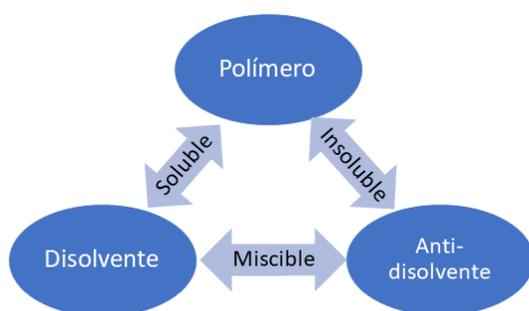
El proceso de disolución descrito depende de que se alcance una alta concentración de sales. Esto conlleva ciertas desventajas, debido a que para la eliminación de estas se necesita una diálisis exhaustiva (72 h) que requiere 6 litros de agua destilada por cada 12 mL de disolución [191]. Además, las disoluciones obtenidas son inestables y tienden a gelificar en un período de pocos días. Como alternativa, cuando se desea almacenar la SF a largo plazo, las disoluciones acuosas de SF pueden ser liofilizadas y posteriormente disueltas en disolventes orgánicos como el hexafluoroisopropanol [191] en el momento en que vayan a usarse. Sin embargo, estos disolventes son tóxicos y extremadamente corrosivos por lo que requieren especial cuidado en su manipulación [199].

Recientemente, los líquidos iónicos han surgido como una alternativa para disolver la SF [200] aportando numerosas ventajas con respecto a los métodos tradicionales [191,192]. En primer lugar, la presión de vapor insignificante y la fácil reciclabilidad de los líquidos iónicos los convierten en una alternativa más "ecológica" que los disolventes orgánicos [201–203]. Segundo, la posibilidad de obtener altas concentraciones de SF en una disolución estable (hasta un 25% p/p en algunos líquidos iónicos [204]). Las disoluciones de SF en líquidos iónicos son más estables debido a que las regiones hidrofóbicas (secuencias GAGAGS o GAGAGAGS altamente conservadas) son estabilizadas por las cadenas alquilo de cationes como el imidazolio [205]. Por otro lado, el anillo imidazolio cargado y voluminoso se orienta hacia el exterior ejerciendo fuerzas de repulsión electrostáticas entre los bloques hidrofóbicos e impidiendo la transición de *silk I* a *silk II* mediante la formación de las láminas  $\beta$ . De acuerdo con Wang y colaboradores [205], disoluciones de SF en cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio pueden ser estables en periodos superiores al año y medio. Tercero, la facilidad con la que se puede disolver la SF. De acuerdo con el método descrito por Lozano-Pérez y colaboradores [204], mediante la utilización de ultrasonidos, la completa disolución de SF puede ser

alcanzada en pocos minutos en comparación con las varias horas necesarias en los métodos tradicionales [191,192].

### 1.10.2 Regeneración de la fibroína en nanopartículas

Los procesos de síntesis de nanopartículas en un enfoque *bottom-up* conllevan la disolución de la SF en sus unidades poliméricas constituyentes y su posterior regeneración en nanopartículas. Esta regeneración es normalmente llevada a cabo mediante un proceso de desolvatación en un “antisolvente”, proceso normalmente referido como antisolvatación. Como se muestra en el esquema de la Figura 1.9, en el proceso de síntesis de nanopartículas por antisolvatación se encuentran tres componentes claves, el polímero, el disolvente y el antidisolvente. Son condiciones necesarias que: (i) el disolvente y el antidisolvente sean miscibles en las condiciones del proceso, mientras que (ii) el soluto debe ser insoluble en la mezcla disolvente/antisolvente. De esta manera, al mezclar la disolución del polímero, el antidisolvente secuestrará las moléculas que solvatan a este conduciendo a su agregación. Mediante controles cinéticos y termodinámicos se puede conseguir que un número limitado de unidades poliméricas se agreguen, formando de esta manera nanopartículas. En la práctica, la preparación de nanopartículas por antisolvatación puede alcanzarse mediante distintas técnicas que básicamente varían en la metodología de mezclar la disolución del polímero y el antidisolvente o la naturaleza de este último. Describiremos algunos de los métodos más representativos de la bibliografía a continuación.



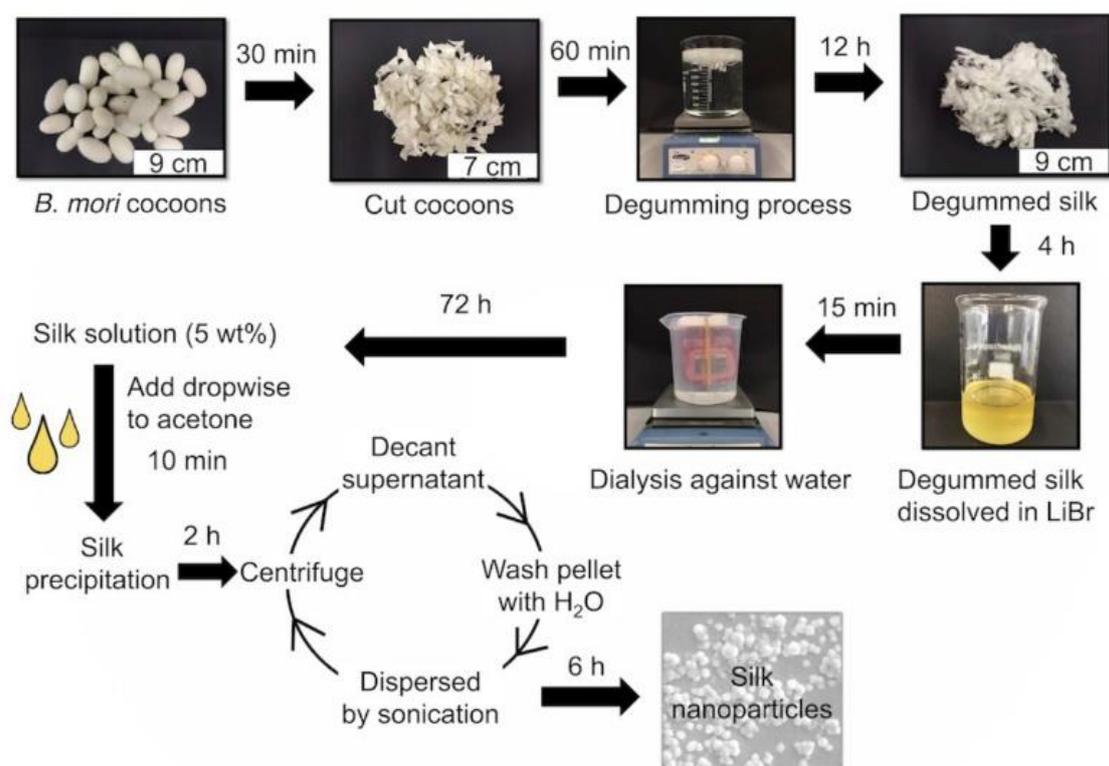
**Figura 1.9.** Componentes clave en el proceso de antisolvatación.

### 1.10.3 Antisolvatación en disolventes orgánicos

Probablemente uno de los métodos más utilizados debido a su sencillez y sus buenos resultados es la adición de la disolución de SF a solventes orgánicos polares miscibles con

agua, los cuales actúan como antidisolvente al iniciar la transición de *silk I* a *silk II* mediante la formación de láminas  $\beta$  [102,116,204,206–209]. Cabe destacar que la variante inversa, donde el antidisolvente es agregado a la disolución de SF también es encontrada frecuentemente en la bibliografía [210–212].

Como ejemplo veamos el proceso publicado por Wongpinyochit y colaboradores [209]. Para disolver la SF, los autores agregan las fibras a una disolución de LiBr 9.3M manteniéndolas en agitación durante 4 horas a 60 °C. Posteriormente, la disolución es dializada durante 72 horas y centrifugada para eliminar residuos insolubles. Posteriormente, la concentración de SF es ajustada a 5% p/v y es agregada gota a gota (10  $\mu$ l/gota a una velocidad de 50 gotas/min) a acetona bajo agitación fuerte, siendo el volumen de acetona mayor del 75% del volumen final de ambos líquidos. Una suspensión blanca es formada inmediatamente al contacto de ambos líquidos indicando la formación de las nanopartículas. Las partículas son lavadas y recolectadas mediante centrifugación. El proceso global es ilustrado en la Figura 1.10. Un diámetro medio de *ca.* 100 nm y un potencial-Z de -50mV (en agua destilada) es obtenido para las partículas sintetizadas.



**Figura 1.10.** Esquema ilustrando las etapas clave para generar una disolución y obtener SFN descrito por Wongpinyochit y colaboradores [209].

Una forma de optimizar el proceso de síntesis de nanopartículas es reducir el tiempo de mezclado entre la disolución de SF y el antidisolvente [213]. Esto se consigue mediante la reducción del tamaño de las gotas de disolución de SF (aumento relación superficie/volumen) que entran en contacto con el antidisolvente, favoreciendo la transferencia de masa [213]. En nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado un método que utiliza un inyector coaxial donde la disolución de SF fluye por el centro y nitrógeno a presión recorre el cilindro concéntrico, logrando producir un aerosol con gotas de tamaño muy reducido [46,92].

#### 1.10.4 Antisolvatación en Fluidos Supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. En estas condiciones, la sustancia presenta propiedades híbridas entre un líquido y un gas, es decir, puede difundir como un gas, y disolver sustancias como un líquido [214]. Suponiendo que la sustancia a utilizar como fluido supercrítico cumple con las condiciones descritas al comienzo de esta sección, la misma puede actuar como antidisolvente en un proceso de antisolvatación. En este caso, el proceso se denomina como antisolvatación supercrítica (SAS, de sus siglas en inglés *supercritical antisolvent*). Particularmente, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) resulta una, si no la más utilizadas sustancias como fluido supercrítico debido a sus moderadas condiciones críticas ( $T = 304 \text{ K}$  y  $P = 7.38 \text{ MPa}$ ), inocuidad hacia el operario y el medio ambiente, así como su económica obtención y operación [214].

El proceso SAS es ampliamente conocido y se ha utilizado para la preparación de SFN [215–217]. SAS también se conoce con otras siglas: *Aerosol Solvent Extraction System* (ASES), *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids* (SEDS), *Supercritical AntiSolvent with Enhanced Mass transfer* (SAS-EM) [218]. La principal diferencia entre estos procesos está en el dispositivo de la inyección de la disolución y el  $\text{CO}_2$ . En el caso de los procesos SAS y ASES, la solución líquida es inyectada en el reactor de precipitación a través de una boquilla micrométrica, en el caso del proceso SEDS, la boquilla es coaxial; mientras que, el proceso SAS-EM utiliza una superficie deflectora que vibra a frecuencias ultrasónicas para mejorar la atomización de la solución [218].

Este método puede ser ejemplificado con el proceso expuesto por Xie y colaboradores [215] para la preparación de SFN cargadas con curcumina mediante SEDS. Brevemente, la SF liofilizada en estado *silk I* es disuelta en hexafluoroisopropanol junto con curcumina. La disolución es posteriormente inyectada a un reactor de precipitación que contiene  $\text{CO}_2$  a 20 MPa el cual actuará como antidisolvente de la SF. Después de la completa inyección de la

## Capítulo 1

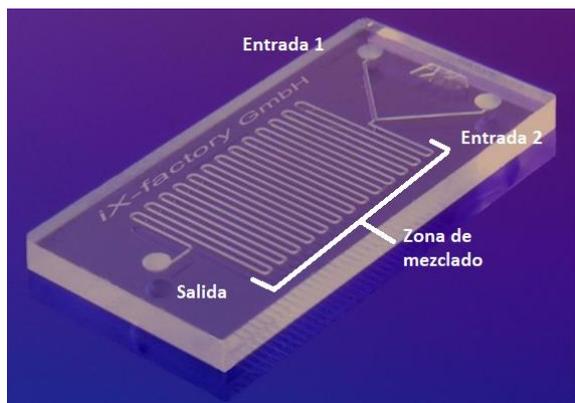
disolución, se mantiene un flujo constante de CO<sub>2</sub> para eliminar el hexafluoroisopropanol del reactor de precipitación. Finalmente, el reactor es despresurizado y abierto para la recolección de las nanopartículas. El proceso produce nanopartículas con un diámetro medio inferior a 100 nm.

### *1.10.5 Electropulverización*

La electropulverización es una técnica en la que una diferencia de potencial eléctrico es aplicada entre la boquilla de un inyector y un colector, el cual puede contener un líquido que actúe como antidisolvente [219]. En esta técnica, la superficie del líquido que sale de un capilar sometido a las tensiones eléctricas se deforma en un inyector alargado que produce inicialmente una serie de gotas de tamaño micrométrico. Debido a que las gotas se encuentran cargadas, las fuerzas repulsivas rompen cada gota en un grupo de gotas más pequeñas en un proceso llamado explosión culómbica [219]. Utilizando esta técnica para pulverizar una disolución de SF sobre un papel de aluminio, Gholami y colaboradores [220] han logrado sintetizar SFN de hasta 80 nm de promedio. Los autores muestran que las concentraciones más bajas, velocidades de alimentación más bajas y distancias más largas entre la aguja y el colector conducen a una disminución del tamaño medio de partícula. El aumento del voltaje hasta 20 kV disminuye el tamaño de las partículas, pero voltajes superiores a este producen un incremento en el tamaño de partícula.

### *1.10.6 Microfluidos*

Equipos de microfluidos también pueden ser utilizados para la preparación de nanopartículas. Los equipos de microfluidos son dispositivos, generalmente del tamaño de milímetros/centímetros que contienen microcapilares especialmente diseñados para mezclar fluidos [221,222]. Una imagen representativa de estos se muestra en la Figura 1.11. Estos equipos permiten una manipulación precisa de líquidos (como la disolución de seda y el antidisolvente) mediante el control de los parámetros del proceso, como el caudal total, las relaciones de velocidad entre diferentes líneas de inyección, etc. Las mayores ventajas aportadas por estos equipos son la posibilidad de producir partículas en flujo continuo y con una distribución de tamaños estrecha.



**Figura 1.11.** Chip de microfluidos fabricado en vidrio. Los canales tienen 50  $\mu\text{m}$  de profundidad y 150  $\mu\text{m}$  de ancho [223].

Wongpinyochit y colaboradores [190] han utilizado un equipo de microfluidos comercial para mezclar una disolución de SF al 3% p/p con acetona o isopropanol como antidisolvente. Mediante el uso de distintas condiciones de mezclado, los autores fueron capaces de controlar el tamaño final de las nanopartículas obtenidas que varió entre 110 y 310 nm, con índices de polidispersidad y potencial-Z entre 0.1/0.25 y -20/-30 mV, respectivamente.

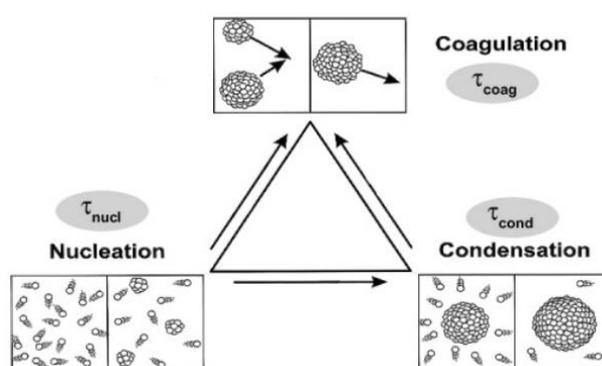
#### 1.10.7 *Salting-out*

La separación de fases también se ha utilizado para la preparación de nanopartículas mediante el método de precipitación salina (*salting-out*). Por ejemplo, mediante la adición de fosfato de potasio a una disolución de SF, Lammel y colaboradores [224] prepararon partículas de SF con tamaños que varían entre los 500 y 2000 nm dependiendo de la concentración inicial de SF en disolución. Los autores muestran que, para la formación de nanopartículas, se requiere una concentración de sal mayor a 750 mM, de lo contrario, la solución gelifica.

### 1.11. Mecanismo de formación de nanopartículas en procesos de antisolvatación

Después de haber expuesto algunos de los métodos de síntesis es oportuno mencionar el mecanismo por el cual la antisolvatación es capaz de generar partículas de tamaños nanométricos. Con el mezclado de la disolución de SF y el antidisolvente se produce una sobresaturación que lleva a la separación de fases (precipitación). El mecanismo puede dividirse en dos pasos, ocurriendo primero una etapa de nucleación impulsada por la sobresaturación y posteriormente una de crecimiento. El crecimiento puede darse por dos mecanismos: (i) de coagulación en el que los núcleos de partículas convergen para formar una

partícula más grande o (ii) condensación en el que las unidades poliméricas se añaden a núcleos en crecimiento. Esto es ejemplificado en la Figura 1.12. La condensación disminuye la sobresaturación al reducir la masa de soluto en la mezcla y, por lo tanto, compite con la nucleación. La coagulación puede reducir la tasa de condensación al reducir el número total de partículas y, por lo tanto, el área superficial [225]. La sobresaturación influye en las tasas de nucleación y crecimiento en diferentes grados. La tasa de nucleación depende de la sobresaturación que la tasa de condensación. Las tasas de nucleación altas ofrecen el potencial de producir una gran cantidad de partículas submicrométricas en la suspensión final si el crecimiento puede ser controlado. Este proceso puede ser comparado con la formación de cristales en el orden de milímetros para cristalografía de rayos-X cuando se busca obtener un bajo número de núcleos y mayor crecimiento en procesos de nucleación lentos.



**Figura 1.12.** Esquema representando el mecanismo de precipitación por nucleación y crecimiento de partículas por coagulación y condensación [225]

La clave para generar una rápida nucleación es alcanzar una rápida sobresaturación. Este proceso estará directamente influenciado por el mezclado y la separación de fases que puede representarse con el número de Damköhler ( $Da$ ) definido como la relación entre el tiempo de mezcla ( $\tau_{mix}$ ) y el tiempo total de precipitación ( $\tau_{prec.}$ ):

$$Da = \frac{\tau_{mix}}{\tau_{prec.}} \quad (1.1)$$

En condiciones pobres de mezclado,  $\tau_{mix}$  es grande (al igual que  $Da$ ) y la velocidad de nucleación es lenta en relación con la velocidad de crecimiento, lo que da lugar a partículas grandes y distribuciones de tamaño amplias. A medida que la  $\tau_{mix}$  se reduce con respecto a la  $\tau_{prec.}$ , una mayor sobresaturación y una nucleación más rápida son alcanzadas dando lugar a partículas más pequeñas con estrechas distribución de tamaños estrechas [213].

El  $\tau_{mix}$  puede reducirse disminuyendo el tamaño de las gotas (aumenta la relación superficie/volumen) de disolución de SF que entran en contacto con el antidisolvente, favoreciendo la transferencia de masa. La reducción del tamaño de la gota se alcanza normalmente mediante el aumento del número de Reynolds que produce un flujo turbulento y, por lo tanto, resulta en una fragmentación del chorro de disolución. De hecho, este es el objetivo de los métodos propuestos anteriormente como el inyector coaxial [46,92], SEDS [215], electrospray [220] y equipos de microfluidos [190].

De acuerdo con la ecuación 1.1, otra estrategia para reducir  $D_a$  consiste en incrementar el  $\tau_{prec.}$ . Esto puede lograrse mediante la adición de estabilizadores que interaccionen con las unidades poliméricas generando impedimentos estéricos que retarden el crecimiento por condensación y coagulación [213]. De acuerdo con Matteucci y colaboradores [213], agregar estabilizadores al antidisolvente es más efectivos para prevenir el crecimiento de las partículas que agregarlos a la disolución del polímero. Esto se debe a que, cuando se colocan en el antidisolvente, los agentes estabilizadores están más disponibles para interaccionar con las unidades poliméricas, ya que no necesitan difundirse a través de la interfase desde la fase acuosa global a la fase orgánica.

La temperatura es otro factor importante de control cinético para la preparación de nanopartículas por antisolvatación que afecta a la formación de partículas de diferentes formas. En primer lugar, un aumento de la temperatura conlleva un aumento de la solubilidad del polímero y por ende reduce el grado de supersaturación al mezclar las disoluciones, favoreciendo una nucleación lenta. En segundo lugar, las temperaturas elevadas aumentan la cinética de difusión y crecimiento en la interfase de la capa límite de partículas. Y en tercer lugar, una mayor solubilidad también aumenta la velocidad de maduración de Oswald [226]. Por estos motivos, una temperatura reducida en la etapa de precipitación es preferible para la formación de nanopartículas pequeñas.

## 1.12. Carga de fármacos en nanopartículas

La carga de los fármacos puede realizarse principalmente mediante dos procedimientos, (i) durante el proceso de formación de la nanopartícula o (ii) *a posteriori* mediante la adsorción/absorción del fármaco en la superficie de la nanopartícula. El primero consiste en añadir el fármaco a la disolución del polímero (matriz de la nanopartícula) [46] o al antidisolvente [227] previamente a la mezcla de ambos. Este procedimiento suele conocerse como coprecipitación, debido a que se precipita el polímero y el fármaco. En contraste con este

método, la adsorción del fármaco a la superficie de la nanopartícula puede lograrse mediante la incubación de las nanopartículas en una disolución del fármaco. Estos métodos presentan ventajas y desventajas. Por un lado, el primer método suele ser más sencillo, debido a que la carga y la preparación de la nanopartícula se realiza en un solo paso. Sin embargo, este proceso podría afectar a la formación de la nanopartícula y, por tanto, el segundo método podría resultar preferencial. Por otro lado, deben considerarse los perfiles de liberación del fármaco. Como demostraron Montalbán y colaboradores [46], partículas cargadas por coprecipitación presentan perfiles de liberación más lentos en comparación con partículas cargadas por adsorción. Lo cual resulta lógico ya que, en el último, el fármaco se encuentra en la superficie de la nanopartícula y fácilmente disponible al medio.

La carga del fármaco y la eficacia de encapsulación dependen de las interacciones fármaco-polímero y la presencia de grupos funcionales (es decir, hidroxilos, carboxilo, etc.) en ambos. Montalbán y colaboradores [228] utilizaron métodos computacionales como *blind docking* y simulaciones de dinámica molecular para estudiar las interacciones de distintos fármacos con SFN. Los autores encontraron una fuerte correlación entre las interacciones fármacos-SF y el contenido de carga de los mismo. Del mismo modo, los fármacos con interacciones más débiles presentaron mayor velocidad de liberación y mayor porcentaje de liberación del fármaco cargado.

## Referencias

1. L Zhang, FX Gu, JM Chan, AZ Wang, R.L. and O.F. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Educ. Policy Anal. Arch.* 2007, 8, 761–769.
2. van der Meel, R.; Sulheim, E.; Shi, Y.; Kiessling, F.; Mulder, W.J.M.; Lammers, T. Smart cancer nanomedicine. *Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 1007–1017.
3. Jain, R.K.; Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Publ. Gr.* 2010, 7, 653–664.
4. Dogra, P.; Butner, J.D.; Ruiz Ramírez, J.; Chuang, Y.; Nouredine, A.; Jeffrey Brinker, C.; Cristini, V.; Wang, Z. A mathematical model to predict nanomedicine pharmacokinetics and tumor delivery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020, 18, 518–531.
5. Schaming, D.; Remita, H. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Found. Chem.* 2015, 17, 187–205.
6. Reibold, M.; Paufler, P.; Levin, A.A.; Kochmann, W.; Pätzke, N.; Meyer, D.C. Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 2006, 444, 286–286.
7. Feynman, R.P. *There's plenty of room at the bottom*; Gilbert, ed H., Ed.; New York: Reinhold Publishing Corp, 1961;
8. Taniguchi, N. On the basic concept of nanotechnology. *Proceeding ICPE* 1974.
9. Faraday, M. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. London* 1857, 147, 145–181.
10. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 1908, 330, 377–445.
11. Richard Zsigmondy Properties of colloids. *Nobel Lect.* 1926, 1, 1.
12. Drexler, K.E. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981, 78, 5275–5278.
13. Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986, 46, 6387–6392.
14. Youn, Y.S.; Bae, Y.H. Perspectives on the past, present, and future of cancer nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018.
15. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 2016, 33, 2373–2387.
16. Global Industry Analysts, I. *Nanotechnology in Drug Delivery - Global Market Trajectory & Analytics*; 2020;
17. Jain, P.K.; ElSayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* 2007, 2, 18–29.
18. Anderson, S.D.; Gwenin, V. V.; Gwenin, C.D. Magnetic Functionalized Nanoparticles for Biomedical, Drug Delivery and Imaging Applications. *Nanoscale Res. Lett.* 2019, 14, 1–16.

## Capítulo 1

19. Sharma, A.; Goyal, A.K.; Rath, G. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. *J. Drug Target.* 2018, 26, 617–632.
20. Malekzad, H.; Sahandi Zangabad, P.; Mirshekari, H.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Noble metal nanoparticles in biosensors: recent studies and applications. *Nanotechnol. Rev.* 2017, 6, 301–329.
21. O’Neal, D.P.; Hirsch, L.R.; Halas, N.J.; Payne, J.D.; West, J.L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* 2004, 209, 171–176.
22. Vines, J.B.; Yoon, J.-H.; Ryu, N.-E.; Lim, D.-J.; Park, H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.* 2019, 7, 167.
23. Jain, P.K.; Huang, X.; El-Sayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1578–1586.
24. Cao, X.; Ye, Y.; Liu, S. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal. Biochem.* 2011, 417, 1–16.
25. Libutti, S.K.; Paciotti, G.F.; Byrnes, A.A.; Alexander, H.R.; Gannon, W.E.; Walker, M.; Seidel, G.D.; Yuldasheva, N.; Tamarkin, L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 6139–6149.
26. Coyne, D.W. Ferumoxytol for treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009, 10, 2563–2568.
27. Abo-zeid, Y.; Ismail, N.S.; McLean, G.R.; Hamdy, N.M. A molecular docking study repurposes FDA approved iron oxide nanoparticles to treat and control COVID-19 infection. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020, 153, 105465.
28. Schrand, A.M.; Rahman, M.F.; Hussain, S.M.; Schlager, J.J.; Smith, D.A.; Syed, A.F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 2010, 2, 544–568.
29. Park, S.; Lee, Y.K.; Jung, M.; Kim, K.H.; Chung, N.; Ahn, E.K.; Lim, Y.; Lee, K.H. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. In *Proceedings of the Inhalation Toxicology*; Taylor & Francis, 2007; Vol. 19, pp. 59–65.
30. Sengupta, J.; Ghosh, S.; Datta, P.; Gomes, A.; Gomes, A. Physiologically Important Metal Nanoparticles and Their Toxicity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014, 14, 990–1006.
31. Yildirim, L.; Thanh, N.T.K.; Loizidou, M.; Seifalian, A.M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today* 2011, 6, 585–607.
32. Teleanu, D.; Chircov, C.; Grumezescu, A.; Volceanov, A.; Teleanu, R. Impact of Nanoparticles on Brain Health: An Up to Date Overview. *J. Clin. Med.* 2018, 7, 490.
33. Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* 2015, 10, 975–999.
34. Bangham, A.D.; Horne, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 1964, 8, 660-IN10.

35. Cattel, L.; Ceruti, M.; Dosio, F. From conventional to stealth liposomes: A new frontier in cancer chemotherapy. *J. Chemother.* 2004, 16, 94–97.
36. Chung, Y.H.; Beiss, V.; Fiering, S.N.; Steinmetz, N.F. COVID-19 Vaccine Frontrunners and Their Nanotechnology Design. *ACS Nano* 2020, 14, 12522–12537.
37. Shin, M.D.; Shukla, S.; Chung, Y.H.; Beiss, V.; Chan, S.K.; Ortega-Rivera, O.A.; Wirth, D.M.; Chen, A.; Sack, M.; Pokorski, J.K.; et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nat. Nanotechnol.* 2020, 15, 646–655.
38. Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63, 131–135.
39. Zamboni, W.C. Concept and Clinical Evaluation of Carrier-Mediated Anticancer Agents. *Oncologist* 2008, 13, 248–260.
40. Juliano, R.L.; Stamp, D. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs. *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27, 21–27.
41. Daemen, T.; Hofstede, G.; Ten Kate, M.T.; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M.; Scherphof, G.L. Liposomal doxorubicin-induced toxicity: Depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *Int. J. Cancer* 1995, 61, 716–721.
42. Shegokar, R.; Müller, R.H. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.* 2010, 399, 129–139.
43. Junghanns, J.U.A.H.; Müller, R.H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int. J. Nanomedicine* 2008, 3, 295–309.
44. Sato, M.; Sambito, M.A.; Aslani, A.; Kalkhoran, N.M.; Slamovich, E.B.; Webster, T.J. Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium. *Biomaterials* 2006, 27, 2358–2369.
45. Jawahar, N.; Meyyanathan, S. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *Int. J. Heal. Allied Sci.* 2012, 1, 217.
46. Montalbán, M.; Coburn, J.; Lozano-Pérez, A.; Cenis, J.; Villora, G.; Kaplan, D. Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* 2018, 8, 126.
47. Nagaich, U. Polymeric nanocapsules: An emerging drug delivery system. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2018, 9, 65.
48. Zabihi, F.; Xin, N.; Jia, J.; Chen, T.; Zhao, Y. High yield and high loading preparation of curcumin-PLGA nanoparticles using a modified supercritical antisolvent technique. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014, 53, 6569–6574.
49. Teixeira, M.; Pedro, M.; Nascimento, M.S.J.; Pinto, M.M.M.; Barbosa, C.M. Development and characterization of PLGA nanoparticles containing 1,3-dihydroxy-2-methylxanthone with improved antitumor activity on a human breast cancer cell line. *Pharm. Dev. Technol.* 2019, 24, 1104–1114.
50. Zhang, Z.; Tsai, P.-C.; Ramezanli, T.; Michniak-Kohn, B.B. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 2013, 5, 205–218.

## Capítulo 1

51. Zhang, Z.; Wang, J.; Chen, C. Near-infrared light-mediated nanoplatforms for cancer thermo-chemotherapy and optical imaging. *Adv. Mater.* 2013, 25, 3869–3880.
52. Ren, H.; Huang, X. Polyacrylate nanoparticles: toxicity or new nanomedicine? *Eur. Respir. J.* 2010, 36, 218–221.
53. El-Ansary, A.; Faddah, L.M. Nanoparticles as biochemical sensors. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2010, 3, 65–76.
54. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2013, 9, 1–14.
55. Pham, D.T.; Tiyaboonchai, W. Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. *Drug Deliv.* 2020, 27, 431–448.
56. Lammers, T.; Ferrari, M. The success of nanomedicine. *Nano Today* 2020, 31, 100853.
57. Chen, H.; Zhen, Z.; Todd, T.; Chu, P.K.; Xie, J. Nanoparticles for improving cancer diagnosis. *Mater. Sci. Eng. R Reports* 2013, 74, 35–69.
58. Maeda, H.; Matsumura, Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1989, 6, 193–210.
59. Maeda, H.; Bharate, G.Y.; Daruwalla, J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 71, 409–419.
60. Greish, K.; Fang, J.; Inutsuka, T.; Nagamitsu, A.; Maeda, H. Macromolecular Therapeutics. *Clin. Pharmacokinet.* 2003, 42, 1089–1105.
61. Maeda, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 91, 3–6.
62. Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 71–79.
63. Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R.N.; Gambhir, S.S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* 2011, 6, 715–728.
64. Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D.A.; Jain, R.K.; Torchilin, V.P. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Res.* 1995, 55, 3752–3756.
65. Smith, B.R.; Kempen, P.; Bouley, D.; Xu, A.; Liu, Z.; Dai, H.; Sinclair, R.; Gambhir, S.S. Shape Matters: Intravital Microscopy Reveals Surprising Geometrical Dependence for Nanoparticles in Tumor Models of Extravasation. 2013, 12, 3369–3377.
66. Iwai, K.; Maeda, H.; Konno, T. Use of Oily Contrast Medium for Selective Drug Targeting to Tumor: Enhanced Therapeutic Effect and X-Ray Image. *Cancer Res.* 1984, 44, 2115–2121.
67. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release* 2016, 244, 108–121.
68. Nichols, J.W.; Bae, Y.H. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. *Nano Today* 2012, 7, 606–618.

69. Carter, C.L.; Allen, C.; Henson, D.E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989, 63.
70. Gillies, R.J.; Schornack, P.A.; Secomb, T.W.; Raghunand, N. Causes and Effects of Heterogeneous Perfusion in Tumors. *Neoplasia* 1999, 1, 197–207.
71. Jain, R.K. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review. *Cancer Res.* 1987, 47, 3039–3051.
72. Fang, J.; Islam, R.; Islam, W.; Yin, H.; Subr, V.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Maeda, H. Augmentation of EPR Effect and Efficacy of Anticancer Nanomedicine by Carbon Monoxide Generating Agents. *Pharmaceutics* 2019, 11, 343.
73. Tahara, Y.; Yoshikawa, T.; Sato, H.; Mori, Y.; Zahangir, M.H.; Kishimura, A.; Mori, T.; Katayama, Y. Encapsulation of a nitric oxide donor into a liposome to boost the enhanced permeation and retention (EPR) effect. *Medchemcomm* 2017, 8, 415–421.
74. Islam, W.; Fang, J.; Imamura, T.; Etrych, T.; Subr, V.; Ulbrich, K.; Maeda, H. Augmentation of the enhanced permeability and retention effect with nitric oxide-generating agents improves the therapeutic effects of nanomedicines. *Mol. Cancer Ther.* 2018, 17, 2643–2653.
75. Nagamitsu, A.; Greish, K.; Maeda, H. Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor-targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: Cases of advanced solid tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2009, 39, 756–766.
76. Balasubramanian, V.; Domanskyi, A.; Renko, J.M.; Sarparanta, M.; Wang, C.F.; Correia, A.; Mäkilä, E.; Alanen, O.S.; Salonen, J.; Airaksinen, A.J.; et al. Engineered antibody-functionalized porous silicon nanoparticles for therapeutic targeting of pro-survival pathway in endogenous neuroblasts after stroke. *Biomaterials* 2020, 227, 119556.
77. Bian, X.; Wu, P.; Sha, H.; Qian, H.; Wang, Q.; Cheng, L.; Yang, Y.; Yang, M.; Liu, B. Anti-EGFR-iRGD recombinant protein conjugated silk fibroin nanoparticles for enhanced tumor targeting and antitumor efficiency. *Onco. Targets. Ther.* 2016, 9, 3153–3162.
78. Heo, D.N.; Yang, D.H.; Moon, H.J.; Lee, J.B.; Bae, M.S.; Lee, S.C.; Lee, W.J.; Sun, I.C.; Kwon, I.K. Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials* 2012, 33, 856–866.
79. Bhattacharya, D.; Das, M.; Mishra, D.; Banerjee, I.; Sahu, S.K.; Maiti, T.K.; Pramanik, P. Folate receptor targeted, carboxymethyl chitosan functionalized iron oxide nanoparticles: A novel ultradispersed nanoconjugates for bimodal imaging. *Nanoscale* 2011, 3, 1653–1662.
80. Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W.E.; Storm, G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Control. Release* 2012, 161, 175–187.
81. Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* 2010, 148, 135–146.
82. Kirpotin, D.B.; Drummond, D.C.; Shao, Y.; Shalaby, M.R.; Hong, K.; Nielsen, U.B.; Marks, J.D.; Benz, C.C.; Park, J.W. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 2006, 66, 6732–6740.
83. Jiménez Blanco, J.L.; Benito, J.M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J.M. Molecular

## Capítulo 1

- nanoparticle-based gene delivery systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2017, 42, 18–37.
84. Wong, J.; Brugger, A.; Khare, A.; Chaubal, M.; Papadopoulos, P.; Rabinow, B.; Kipp, J.; Ning, J. Suspensions for intravenous (IV) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 939–954.
  85. Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010, 62, 1607–1621.
  86. Morgan, S.; Grootendorst, P.; Lexchin, J.; Cunningham, C.; Greyson, D. The cost of drug development: A systematic review. *Health Policy (New York)*. 2011, 100, 4–17.
  87. Paul, S.M.; Mytelka, D.S.; Dunwiddie, C.T.; Persinger, C.C.; Munos, B.H.; Lindborg, S.R.; Schacht, A.L. How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 203–214.
  88. Services, H. Waiver of In-vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm. Cent. Drug Eval. Res. 2017, 3–5.
  89. Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* 2015, 5, 442–453.
  90. Müller, R.H.; Jacobs, C.; Kayser, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 47, 3–19.
  91. Xie, M.-B. Bin; Li, Y.; Zhao, Z.; Chen, A.-Z.Z.; Li, J.-S.S.; Hu, J.-Y.Y.; Li, G.; Li, Z. Solubility enhancement of curcumin via supercritical CO<sub>2</sub> based silk fibroin carrier. *J. Supercrit. Fluids* 2015, 103, 1–9.
  92. Fuster, M.G.; Carissimi, G.; Moltabán, M.G.; Villora, G. Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles. *Nanomaterials* 2020, 10, 718.
  93. Uhrich, K.E.; Cannizzaro, S.M.; Langer, R.S.; Shakesheff, K.M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* 1999, 99, 3181–3198.
  94. Kost, J.; Horbett, T.A.; Ratner, B.D.; Singh, M. Glucose-sensitive membranes containing glucose oxidase: Activity, swelling, and permeability studies. *J. Biomed. Mater. Res.* 1985, 19, 1117–1133.
  95. Volpatti, L.R.; Matranga, M.A.; Cortinas, A.B.; Delcassian, D.; Daniel, K.B.; Langer, R.; Anderson, D.G. Glucose-Responsive Nanoparticles for Rapid and Extended Self-Regulated Insulin Delivery. *ACS Nano* 2020, 14, 488–497.
  96. Chen, M.; Shao, Z.; Chen, X. Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2012, 100 A, 203–210.
  97. Jones, R.T. Blood Flow. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 1969, 1, 223–244.
  98. Moghimi, S.M.; Patel, H.M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 45–60.
  99. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer,

- D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8, 772–781.
100. Salvati, A.; Pitek, A.S.; Monopoli, M.P.; Prapainop, K.; Bombelli, F.B.; Hristov, D.R.; Kelly, P.M.; Åberg, C.; Mahon, E.; Dawson, K.A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8, 137–143.
  101. Milton Harris, J.; Chess, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 214–221.
  102. Totten, J.D.; Wongpinyochit, T.; Carrola, J.; Duarte, I.F.; Seib, F.P. PEGylation-Dependent Metabolic Rewiring of Macrophages with Silk Fibroin Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 14515–14525.
  103. Rodriguez, P.L.; Harada, T.; Christian, D.A.; Pantano, D.A.; Tsai, R.K.; Discher, D.E. Minimal “Self” Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science* (80-. ). 2013, 339, 971–975.
  104. Wernig, G.; Chen, S.Y.; Cui, L.; Van Neste, C.; Tsai, J.M.; Kambham, N.; Vogel, H.; Natkunam, Y.; Gilliland, D.G.; Nolan, G.; et al. Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017, 114, 4757–4762.
  105. Hu, C.-M.J.C.M.J.; Zhang, L.L.; Aryal, S.; Cheung, C.; Fang, R.H.; Zhang, L.L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108, 10980–10985.
  106. Parodi, A.; Quattrocchi, N.; Van De Ven, A.L.; Chiappini, C.; Evangelopoulos, M.; Martinez, J.O.; Brown, B.S.; Khaled, S.Z.; Yazdi, I.K.; Enzo, M.V.; et al. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8, 61–68.
  107. Nikitin, M.P.; Zelepukin, I. V.; Shipunova, V.O.; Sokolov, I.L.; Deyev, S.M.; Nikitin, P.I. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes. *Nat. Biomed. Eng.* 2020, 4, 717–731.
  108. Catto, V.; Farè, S.; Cattaneo, I.; Figliuzzi, M.; Alessandrino, A.; Freddi, G.; Remuzzi, A.; Tanzi, M.C. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* 2015, 54, 101–111.
  109. Tan, M.; Liu, W.; Liu, F.; Zhang, W.; Gao, H.; Cheng, J.; Chen, Y.; Wang, Z.; Cao, Y.; Ran, H. Silk fibroin-coated nanoagents for acidic lysosome targeting by a functional preservation strategy in cancer chemotherapy. *Theranostics* 2019, 9, 961–973.
  110. Meng, F.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. Intracellular drug release nanosystems. *Mater. Today* 2012, 15, 436–442.
  111. Zhao, Z.; Li, Y.; Xie, M. Bin Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 4880–4903.
  112. Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Krause, J.; Wlodarczyk, W.; Sander, B.; Vogl, T.; Felix, R. Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int. J. Hyperth.* 1997, 13, 587–605.
  113. Dianzani, C.; Zara, G.P.; Maina, G.; Pettazzoni, P.; Pizzimenti, S.; Rossi, F.; Gigliotti, C.L.;

## Capítulo 1

- Ciamporcero, E.S.; Daga, M.; Barrera, G. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014.
114. Kim, S.Y.; Naskar, D.; Kundu, S.C.; Bishop, D.P.; Doble, P.A.; Boddy, A. V.; Chan, H.K.; Wall, I.B.; Chrzanowski, W. Formulation of Biologically-Inspired Silk-Based Drug Carriers for Pulmonary Delivery Targeted for Lung Cancer. *Sci. Rep.* 2015, 5, 1–13.
  115. Paranjpe, M.; Müller-Goymann, C.C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 5852–5873.
  116. ZhuGe, D.L.; Wang, L.F.; Chen, R.; Li, X.Z.; Huang, Z.W.; Yao, Q.; Chen, B.; Zhao, Y.Z.; Xu, H.L.; Yuan, J.D. Cross-linked nanoparticles of silk fibroin with proanthocyanidins as a promising vehicle of indocyanine green for photo-thermal therapy of glioma. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2019, 47, 4293–4304.
  117. Zhan, S.; Paik, A.; Onyeabor, F.; Ding, B.; Prabhu, S.; Wang, J. Oral Bioavailability Evaluation of Celastrol-Encapsulated Silk Fibroin Nanoparticles Using an Optimized LC-MS/MS Method. *Molecules* 2020, 25, 3422.
  118. Brooks, A.E. The potential of silk and silk-like proteins as natural mucoadhesive biopolymers for controlled drug delivery. *Front. Chem.* 2015, 3, 1–8.
  119. Gaul, R.; Ramsey, J.M.; Heise, A.; Cryan, S.A.; Greene, C.M. Nanotechnology approaches to pulmonary drug delivery: Targeted delivery of small molecule and gene-based therapeutics to the lung; Elsevier Inc., 2018; ISBN 9780128136683.
  120. Takeuchi, I.; Shimamura, Y.; Kakami, Y.; Kameda, T.; Hattori, K.; Miura, S.; Shirai, H.; Okumura, M.; Inagi, T.; Terada, H.; et al. Transdermal delivery of 40-nm silk fibroin nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019, 175, 564–568.
  121. Deen, W.M.; Lazzara, M.J.; Myers, B.D. Structural determinants of glomerular permeability. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 2001, 281.
  122. M. Ohlson, J. Sörensson, B.H. A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, 396–405.
  123. Longmire, M.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine* 2012, 3, 703–717.
  124. Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J.P.; Ito, B.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J. V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25, 1165–1170.
  125. Kuntz, E.; Kuntz, H.-D. *Hepatology Principles and Practices*; 2013; Vol. 53; ISBN 9788578110796.
  126. Poon, W.; Zhang, Y.N.; Ouyang, B.; Kingston, B.R.; Wu, J.L.Y.; Wilhelm, S.; Chan, W.C.W. Elimination Pathways of Nanoparticles. *ACS Nano* 2019, 13, 5785–5798.
  127. Hwang, K.J.; Luk, K.F.S.; Beaumier, P.L. Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: A kinetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980, 77, 4030–4034.
  128. Mohammad, A.K.; Reineke, J.J. Quantitative detection of PLGA nanoparticle degradation in tissues following intravenous administration. *Mol. Pharm.* 2013, 10, 2183–2189.

129. Lu, Y.; Chen, S.C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, 56, 1621–1633.
130. Sadauskas, E.; Wallin, H.; Stoltenberg, M.; Vogel, U.; Doering, P.; Larsen, A.; Danscher, G. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part. Fibre Toxicol.* 2007, 4.
131. Good, I.L.; Kenoyer, J.M.; Meadow, R.H. New evidence for early silk in the Indus civilization. *Archaeometry* 2009, 51, 457–466.
132. Vepari, C.; Kaplan, D.L.; Charu Vepari; David L. Kaplan Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci.* 2009, 32, 991–1007.
133. Janani, G.; Kumar, M.; Chouhan, D.; Moses, J.C.; Gangrade, A.; Bhattacharjee, S.; Mandal, B.B. Insight into Silk-Based Biomaterials: From Physicochemical Attributes to Recent Biomedical Applications. *ACS Appl. Bio Mater.* 2019, 2, 5460–5491.
134. Aramwit, P. Biomaterials for Wound-Healing Applications Complimentary Contributor Copy. 2015, 49–104.
135. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003, 24, 401–416.
136. Pérez-Rigueiro, J.; Viney, C.; Llorca, J.; Elices, M. Mechanical properties of single-brin silkworm silk. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 75, 1270–1277.
137. Cunniff, P.M.; Fossey, S.A.; Auerbach, M.A.; Song, J.W.; Kaplan, D.L.; Adams, W.W.; Eby, R.K.; Mahoney, D.; Vezie, D.L. Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*. *Polym. Adv. Technol.* 1994, 5, 401–410.
138. Pins, G.D.; Christiansen, D.L.; Patel, R.; Silver, F.H. Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys. J.* 1997, 73, 2164–2172.
139. Engelberg, I.; Kohn, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. *Biomaterials* 1991, 12, 292–304.
140. Gosline, J.M.; Guerette, P.A.; Ortlepp, C.S.; Savage, K.N. The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *J. Exp. Biol.* 1999, 202, 3295–3303.
141. Tesoro, G. Textbook of polymer science, 3rd ed., Fred W. Billmeyer, Jr., Wiley-Interscience, New York, 1984, 578 pp. No price given. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 1984, 22, 674–674.
142. Sehna, F.; Sutherland, T. Silks produced by insect labial glands. *Prion* 2008, 2, 145–153.
143. Asakura, T.; Ashida, J.; Yamane, T.; Kameda, T.; Nakazawa, Y.; Ohgo, K.; Komatsu, K. A repeated  $\beta$ -turn structure in poly(Ala-Gly) as a model for silk I of *Bombyx mori* silk fibroin studied with two-dimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance. *J. Mol. Biol.* 2001, 306, 291–305.
144. Kumar, J.P.; Mandal, B.B. Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry silk sericin and its implications in biomedicine. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 108, 803–818.
145. He, Y.X.; Zhang, N.N.; Li, W.F.; Jia, N.; Chen, B.Y.; Zhou, K.; Zhang, J.; Chen, Y.; Zhou, C.Z. N-terminal domain of *Bombyx mori* fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease. *J. Mol. Biol.* 2012, 418, 197–207.

## Capítulo 1

146. Jin, H.-J.; Kaplan, D.L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 2003, 424, 1057–1061.
147. Carissimi, G.; Baronio, C.M.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. On the Secondary Structure of Silk Fibroin Nanoparticles Obtained Using Ionic Liquids: An Infrared Spectroscopy Study. *Polymers (Basel)*. 2020, 12, 1294.
148. Vollrath, F.; Knight, D.P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 2001, 410, 541–548.
149. Asakura, T.; Yao, J. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR study on structural heterogeneity in *Bombyx mori* silk fiber and their generation by stretching. *Protein Sci.* 2002, 11, 2706–2713.
150. Fotografía: Oficina Verde Universidad de Murcia Available online: [http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,371,m,3871&r=ReP-30887-DETALLE\\_REPORTAJESABUELO](http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,371,m,3871&r=ReP-30887-DETALLE_REPORTAJESABUELO) (accessed on Oct 13, 2020).
151. Julien, E.; Coulon-Bublex, M.; Garel, A.; Royer, C.; Chavancy, G.; Prudhomme, J.-C.; Couble, P. Silk Gland Development and Regulation of Silk Protein Genes. In *Comprehensive Molecular Insect Science*; Elsevier, 2005; pp. 369–384.
152. Hao, L.C.; Sapuan, S.M.; Hassan, M.R.; Sheltami, R.M. Natural fiber reinforced vinyl polymer composites; Elsevier Ltd, 2018; ISBN 9780081021606.
153. Greving, I.; Cai, M.; Vollrath, F.; Schniepp, H.C. Shear-induced self-assembly of native silk proteins into fibrils studied by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 2012, 13, 676–682.
154. Volkov, V.; Ferreira, A. V.; Cavaco-Paulo, A. On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. *Macromol. Mater. Eng.* 2015, 300, 1199–1216.
155. Padamwar, M.N.; Pawar, A.P. Silk sericin and its application : A review. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 2004, 63, 323–329.
156. Inoue, S.; Tanaka, K.; Arisaka, F.; Kimura, S.; Ohtomo, K.; Mizuno, S. Silk fibroin of *bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 40517–40528.
157. Lotz, B.; Colonna Cesari, F. The chemical structure and the crystalline structures of *bombyx mori* silk fibroin. *Biochimie* 1979, 61, 205–214.
158. Guo, C.; Li, C.; Kaplan, D.L. Enzymatic Degradation of *Bombyx mori* Silk Materials: A Review. *Biomacromolecules* 2020, 21, 1678–1686.
159. Holland, C.; Numata, K.; Rnjak-Kovacina, J.; Seib, F.P. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Adv. Healthc. Mater.* 2019, 8.
160. Drummy, L.F.; Farmer, B.L.; Naik, R.R. Correlation of the  $\beta$ -sheet crystal size in silk fibers with the protein amino acid sequence. *Soft Matter* 2007, 3, 877–882.
161. Martel, A.; Burghammer, M.; Davies, R.J.; Riekel, C. Thermal Behavior of *Bombyx mori* Silk: Evolution of Crystalline Parameters, Molecular Structure, and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3548–3556.
162. Pérez-Rigueiro, J.; Elices, M.; Plaza, G.R.; Guinea, G. V. Similarities and Differences in the Supramolecular Organization of Silkworm and Spider Silk. *Macromolecules* 2007, 40, 5360–

- 5365.
163. Liang, K.; Gong, Y.; Fu, J.; Yan, S.; Tan, Y.; Du, R.; Xing, X.; Mo, G.; Chen, Z.; Cai, Q.; et al. Microstructural change of degummed *Bombyx mori* silk: An in situ stretching wide-angle X-ray-scattering study. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 57, 99–104.
  164. Wang, X.; Yucel, T.; Lu, Q.; Hu, X.; Kaplan, D.L. Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 1025–1035.
  165. Nguyen, T.P.; Nguyen, Q.V.; Nguyen, V.; Le, T.; Le, Q. Van Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polimers* 2019, 11, 1–25.
  166. Thurber, A.E.; Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials* 2015, 71, 145–157.
  167. Soong, H.K.; Kenyon, K.R. Adverse Reactions to Virgin Silk Sutures in Cataract Surgery. *Ophthalmology* 1984, 91, 479–483.
  168. Panilaitis, B.; Altman, G.H.; Chen, J.; Jin, H.J.; Karageorgiou, V.; Kaplan, D.L. Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 2003, 24, 3079–3085.
  169. Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; Víllora, G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019, 11, 2045.
  170. Meinel, L.; Hofmann, S.; Karageorgiou, V.; Kirker-Head, C.; McCool, J.; Gronowicz, G.; Zichner, L.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2005, 26, 147–155.
  171. Santin, M.; Motta, A.; Freddi, G.; Cannas, M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 46, 382–389.
  172. Seo, Y.K.; Choi, G.M.; Kwon, S.Y.; Lee, H.S.; Park, Y.S.; Song, K.Y.; Kim, Y.J.; Park, J.K. The Biocompatibility of Silk Scaffold for Tissue Engineered Ligaments. *Key Eng. Mater.* 2007, 342–343, 73–76.
  173. Lozano-Pérez, A.A.; Rodriguez-Nogales, A.; Ortiz-Cullera, V.; Algieri, F.; Garrido-Mesa, J.; Zorrilla, P.; Rodriguez-Cabezas, M.E.; Garrido-Mesa, N.; Pilar Utrilla, M.; de Matteis, L.; et al. Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *Int. J. Nanomedicine* 2014, 9, 4507–4520.
  174. Giménez-Siurana, A.; García, F.G.; Bernabeu, A.P.; Lozano-Pérez, A.A.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; López-Jornet, P. Chemoprevention of experimental periodontitis in diabetic rats with silk fibroin nanoparticles loaded with resveratrol. *Antioxidants* 2020, 9, 1–13.
  175. Rodriguez-Nogales, A.; Algieri, F.; De Matteis, L.; Lozano-Perez, A.A.; Garrido-Mesa, J.; Vezza, T.; de la Fuente, J.M.; Cenis, J.L.; Gálvez, J.; Rodriguez-Cabezas, M.E. Intestinal anti-inflammatory effects of RGD-functionalized silk fibroin nanoparticles in trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats. *Int. J. Nanomedicine* 2016, 11, 5945–5958.
  176. Horan, R.L.; Antle, K.; Collette, A.L.; Wang, Y.; Huang, J.; Moreau, J.E.; Volloch, V.; Kaplan, D.L.; Altman, G.H. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 2005, 26, 3385–3393.

## Capítulo 1

177. Brown, J.; Lu, C.L.; Coburn, J.; Kaplan, D.L. Impact of silk biomaterial structure on proteolysis. *Acta Biomater.* 2015, 11, 212–221.
178. Li, M.; Ogiso, M.; Minoura, N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials* 2003, 24, 357–365.
179. Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 762–798.
180. Cao, Y.; Wang, B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 1514–1524.
181. Wongpinyochit, T.; Johnston, B.F.; Seib, F.P. Degradation Behavior of Silk Nanoparticles - Enzyme Responsiveness. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4, 942–951.
182. Wang, L.; Luo, Z.; Zhang, Q.; Guan, Y.; Cai, J.; You, R.; Li, X. Effect of Degumming Methods on the Degradation Behavior of Silk Fibroin Biomaterials. *Fibers Polym.* 2019, 20, 45–50.
183. Zuo, B.; Dai, L.; Wu, Z. Analysis of structure and properties of biodegradable regenerated silk fibroin fibers. *J. Mater. Sci.* 2006, 41, 3357–3361.
184. Wang, Z.; Yang, H.; Li, W.; Li, C. Effect of silk degumming on the structure and properties of silk fibroin. *J. Text. Inst.* 2018, 5000, 1–7.
185. Bhardwaj, N.; Rajkhowa, R.; Wang, X.; Devi, D. Milled non-mulberry silk fibroin microparticles as biomaterial for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 81, 31–40.
186. Rajkhowa, R.; Wang, L.; Wang, X. Ultra-fine silk powder preparation through rotary and ball milling. *Powder Technol.* 2008, 185, 87–95.
187. Kazemimostaghim, M.; Rajkhowa, R.; Tsuzuki, T.; Wang, X. Production of submicron silk particles by milling. *Powder Technol.* 2013, 241, 230–235.
188. Rajkhowa, R.; Wang, L.; Kanwar, J.; Wang, X. Fabrication of ultrafine powder from eri silk through attritor and jet milling. *Powder Technol.* 2009, 191, 155–163.
189. Jacobs, M.; Heijnen, N.; Bastiaansen, C.; Lemstra, P. Production of fine powder from silk by radiation. *Macromol. Mater. Eng.* 2000, 283, 126–131.
190. Wongpinyochit, T.; Totten, J.D.; Johnston, B.F.; Seib, F.P. Microfluidic-assisted silk nanoparticle tuning. *Nanoscale Adv.* 2019, 1, 873–883.
191. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* 2011, 6, 1612–1631.
192. Ajisawa, A. Dissolution aqueous of silk fibroin with calciumchloride / ethanol solution. *J. Sericultural Sci. Japan* 1997, 67, 91–94.
193. Zheng, Z.; Guo, S.; Liu, Y.; Wu, J.; Li, G.; Liu, M.; Wang, X.; Kaplan, D. Lithium-free processing of silk fibroin. *J. Biomater. Appl.* 2016, 31, 450–463.
194. Shen, T.; Wang, T.; Cheng, G.; Huang, L.; Chen, L.; Wu, D. Dissolution behavior of silk fibroin in a low concentration CaCl<sub>2</sub>-methanol solvent: From morphology to nanostructure. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 113, 458–463.
195. Mathur, A.B.; Tonelli, A.; Rathke, T.; Hudson, S. The dissolution and characterization of

- bombyx mori silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films. *Biopolym. - Nucleic Acid Sci. Sect.* 1997, 42, 61–74.
196. Ha, S.W.; Park, Y.H.; Hudson, S.M. Dissolution of bombyx mori silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of fibroin solution. *Biomacromolecules* 2003, 4, 488–496.
  197. Cheng, G.; Wang, X.; Tao, S.; Xia, J.; Xu, S. Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015, 132, 1–8.
  198. Ajisawa, A. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.* 1997, 67, 91–94.
  199. Kanbak, M.; Karagoz, A.H.; Erdem, N.; Oc, B.; Saricaoglu, F.; Ertas, N.; Berkkan, A.; Abbasoglu, O.; Aypar, U. Renal Safety and Extrahepatic Defluorination of Sevoflurane in Hepatic Transplantations. *Transplant. Proc.* 2007, 39, 1544–1548.
  200. Phillips, D.M.; Drummy, L.F.; Conrady, D.G.; Fox, D.M.; Naik, R.R.; Stone, M.O.; Trulove, P.C.; De Long, H.C.; Mantz, R.A. Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc* 2004, 126, 14350–14351.
  201. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Rubio, M.; Villora, G. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using supported liquid membranes based on ionic liquids. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 2007, 46, 818–824.
  202. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Villora, G. On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of rac-2-pentanol. *J. Memb. Sci.* 2008, 314, 238–246.
  203. Rogers, R.D.; Seddon, K.R. Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science (80-. )*. 2003, 302, 792–793.
  204. Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cragolini, F.; Cenis, J.L.; Villora, G. Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *J. Appl. Polym. Sci.* 2014, 132, 1–8.
  205. Wang, Q.; Yang, Y.; Chen, X.; Shao, Z. Investigation of rheological properties and conformation of silk fibroin in the solution of AmimCl. *Biomacromolecules* 2012, 13, 1875–1881.
  206. Zhang, Y.-Q.Q.; Shen, W.-D. De; Xiang, R.-L.L.; Zhuge, L.-J.J.; Gao, W.-J.J.; Wang, W.-B.B. Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J. Nanoparticle Res.* 2007, 9, 885–900.
  207. Kundu, J.; Chung, Y. Il; Kim, Y.H.; Tae, G.; Kundu, S.C. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int. J. Pharm.* 2010, 388, 242–250.
  208. Perteghella; Sottani; Coccè; Negri; Cavicchini; Alessandri; Cottica; Torre; Grignani; Pessina Paclitaxel-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles: Method Validation by UHPLC-MS/MS to Assess an Exogenous Approach to Load Cytotoxic Drugs. *Pharmaceutics* 2019, 11, 285.
  209. Wongpinyochit, T.; Johnston, B.F.; Philipp Seib, F. Manufacture and drug delivery applications of silk nanoparticles. *J. Vis. Exp.* 2016, 2016, 1–9.

## Capítulo 1

210. Li, H.; Tian, J.; Wu, A.; Wang, J.; Ge, C.; Sun, Z. Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *Int. J. Nanomedicine* 2016, 11, 4373–4380.
211. Yu, S.; Yang, W.; Chen, S.; Chen, M.; Liu, Y.; Shao, Z.; Chen, X. Floxuridine-loaded silk fibroin nanospheres. *RSC Adv.* 2014, 4, 18171–18177.
212. Wu, P.; Liu, Q.; Li, R.; Wang, J.; Zhen, X.; Yue, G.; Wang, H.; Cui, F.; Wu, F.; Yang, M.; et al. Facile preparation of paclitaxel loaded silk fibroin nanoparticles for enhanced antitumor efficacy by locoregional drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5, 12638–12645.
213. Matteucci, M.E.; Hotze, M.A.; Johnston, K.P.; Williams, R.O. Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: Mixing energy versus surfactant stabilization. *Langmuir* 2006, 22, 8951–8959.
214. Kiran, E.; Debenedetti, P.G.; Peters, C.J. *Supercritical Fluids*; 2000; ISBN 978-0-7923-6236-4.
215. Xie, M.; Fan, D.; Li, Y.; He, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Zhu, J.; Xu, G.; Wu, X.; Lan, P. Supercritical carbon dioxide-developed silk fibroin nanopatform for smart colon cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* 2017, 12, 7751–7761.
216. Zhao, Z.; Chen, A.; Li, Y.; Hu, J.; Liu, X.; Li, J.; Zhang, Y.; Li, G.; Zheng, Z. Fabrication of silk fibroin nanoparticles for controlled drug delivery. *J. Nanoparticle Res.* 2012, 14.
217. Chen, B.Q.; Kankala, R.K.; He, G.Y.; Yang, D.Y.; Li, G.P.; Wang, P.; Wang, S. Bin; Zhang, Y.S.; Chen, A.Z. Supercritical Fluid-Assisted Fabrication of Indocyanine Green-Encapsulated Silk Fibroin Nanoparticles for Dual-Triggered Cancer Therapy. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4, 3487–3497.
218. Reverchon, E.; De Marco, I.; Torino, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. *J. Supercrit. Fluids* 2007, 43, 126–138.
219. Jaworek, A.; Krupa, A. Jet and drops formation in electrohydrodynamic spraying of liquids. A systematic approach. *Exp. Fluids* 1999, 27, 43–52.
220. Gholami, A.; Tavanai, H.; Moradi, A.R. Production of fibroin nanopowder through electrospraying. *J. Nanoparticle Res.* 2011, 13, 2089–2098.
221. Composition, P.; Droplets, V.; Shishulin, A. V; Fedoseev, V.B. *Microfluidics-a review.* 1993, D.
222. Suh, Y.K.; Kang, S. A review on mixing in microfluidics. *Micromachines* 2010, 1, 82–111.
223. Contributors, W.C. File:Microfluidic Chip iX-factory.jpg.
224. Lammel, A.S.; Hu, X.; Park, S.H.; Kaplan, D.L.; Scheibel, T.R. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 4583–4591.
225. Weber, M.; Thies, M. Understanding the RESS Process. In *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering*; CRC Press, 2002.
226. Ostwald ripening. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; IUPAC: Research Triangle Park, NC, 2007; Vol. 1801, p. 1824.
227. Perteghella, S.; Crivelli, B.; Catenacci, L.; Sorrenti, M.; Bruni, G.; Necchi, V.; Vigani, B.; Sorlini, M.; Torre, M.L.; Chlapanidas, T. Stem cell-extracellular vesicles as drug delivery systems: New frontiers for silk/curcumin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2017, 520, 86–97.

228. Montalbán, M.G.; Chakraborty, S.; Peña-García, J.; Verli, H.; Villora, G.; Pérez-Sánchez, H.; Díaz-Baños, F.G. Molecular insight into silk fibroin based delivery vehicle for amphiphilic drugs: Synthesis, characterization and molecular dynamics studies. *J. Mol. Liq.* 2020, 299, 112156.



## Capítulo 2

# Síntesis de nanopartículas biopoliméricas en líquidos iónicos

**Resumen:** Recientemente, muchas investigaciones se han centrado en el uso de biopolímeros, que se consideran materiales biodegradables, naturales y respetuosos con el medio ambiente. En este contexto, las nanopartículas biopoliméricas han atraído una gran atención en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones especialmente en el campo de la biomedicina. Los líquidos iónicos han surgido como disolventes prometedores para su uso en una amplia variedad de procesos químicos y bioquímicos por sus extraordinarias propiedades, que incluyen una presión de vapor prácticamente nula, elevada estabilidad térmica y química, menor toxicidad que los disolventes orgánicos convencionales y la posibilidad de modular sus propiedades fisicoquímicas mediante una selección apropiada del catión y el anión. En este capítulo, se realizará una revisión bibliográfica sobre la síntesis de nanopartículas biopoliméricas (trimetilsililcelulosa, xilano, almidón, quitosano o SF) utilizando líquidos iónicos. También se mencionarán los resultados de nuestros estudios recientes que describen cómo los ultrasonidos de alta potencia son capaces de mejorar el proceso de disolución de las proteínas de seda en líquidos iónicos y cómo las SFN pueden obtenerse directamente de la solución de SF-líquido iónico mediante desolvatación rápida en disolventes orgánicos polares. Como ejemplo, también se discute la potencial aplicación biomédica de SFN cargadas con curcumina para la terapia del cáncer.

Montalbán, M.G.; **Carissimi, G.**; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.; Coburn, J.M.; Kaplan, D.L.; Villora, G. *Biopolymeric Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids*. In Recent Advances in Ionic Liquids; **IntechOpen**, 2018; pp. 3–26.



## 2.1. Introducción

### 2.1.1 *Nanopartículas biopoliméricas para aplicaciones biomédicas*

Durante los últimos treinta años, la nanotecnología ha suscitado un gran interés en muchos campos de la ingeniería, incluida la ingeniería electrónica, mecánica, biomédica y espacial. Entre estos campos, la nanotecnología ha llevado a un progreso significativo en biomedicina a través del desarrollo de estructuras eficientes para la administración controlada y dirigida de fármacos o genes, ingeniería de tejidos, obtención de imágenes de sitios específicos, medicina regenerativa, biodetección y sondeo de la estructura del ADN [1]. Más concretamente, el papel de las nanopartículas en los avances en este campo es de particular interés, y los tratamientos con nanopartículas se han aplicado ampliamente en la terapia del cáncer, diabetes, alergias, infecciones e inflamaciones [2]. Las principales ventajas de las nanopartículas utilizadas como portadores de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades son las siguientes: (i) un rango de tamaño similar al de las proteínas, (ii) una gran superficie, que permite la presencia de diferentes grupos funcionales que actúan como, o pueden ser funcionalizados con ligandos, (iii) propiedades de rápida absorción y liberación y (iv) tamaños de partículas y características de la superficie que pueden diseñarse para cumplir acciones específicas.

Las nanopartículas para aplicación terapéutica se pueden sintetizar principalmente a partir de polímeros (naturales o sintéticos), cerámicas y metales [3]. Las nanopartículas poliméricas se han estudiado ampliamente como nanoportadores de moléculas activas como fármacos y genes [4–9]. Los principales inconvenientes en el uso de nanopartículas poliméricas son la dificultad para escalar su producción, su relativa baja capacidad de carga de fármacos y la amplia distribución de tamaño [2]. Sin embargo, muestran un gran potencial como nanoplataformas porque permiten la liberación dirigida de fármacos a células o tejidos específicos [10]. Además, a diferencia de las nanopartículas cerámicas o metálicas, las nanopartículas poliméricas pueden sintetizarse en una amplia gama de tamaños y formas y pueden mantener agentes terapéuticos farmacológicos localizados durante semanas [3]. Si bien las características anteriores son comunes tanto a los polímeros naturales como a los sintéticos, los polímeros naturales, también conocidos como biopolímeros, tienen algunas ventajas adicionales, como su biocompatibilidad y biodegradabilidad inherentes, baja respuesta inmune, alto valor nutricional, abundancia y procedencia de fuentes renovables y extraordinaria capacidad de unión con varios fármacos [11]. Los biopolímeros son macromoléculas naturales y pueden ser polisacáridos, proteínas, polifenoles, poliésteres o poliamidas. La síntesis de materiales basados en biopolímeros, como las nanopartículas, sigue siendo difícil debido a la

baja solubilidad de los primeros en disolventes convencionales como resultado de su elevada estabilidad, normalmente proveniente de su estructura altamente cristalina [1]. Por tanto, la búsqueda de nuevos disolventes capaces de disolver biopolímeros con éxito es un desafío continuo para lograr la fabricación industrial de biomateriales.

### *2.1.2 Líquidos iónicos como disolventes para la síntesis de nanopartículas*

Los líquidos iónicos (ILs) son sales orgánicas que son líquidas a temperaturas próximas al ambiente. Normalmente, constan de un catión orgánico y de un anión orgánico o inorgánico poliatómico. Recientemente, han generado un gran interés para su uso en una amplia variedad de procesos químicos como disolventes “verdes”. La ventaja más importante de los ILs es su extremadamente baja presión de vapor, lo que los convierte en solventes benignos desde el punto de vista medioambiental en comparación con los disolventes orgánicos volátiles. La creciente conciencia sobre el riesgo de utilizar estos disolventes ha llevado a la búsqueda de alternativas y el descubrimiento de ILs parece aportar soluciones al problema [12]. También muestran varias ventajas sobre los disolventes orgánicos convencionales, como buena estabilidad química y térmica, elevada conductividad iónica, no inflamabilidad, una gran ventana electroquímica, capacidad de solvatación y que pueden utilizarse a altas temperaturas [13,14]. Además, las propiedades fisicoquímicas de los ILs, como su densidad, polaridad, hidrofobicidad, punto de fusión, viscosidad y propiedades como disolventes pueden ajustarse modificando el anión o el catión. Entre otras aplicaciones, los ILs se han utilizado como electrolitos, disolventes, lubricantes, como matrices para espectrometría de masas, como fase estacionaria en cromatografía, soportes para la inmovilización de enzimas, en tecnologías de separación, como plantillas para síntesis de nanomateriales, en síntesis de membranas catalíticas y en la generación de materiales de alta conductividad [13,14].

Los ILs pueden ser excelentes candidatos para disolver biopolímeros y desarrollar biomateriales principalmente debido a la flexibilidad que se puede lograr combinando diferentes cationes y aniones, y propiedades de disolventes verdes como la no volatilidad, la no inflamabilidad y su fácil reciclado. Durante los últimos años, los biopolímeros como celulosa, xilano, almidón, quitosano, queratina, SF y heparina se han transformado en películas, armazones, membranas, fibras y micro o nanopartículas utilizando ILs. Además, los compuestos formados por combinación de biopolímeros o mezclas de biopolímero/polímero sintético también se pueden sintetizar por codisolución de los polímeros en ILs [1]. Las interesantes propiedades de los ILs los convierten en excelentes medios para la síntesis y

estabilización de nanopartículas [15]. Sus características más destacables para la síntesis de nanopartículas son las siguientes:

i) Una baja tensión superficial que contribuye a la síntesis de partículas pequeñas debido a que la misma conduce a altas tasas de nucleación.

ii) Mejoran la estabilización electrónica y estérica de las nanopartículas y reducen el crecimiento de las mismas, ya que sus constituyentes (anión y catión) forman una capa electrostática protectora que evita los procesos de aglomeración. Además, las nanopartículas son estables en solución debido a la coordinación de anión o catión a través de enlaces iónicos o covalentes.

iii) La alta estructuración de los ILs tiene un efecto significativo sobre la forma de las nanopartículas sintetizadas debido a que forman redes extendidas de enlaces de hidrógeno con los constituyentes de las partículas.

iv) Los ILs se pueden diseñar utilizando diferentes combinaciones de cationes/aniones para lograr las propiedades deseadas de densidad, viscosidad, hidrofobicidad, solubilidad etc.

v) Los ILs pueden actuar como reactivos en la síntesis de partículas.

vi) La elección de los ILs utilizados para la síntesis de nanopartículas determina, al menos parcialmente, sus propiedades.

vii) Son más seguros para el operador al poseer una presión de vapor despreciable y no ser inflamables, permitiendo trabajar a alta temperatura y al vacío en comparación con los disolventes orgánicos convencionales.

viii) Los ILs se pueden sintetizar siguiendo los doce principios de la química verde desarrollados por Anastas y Warner [16] que, además de la no volatilidad, baja toxicidad, no corrosividad y no inflamabilidad, incluyen no necesitar disolventes auxiliares o de separación.

En definitiva, la síntesis de nanopartículas mediante ILs se puede realizar siguiendo procedimientos más respetuosos con el medio ambiente que los que utilizan disolventes orgánicos convencionales.

En este capítulo, se revisan los procesos utilizados para sintetizar nanopartículas biopoliméricas (polisacáridos o proteínas) utilizando ILs. Los biopolímeros más utilizados para la obtención de nanopartículas en procesos que involucran IL son la celulosa, xilano, almidón, quitosano, queratina y SF. Se presentará la preparación de SFN mediante la disolución de la proteína en varios ILs. También se expondrá como ejemplo la aplicación biomédica de SFN cargadas con curcumina obtenidas mediante ILs.

## Capítulo 2

### 2.1.3 Métodos de síntesis

Un método utilizado para obtener nanopartículas en IL es la síntesis a través de la deposición física de vapor ya que, debido a la insignificante presión de vapor de la mayoría de los ILs, estos pueden manipularse en condiciones de alto vacío incluso a altas temperaturas [17]. Este método se ha utilizado para obtener nanopartículas metálicas mediante la vaporización de un metal, una fase intermetálica o una sal metálica en presencia de un IL: por ejemplo, nanopartículas de cobre en hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio,  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ . Mediante esta técnica se pueden depositar nanopartículas metálicas no solo sobre el IL, sino también sobre materiales dispersos en el IL, como ocurre en la formación de nanocompuestos Cu/ZnO en bis {(trifluorometil) sulfonil} imida de 1-butil-3-metilimidazolio,  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ . Sin embargo, el método deposición física de vapor nunca se ha aplicado para obtener nanopartículas a partir de biopolímeros en ILs.

La síntesis mediante microondas aprovecha la presencia de iones con alta polarización y conductividad de los ILs, lo que los convierte en un medio muy bueno para absorber microondas, que conduce a altas velocidades de calentamiento y dan como resultado la formación rápida de núcleos (nanopartículas) [18,19]. El control sobre el rango de tamaño de partícula se puede lograr variando la temperatura y el tiempo del proceso, así como las concentraciones de reactivo y la elección de los constituyentes aniónicos y catiónicos del IL. Si el calor se transfiere uniformemente a través de la muestra, se puede obtener una distribución de tamaño de nanopartículas estrecha. Como ejemplo, se han obtenido nanopartículas de plata y oro por síntesis mediante microondas en bis {(trifluorometil) sulfonil} imida de 2-hidroxietil-N, N, N-trimetilamonio [15]. Swatloski y colaboradores [20] utilizaron calentamiento por microondas en una solución de celulosa/cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ ) para disolver la celulosa, pero no analizaron la degradación del polímero. Phillips y colaboradores [21], intentaron disolver la SF en  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$  empleando un microondas de uso doméstico, pero no tuvieron éxito debido a la descomposición térmica de la seda. Sin embargo, nuestro grupo ha descubierto que, mediante el uso de un microondas de laboratorio con un estricto control de la temperatura y el tiempo, se conserva la integridad de la proteína y se pueden obtener nanopartículas a partir de disoluciones de SF/líquido iónico (SF/IL) mediante precipitación en disolventes orgánicos polares.

Los ultrasonidos pueden ser utilizados como fuente de energía para la preparación de muchos materiales como nanopartículas de metal, óxido, sulfuro y carburo, y el uso de la energía de ultrasonidos se ha popularizado recientemente en combinación con ILs como medio de reacción [22]. En el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo, se

han utilizado ultrasonidos de alta potencia para mejorar el proceso de disolución de proteínas de seda en ILs para obtener SFN directamente de la disolución SF/IL mediante desolvatación rápida en disolventes orgánicos polares [23].

## 2.2. Síntesis de nanopartículas de biopolímero utilizando ILs

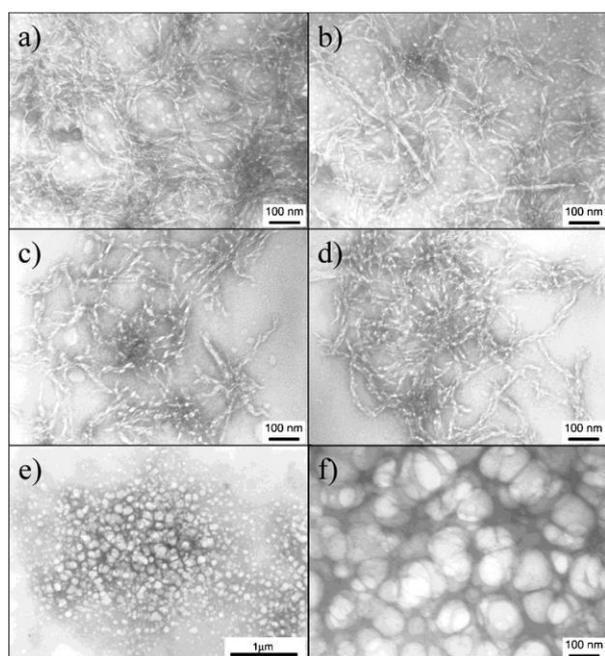
### 2.2.1 Celulosa

La celulosa es el principal componente del reino vegetal y las algas marinas, lo que la convierte en el polisacárido más abundante de la Tierra. Desempeña un papel estructural en la pared celular y otras estructuras superficiales de algunas amebas, alveolados, cromistas y algas rojas y verdes. La estructura molecular de este biopolímero está compuesta por unidades de D-glucopiranosas unidas por un enlace glicosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) para formar una estructura lineal. El grado de polimerización varía en función de la fuente, pero puede llegar a 23.000 unidades. La celulosa tiene una estructura en forma de cinta enrollada, con dos unidades por vuelta de 1.03 nm, dictada por los ángulos permitidos de C<sub>1</sub>-O y O-C<sub>4</sub> [24,25]. En términos de densidad (1,5 Mgm<sup>-3</sup>), las fibras de celulosa son más rígidas (módulo de Young 50-130 GPa) y más fuertes (1 GPa), cuando se miden a lo largo de la longitud del polímero, que el nailon, la seda, la quitina, el colágeno, el tendón o el hueso [26]. La celulosa es completamente insoluble en agua, principalmente porque sus capacidades de enlace de hidrógeno están ocupadas por cadenas laterales, formando agregados. No obstante, se ha demostrado que el IL [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] es capaz de solubilizar la celulosa incluso con un grado de polimerización elevado (6500 unidades), lo que lo convierte en un disolvente apropiado [24]. Lee y colaboradores proporcionan una completa revisión de la solubilidad de la celulosa en ILs [1].

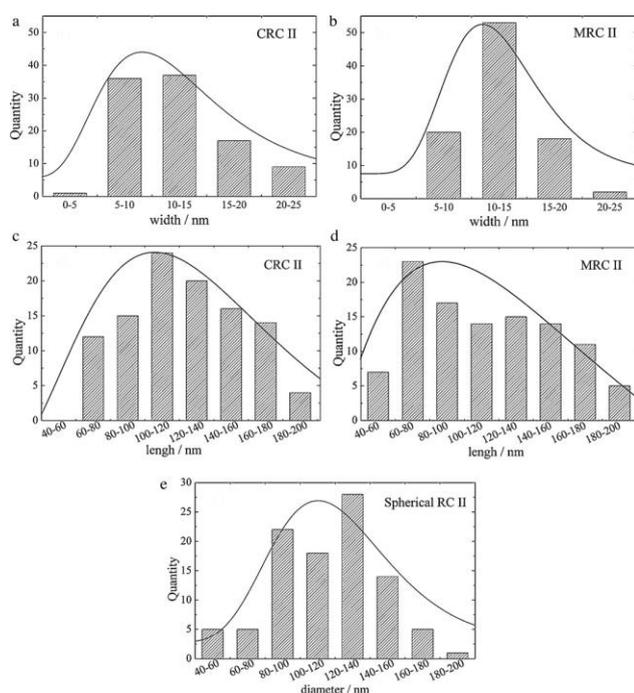
Swatloski y colaboradores [20], llevaron a cabo ensayos de disolución de celulosa en IL utilizando pulpas de celulosa soluble, celulosa fibrosa y filtros de celulosa Whatman. Los investigadores prepararon soluciones de celulosa mediante la adición de estas en los ILs utilizando una placa calefactora o un horno microondas doméstico para calentar sin ningún tipo de pretratamiento. Estos autores pudieron disolver 25% en peso de celulosa en [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] usando calentamiento por microondas. Sin embargo, los ILs que contienen aniones "no coordinantes", incluidos [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] y [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], no eran disolventes, presumiblemente porque la celulosa se solubiliza mediante la ruptura y posterior formación de enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilo a los aniones del disolvente, como el [Cl<sup>-</sup>]. Los autores no analizaron la temperatura máxima alcanzada durante la disolución por microondas ni el grado de degradación de la celulosa.

## Capítulo 2

Han y colaboradores [27] han sintetizado nanopartículas de celulosa disolviendo celulosa microcristalina o celulosa de algodón en  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$  en un proceso de cuatro pasos: disolución, regeneración, homogeneización y liofilización. Antes de comenzar con el proceso de disolución, el  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ , celulosa microcristalina o celulosa de algodón en estado sólido deben secarse a vacío para eliminar los restos de agua, cuya presencia puede afectar significativamente a la solubilidad de la celulosa en IL al competir con este último por enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa [20]. A continuación, la celulosa se disolvió en el IL, utilizando una placa calefactora y agitando las fibras dispersas al 5% p/p durante 5 horas en un baño de aceite a 125 °C. Cuando se obtuvo una fase clara, la solución se vertió lentamente en agua destilada apareciendo inmediatamente una dispersión blanca de nanopartículas. Para eliminar el IL, la dispersión fue filtrada, lavada por centrifugación tres veces y, finalmente, dializada. Para mejorar aún más la suspensión, la muestra fue homogeneizada a alta presión y, finalmente, las suspensiones se congelaron rápidamente mezclando acetona y hielo seco en un recipiente de hielo y se transfirieron a un liofilizador. Las partículas regeneradas a partir de celulosa microcristalina producen barras de  $112 \pm 42$  nm de longitud con una relación de aspecto de 9.21 y nanopartículas esféricas con un diámetro de  $118 \pm 32$  nm. Las partículas regeneradas a partir de celulosa de algodón formaron solo nanobarras de  $123 \pm 34$  nm con una relación largo:ancho de 9.96. Imágenes de microscopía electrónica de las nanopartículas son mostradas en la Figura 2.1 y su distribución de tamaño en la Figura 2.2.

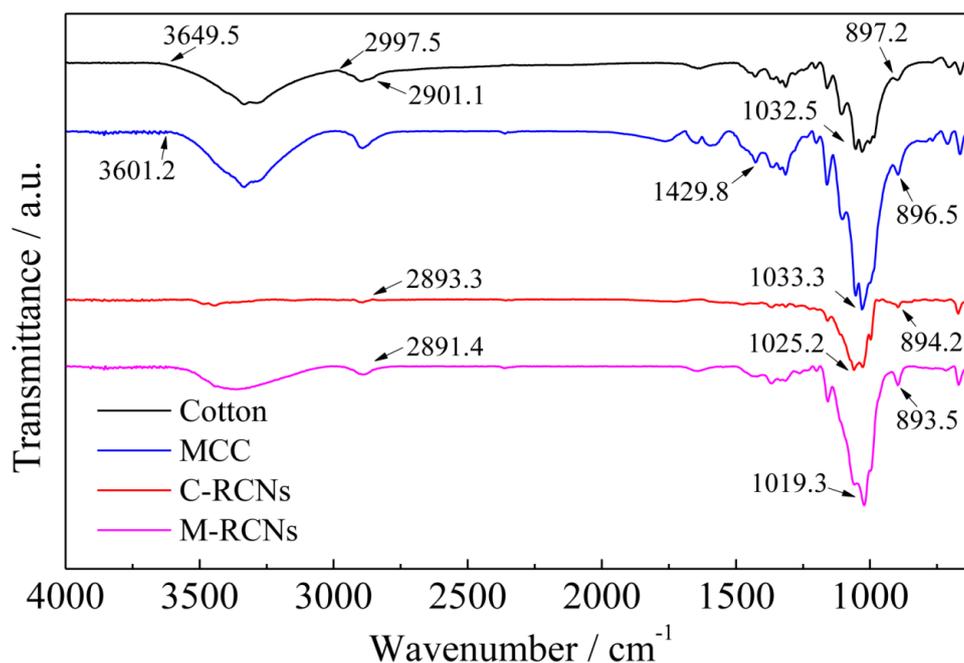


**Figura 2.1.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de celulosa microcristalina (a), de celulosa de algodón (b), celulosa microcristalina después de homogeneizar (c), celulosa de algodón después homogeneizar (d) y nanopartículas esféricas de celulosa microcristalina (e, f) [27].



**Figura 2.2.** Distribución de tamaños de nanopartículas de celulosa de algodón, celulosa microcristalina y nanopartículas esféricas de celulosa microcristalina. (a) y (b) distribución de ancho de nanopartículas de celulosa de algodón y celulosa microcristalina, respectivamente; (c) y (d) distribución de longitud de nanopartículas de celulosa de algodón y celulosa microcristalina, respectivamente; (e) distribución en diámetro de nanopartículas esféricas [27].

Cuando se utilizó espectroscopía de infrarrojos para caracterizar la estructura de la celulosa, se observaron cambios estructurales de una estructura cristalina de celulosa tipo I a tipo II. Por ejemplo, después de la regeneración de la celulosa de algodón, las señales de vibración de estiramiento -CH se movieron de  $2901\text{ cm}^{-1}$  a  $2893\text{ cm}^{-1}$  (figura 2.3), la vibración de estiramiento de CO en C-6 cambió de  $1033\text{ cm}^{-1}$  a  $1025\text{ cm}^{-1}$ , y la vibración del COC del enlace  $\beta$ -glucosídico cambió de  $897\text{ cm}^{-1}$  a  $894\text{ cm}^{-1}$ , debido a cambios en los ángulos de torsión del enlace glucosídico. Tanto para la celulosa microcristalina como para las nanopartículas de la misma, los espectros mostraron fuertes vibraciones de estiramiento de OH unido a hidrógeno en el rango de  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ . Las señales de alrededor de  $1430$  y  $2900\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a la vibración de flexión  $\text{CH}_2$  (C6) y a la vibración de estiramiento CH, respectivamente. El agua adsorbida se puso de manifiesto por la presencia de un pico a  $1644\text{ cm}^{-1}$  de la flexión O-H. También se observaron las bandas de absorción de infrarrojo características relacionadas con la transición de celulosa I a celulosa II. Un análisis más profundo de los cambios estructurales se puede encontrar en la publicación de Han y colaboradores [27] y en sus referencias. La ausencia de las de bandas de absorción de  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$  sugiere que el IL fue eliminado con éxito del producto final. Las propiedades de las nanopartículas de celulosa regenerada producidas a partir de celulosa microcristalina y del algodón utilizando un tratamiento combinado de IL y homogeneización de alta presión sugieren su potencial aplicación en el campo de la biomedicina como sistemas de administración de fármacos, biomarcadores y excipientes de comprimidos, entre otros.



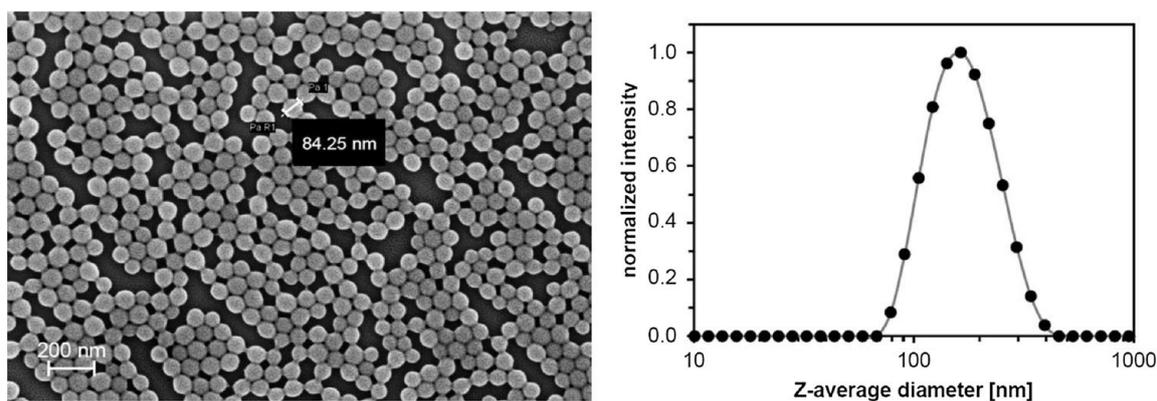
**Figura 2.3.** Espectro infrarrojo de algodón sin procesar (Cotton), celulosa microcristalina sin tratar (MCC) y nanopartículas de algodón (C-RCN) y celulosa microcristalina (M-RCN) [27].

La celulosa es susceptible de modificación debido a sus grupos hidroxilo; por ejemplo, la sililación es una vía posible para la síntesis de derivados solubles en agua, ampliando así el espectro de posibilidades. La sililación puede tener lugar en medios heterogéneos como piridina, o en medios homogéneos, como metilsulfóxido/LiCl. Sin embargo, en medios heterogéneos, la reacción no es uniforme en toda la macromolécula de celulosa y el uso de medios homogéneos presenta desventajas a la hora de emplearlo a gran escala ya que es difícil regenerar el medio. El grupo de investigación de Heinz [28] preparó nanopartículas de trimetilsililcelulosa aprovechando el poder solubilizante de los ILs y las capacidades de autoensamblaje de la celulosa metilada. En resumen, la celulosa se solubiliza primero en acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ( $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ ) 10% p/p, y se añade hexametildisilano en una relación molar de 3 a 1 en exceso con respecto a las unidades de glucosa de celulosa. Después de un tiempo de reacción de 1 hora a 80 °C, se obtuvo un grado de sustitución de 2.65. Las nanopartículas de trimetilsililcelulosa se dispersan en un disolvente orgánico como tetrahidrofurano o dimetilacetona y se dializan con agua. Se formaron nanopartículas de 170 nm en base al intercambio lento de un solvente orgánico contra un antidisolvente.

En otro estudio se han preparado compuestos de celulosa-magnetita mediante suspensión y dispersión de partículas de magnetita en una solución homogénea de celulosa en IL seguido de regeneración en agua y la posterior preparación de películas, flóculos, fibras o perlas. Los materiales preparados fueron ferromagnéticos, con una pequeña respuesta superparamagnética. La caracterización por difracción de rayos X mostró que la magnetita inicial no se alteró químicamente después de la encapsulación, con un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 25 nm [29].

### 2.2.2 *Xilano*

El xilano es el segundo polisacárido más abundante del reino vegetal después de la celulosa. Es el componente principal de la hemicelulosa, constituyendo del 25 al 35% de la biomasa de los tejidos leñosos de las dicotiledóneas y de los tejidos lignificados de las monocotiledóneas y hasta el 50% de algunos tejidos de los granos de cereales [30]. Tiene una columna vertebral lineal constituida por unidades de  $\beta$ -D-xilosa unidas por un enlace glicosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). El xilano normalmente presenta azúcares de cadena lateral como ácido 4-O-metil-glucurónico, ácido galacturónico y arabinosa. A partir de este polisacárido, Gerick y colaboradores [31] sintetizaron nanopartículas con un radio hidrodinámico de *ca.* 160 nm (Figura 2.4) de xilano modificado con grupos fenilcarbonato (grado de sustitución hasta 2.0). Para su síntesis, se agitaron 2 g de xilano y 18 g de [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] durante 1 h a 80 °C. Posteriormente, se agregaron 5 mL de piridina y se agitó durante 18 h a 80 °C. La solución se enfrió a 25°C bajo atmósfera de nitrógeno, luego se añadieron 15 mL de piridina seguido de 3.82 ml de cloroformiato de fenilo (60.8 mmol). Después de 3 h de reacción a 25 °C, la mezcla se vertió en 300 mL de agua helada. El precipitado se eliminó por filtración y se lavó dos veces con 150 mL de agua y dos veces con 150 mL de etanol. El producto crudo se disolvió en 40 mL de DMSO y luego se precipitó en 300 mL de etanol. Esta funcionalización permite que el biopolímero tenga abundantes centros electrófilos que permitan una mayor funcionalización con fármacos, moléculas de señalización, reconocimiento, etc. En la revisión de Petzold-Welcke se describen muchas otras modificaciones/funcionalizaciones del xilano [32]. Por ejemplo, la modificación de xilano con un grupo metilo puede usarse como tensioactivo polimérico y algunos ésteres mostraron buenas capacidades portadoras de fármacos. El sulfato de xilano se puede usar como fármaco antiviral y como inhibidor de la coagulación sanguínea.



**Figura 2.4.** Izquierda, imagen de microscopía electrónica de barrido de nanopartículas obtenidas por diálisis de fenil carbonato de xilano. Derecha, distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por dispersión dinámica de luz [31].

### 2.2.3 Almidón

El almidón es producido por plantas verdes para almacenar energía. Los gránulos de almidón se acumulan en altas concentraciones en estructuras reproductivas como granos de cereales (por ejemplo, trigo, arroz, maíz, cebada, centeno, avena, mijo, sorgo) y en estructuras vegetativas como tubérculos (patatas) y raíces (mandioca y taro) [33]. Las dos macromoléculas constituyentes del almidón son la amilosa y la amilopectina. La amilosa es el polímero lineal de unidades de D-glucopiranosas unidas por un enlace glicosídico  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). Su peso molecular varía de  $10^4$  a  $10^5$  con un grado de polimerización de 250-1000 unidades. La amilopectina es un polímero altamente ramificado de enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) y cadenas laterales de  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) con un peso molecular de  $10^6$ - $10^8$ , correspondiente a un DP de 5.000-50.000 unidades [34,35].

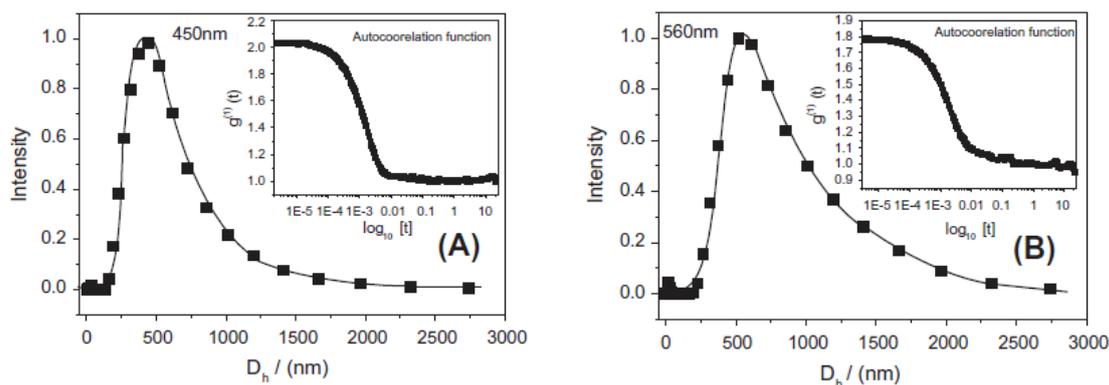
Zhou y colaboradores [36,37] prepararon nanopartículas de almidón con un diámetro medio controlado de 64-255 nm con una técnica de emulsión líquida formada por agua/líquido iónico (W/IL). Para preparar la fase acuosa, se disolvieron 0.5 g de almidón granular tratado con ácido en 9.5 g de solución de NaOH (20 M) y luego se añadieron a 40 g de [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] para formar la microemulsión W/IL con 40 g de una mezcla de tensioactivos TX-100 y 1-butanol (TX-100/1-butanol = 3:1, p/p). Después de varios minutos de agitación, se añadió 1.84 g de epíclorhidrina a la microemulsión anterior como agente entrecruzante y se mantuvo en agitación continua durante 4 horas a 50 °C. Posteriormente, la temperatura de la disolución fue equilibrada con la temperatura ambiente, y se utilizó metanol como antidisolvente para precipitar las nanopartículas de almidón. El precipitado se centrifugó y se lavó minuciosamente con suficiente metanol y etanol para eliminar la epíclorhidrina sin reaccionar, el IL y los

tensioactivos. Finalmente, el sólido se secó a vacío durante 24 h a 45 °C. En la bibliografía se pueden encontrar más ejemplos de síntesis de nanopartículas de almidón en emulsiones de IL [38–40]. Las capacidades de carga y liberación de fármacos de las nanopartículas de almidón se han ensayado con clorhidrato de mitoxantrona [37].

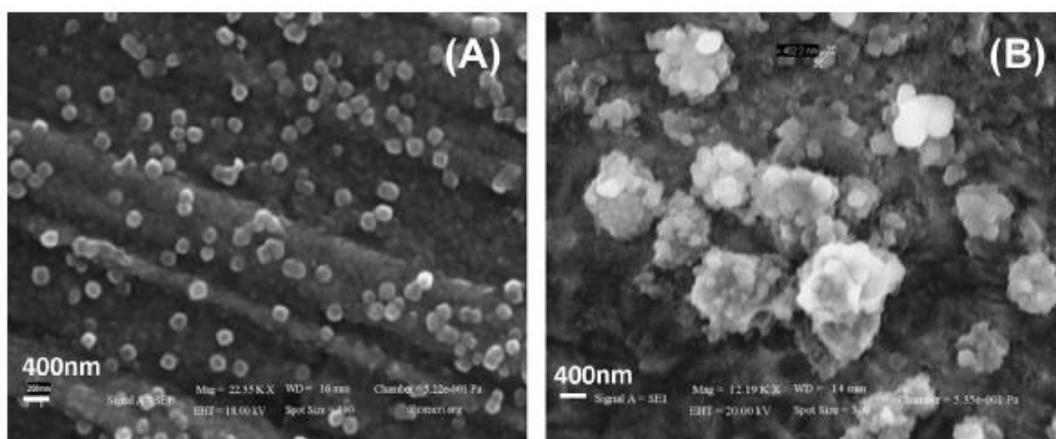
#### 2.2.4 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal constituido por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina enlazadas con enlaces  $\beta$  (1→4) aleatoriamente. El quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina mediante hidrólisis básica. La quitina está presente principalmente en el exoesqueleto de crustáceos, alas de insectos y paredes celulares de hongos y algas, entre otros. Las nanopartículas de quitosano se utilizan ampliamente en las industrias alimentaria y de bioingeniería para la encapsulación de ingredientes alimentarios activos, la inmovilización de enzimas, como vehículo para la administración controlada de fármacos y en la agricultura como agente antimicrobiano vegetal y promotor del crecimiento [41]. Por ejemplo, Torzsas y colaboradores [42] mostraron que el quitosano puede tener un papel importante en la protección contra el cáncer de colon.

Bharmoria y colaboradores [43], reportaron la síntesis de nanopartículas de quitosano utilizando IL como agentes de entrecruzamiento iónico en un método simple de autoensamblaje. Para ello, una disolución con octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{C}_8\text{OSO}_3^-]$ ) u cloruro de 1-octil-3-metilimidazolium ( $[\text{omim}^+][\text{Cl}^-]$ ) por encima de la concentración micelar crítica es añadida a una solución acuosa de quitosano. Las cadenas de quitosano son atraídas por las micelas de IL debido a las interacciones iónicas agregando la materia y gelificando la solución. Posteriormente, se utilizó acetona como antidisolvente para lograr una precipitación en forma de nanopartículas con un diámetro hidrodinámico medio en el rango de 300-560 nm (Figura 2.5) con potenciales-Z que pueden superar los +59 mV, dependiendo del IL utilizado. Los autores asumen que la interacción electrostática e hidrofóbica producida entre el quitosano y el IL dirige la formación de nanopartículas de quitosano, donde los agregados de IL actúan como plantillas. Imágenes de microscopía electrónica de barrido revelaron que las nanopartículas obtenidas a partir de soluciones de quitosano- $[\text{bmim}^+][\text{C}_8\text{OSO}_3^-]$  tienen mayor esfericidad y menor tendencia a aglomerarse que las equivalentes sintetizadas utilizando  $[\text{omim}^+][\text{Cl}^-]$  (Figura 2.6).



**Figura 2.5.** Distribución de diámetro hidrodinámico en intensidad de nanopartículas de quitosano formadas con (A)  $[bmim^+][C_8OSO_3^-]$  y (B)  $[omim^+][Cl^-]$  [43].



**Figura 2.6.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de nanopartículas formadas con (A)  $[bmim^+][C_8OSO_3^-]$  y (B)  $[omim^+][Cl^-]$  [43].

Las nanopartículas de quitosano se han ensayado previamente para la captación celular y el transporte a los ganglios linfáticos con resultados muy prometedores [44]. Además, las nanopartículas de quitosano son de especial interés para la administración oral de insulina, ya que la administración subcutánea presenta algunas desventajas como la falta de cumplimiento por parte del paciente y la hipoglucemia ocasional. Además de que estos últimos enfoques no imitan los patrones fisiológicos normales de liberación de insulina [45].

### 2.2.5 Fibroína de seda

Debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas, la SF obtenida de los capullos de *Bombyx mori* es un biomaterial atractivo para su uso en aplicaciones biomédicas tales como nanopartículas portadoras de fármacos y en ingeniería de tejidos [46]. Este biomaterial, formulado como partículas, tiene aplicaciones potenciales en medicina por su

capacidad para adsorber, transportar y liberar una amplia gama de moléculas bioactivas [47]. Como ya se ha comentado anteriormente, las sedas son insolubles en la mayoría de los disolventes, incluidos el agua, los ácidos diluidos y las soluciones alcalinas. Hay dos sistemas de disolventes clásicos para disolver SF: soluciones hidroalcohólicas iónicas, como una mezcla de  $\text{CaCl}_2$ /etanol/agua (reactivo de Ajisawa) [48] o soluciones acuosas iónicas, tradicionalmente  $\text{LiBr}$  9,3 M o solución de  $\text{CaCl}_2$  al 50% en peso [49]. Estas soluciones requieren ser dializadas durante 48 h contra agua ultrapura utilizando una membrana de celulosa semipermeable (cut-off 3.5 kDa) para eliminar sales, pigmentos, péptidos pequeños y otras impurezas de la solución de seda. Ambos procesos requieren mucho tiempo y las soluciones son inestables y se agregan a un estado de gel. Para el almacenamiento a largo plazo, las soluciones acuosas de SF se pueden liofilizar y redisolverse en disolventes orgánicos como el hexafluoroisopropanol (HFIP). Sin embargo, estos disolventes son tóxicos y extremadamente corrosivos y requieren un especial cuidado durante su manipulación [50].

Varios trabajos publicados recientemente en la bibliografía han demostrado la idoneidad de algunos líquidos iónicos basados en imidazolio, (ejemplo:  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ ) como disolventes para formar soluciones de SF estables [21]. Dentro de un líquido iónico, el anión juega un papel más importante sobre la solubilidad final de la SF, la cual es atribuida a la capacidad del anión para interrumpir los enlaces de hidrógeno de las láminas  $\beta$  presentes en la SF para formar soluciones (principalmente halógenos o pequeños carboxilatos) [51]. El uso de ILs como disolventes tiene la ventaja de que se reduce el número total de etapas necesarias para el proceso de disolución y, además, el capullo se puede disolver directamente porque la otra proteína de la seda, la sericina, también puede disolverse seleccionando el IL adecuado. Sin embargo, la disolución completa de SF utilizando los métodos clásicos descritos anteriormente lleva varias horas, incluso con un calentamiento intenso a 100 °C [21], con la consiguiente pérdida de la integridad de la proteína. Los tratamientos prolongados provocan la rotura de las cadenas peptídicas y las malas propiedades mecánicas de los biomateriales resultantes. Por otro lado, el proceso de disolución de la seda se puede mejorar aplicando ultrasonidos de alta potencia a la mezcla SF/IL para acelerar el proceso y añadiendo agua para reducir la viscosidad. Los ultrasonidos de alta potencia tienen dos efectos sinérgicos importantes en la mezcla: calentamiento rápido y rotura eficiente de las fibras al mismo tiempo. Aplicando el método de precipitación comúnmente utilizado para la coagulación de una solución acuosa de SF en un disolvente orgánico miscible en agua, es posible obtener partículas de SF regenerada [52].

Lozano-Pérez y colaboradores [23] estudiaron la disolución de la SF de *Bombyx mori* en el estado cristalino de las fibras enteras en IL utilizando un baño de aceite como fuente de calor.

## Capítulo 2

La Tabla 2.1 resume los resultados de la cantidad máxima de SF capaz de ser disuelta. La disolución completa consume más de 1 h a 100 °C, como describen Phillips y colaboradores [21]. Las solubilidades saturadas en peso para SF en cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio dependen de la longitud del sustituyente alquilo del anillo imidazolio, como se puede observar en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Solubilidad (% peso) de SF en diferentes IL a 90 °C (calentado en un baño de aceite) [23].

IL	Solubilidad SF (% p/p)	IL	Solubilidad SF (% p/p)
[mim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Soluble (>12%)	[eim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>
[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Soluble (>23%)	[emim <sup>+</sup> ][EtSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>
[pmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Soluble (>15%)	[emim <sup>+</sup> ][TfO <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Soluble (>12%)	[bmim <sup>+</sup> ][C <sub>8</sub> OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>
[hmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Soluble (>11%)	[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>
[omim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>	ETAN	Insoluble <sup>a</sup>
[dmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Insoluble <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> Después de 24 h a 90 °C.

<sup>b</sup> Para obtener el nombre completo de los ILs, consulte la tabla de abreviaturas.

Se comprobó que los cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio son capaces de romper los enlaces de hidrógeno en la SF y son buenos disolventes para la disolución de la SF cuando la longitud de la cadena de alquilo es inferior a ocho carbonos [21]. La hidrofobicidad del catión orgánico aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión, de modo que los ILs de cadena alifática larga no pueden disolver SF. Asimismo, los ILs con aniones altamente hidrófobos no pueden actuar como disolventes de SF.

Las proteínas de la seda se disolvieron con éxito en los cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio (donde 1-alkilo es: metil [mim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]; etil [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]; propil [pmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]; butil [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] o hexil [hmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]) utilizando ultrasonidos de alta potencia y limitando la temperatura a 100 °C. La solubilidad saturada en peso y el tiempo requerido para la disolución de la seda en los ILs seleccionados se muestran en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Solubilidad y tiempo necesarios para la disolución de SF en diferentes ILs [23].

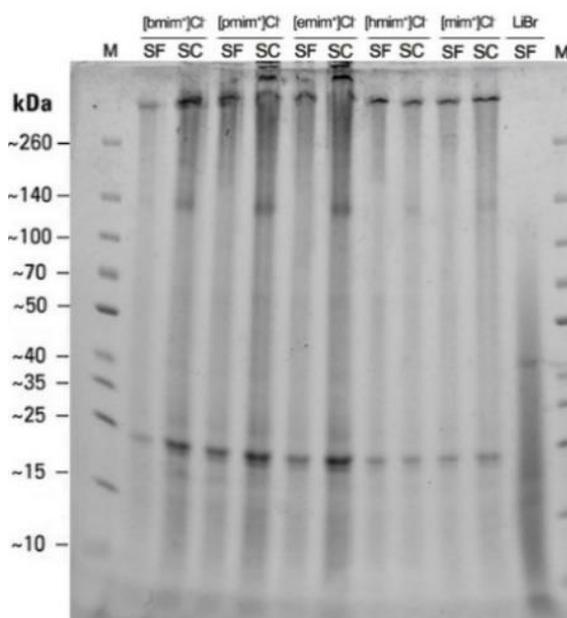
IL	Fibroína de seda (SF)		Capullo de seda (SC)	
	Solubilidad (%p/p)	Tiempo (min.)	Solubilidad (%p/p)	Tiempo (min.)
[mim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	12.5 ± 0.1	4	12.5 ± 0.1	17
[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	23.0 ± 0.3	17	18.7 ± 0.6	67
[pmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	15.2 ± 0.3	14	17.6 ± 0.1	27
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	12.7 ± 0.6	5	12.9 ± 0.4	24
[hmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	10.9 ± 0.2	8	11.1 ± 0.3	20

La solubilidad se presenta como el valor promedio ± desviación estándar (n = 3).

En un baño de aceite a 100 ° C, el proceso de calentamiento térmico de la disolución de SF o del capullo de seda (SC) en IL es un proceso que tarda horas, pero en cambio, mediante el uso de ultrasonidos, se logra una reducción significativa en el tiempo necesario para completar la disolución. La ruptura de la red de enlaces de hidrógeno de la lámina β de las proteínas fue mejorado considerablemente mediante el uso de ultrasonidos de alta potencia.

Aunque la solubilidad de la SF en [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] fue del 23%, para la formación de partículas no es conveniente alcanzar una concentración superior al 10% (p/p), ya que el aumento de la viscosidad que se produce representa una desventaja para la manipulación de la disolución.

La integridad de la SF en las disoluciones de SF/IL se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Se encontró que la fragmentación de la cadena peptídica que ocurre cuando se utilizan los métodos de disolución clásicos, se reduce drásticamente en el proceso con IL y ultrasonido de alta potencia. En la Figura 2.7 se puede observar que las masas moleculares de los fragmentos de las disoluciones SF/IL son prácticamente iguales a las del SF presente en la glándula del gusano de seda [53].



**Figura 2.7.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio de los componentes proteicos de la fibroína de seda (SF) y los capullos de seda blanca (SC) después del uso de ultrasonidos de alta potencia en las soluciones SC/IL o SF/IL con IL: [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], [pmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] y [mim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] [23].

El proceso final de preparación de SFN a partir de disoluciones SF/IL se resume en la Figura 2.8. El procedimiento se basa en el método descrito anteriormente por Zhang y colaboradores, con modificaciones [52]. En resumen, a la disolución de SF/IL recién preparada se le añadió agua ultrapura para reducir su viscosidad y la disolución de SF/IL/H<sub>2</sub>O se vertió lentamente en 100 mL de metanol frío agitado vigorosamente. Después de algunas gotas, apareció una suspensión de color blanco lechoso y la suspensión se agitó durante 2 horas. La suspensión de partículas se recuperó mediante centrifugación a 18.000g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante (libre de partículas) se eliminó y se reservó para el reciclaje posterior del IL. El precipitado blanco se sometió a sucesivos lavados con metanol fresco y agua ultrapura. Después de liofilizar las partículas durante 72 h a 0.5 mbar y -55 °C (Liofilizador Edwards Modulyo 4K), se obtuvieron SFN en forma de polvo seco. Se utilizó un rotavapor a 80 mbar y 80 °C para recuperar el IL de las fracciones metanólica y de agua.



**Figura 2.8.** Esquema del proceso general de disolución de SF, utilizando IL y ultrasonidos, y la consiguiente preparación de SFN a partir de la disolución SF/IL [23].

En general, la disolución de SF en ILs se puede regenerar como nanopartículas vertiendo una disolución de SF/IL en un exceso de un disolvente orgánico polar. En este caso, se utilizó metanol para la regeneración de SF. Cuando la IL se disuelve en metanol a partir de la disolución SF/IL, la SF cambia de forma de espiral aleatoria y hélice  $\alpha$  a forma de lámina  $\beta$  antiparalela mediante la reconstitución de la red de enlaces de hidrógeno de las cadenas de proteínas [52].

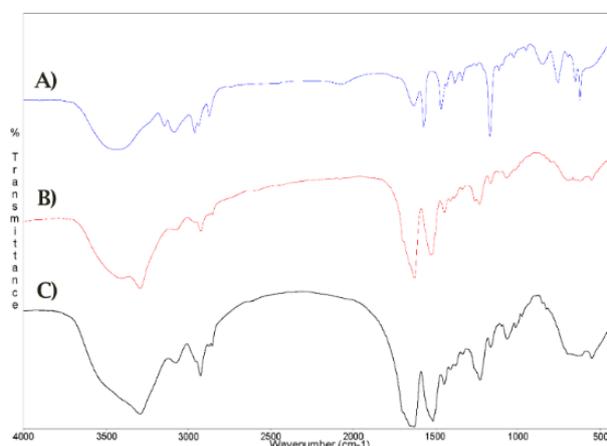
Las partículas se caracterizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopía infrarroja (FTIR). La estabilidad de las partículas se estudió en agua purificada a 25 °C y en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (sin suplementación con Suero Fetal Bovino (FBS)) a 37 °C. En agua MilliQ a 25 °C, los SFN tenían un tamaño promedio de 170–184 nm medido por DLS. Los resultados indican que las partículas eran ligeramente más grandes (183–341 nm) cuando se dispersaban en DMEM (ver Tabla 2.3); estos resultados concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía correspondiente [52,54].

**Tabla 2.3.** Valores comparativos del diámetro hidrodinámico medio ponderado por intensidad (*Z-average*), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial-Z de las SFN clásicas [52] obtenidas a partir del disolvente CaCl<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O y los SFN producidos a partir de una disolución SF/IL [23].

Disolvente	Agua MilliQ a 25 °C			DMEM a 37 °C		
	<i>Z-average</i> <sup>a</sup> (nm)	Pdl <sup>b</sup>	Potencial-Z <sup>a</sup> (mV)	<i>Z-average</i> <sup>a</sup> (nm)	Pdl <sup>b</sup>	Potencial-Z <sup>a</sup> (mV)
CaCl <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O	174 ± 2	0.121	-26 ± 1	183 ± 3	0.140	-12 ± 1
[mim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	177 ± 4	0.153	-27 ± 1	208 ± 4	0.115	-12 ± 1
[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	181 ± 3	0.230	-26 ± 1	341 ± 9	0.393	-12 ± 2
[pmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	175 ± 4	0.129	-28 ± 1	211 ± 4	0.076	-12 ± 1
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	184 ± 5	0.212	-25 ± 1	235 ± 4	0.245	-12 ± 2
[hmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	176 ± 3	0.140	-28 ± 1	200 ± 3	0.133	-11 ± 1

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (n = 5) y tiempos de acumulación = 100. <sup>b</sup> Valor medio.

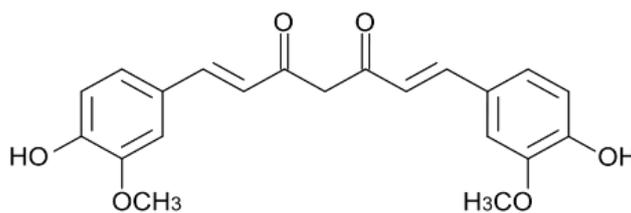
En la Figura 2.9 se muestra un espectro FTIR comparativo de [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], SFN regenerada a partir de una solución SF/[bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] y SFN regenerada a partir de una solución clásica de CaCl<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O, obtenidas mediante el método clásico de Zhang [52]. Como se puede observar, la lámina β es predominante en partículas con picos a 1230 cm<sup>-1</sup> (Amida III, principalmente flexión NH y estiramiento CN en fase), 1516 cm<sup>-1</sup> (Amida II, principalmente flexión NH y estiramiento CN fuera de fase) y 1626 cm<sup>-1</sup> (Amida I, principalmente estiramiento C=O), que son típicos de la conformación de la lámina β [27]. El perfil de SFN fue similar a los de los SFN obtenidos por inmersión en metanol de SF disuelta en el sistema de disolventes de Ajisawa [52,55]. Las señales características del IL (1572, 1465 y 1170 cm<sup>-1</sup>) estaban ausentes en el espectro registrado de SFN obtenidas a partir de la disolución de SF en [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], lo que indica que el IL se eliminó eficazmente de las SFN.



**Figura 2.9.** Espectros infrarrojos de A) [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]; B) SFN regenerada a partir de solución SF/[bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]; C) SFN regenerada a partir de una solución clásica de CaCl<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O [23].

### 2.2.6 Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con curcumina utilizando IL

La curcumina ((1E, 6E) -1,7-Bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona, Figura 2.10) es un polifenol hidrófobo derivado de la cúrcuma: el rizoma de la planta *Curcuma longa* [56]. Desde el punto de vista químico, la curcumina es una  $\beta$ -dicetona bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada (también llamada diferuloilmetano) que presenta tautomería ceto-enólica, con una forma enólica estable en medios alcalinos y una forma cetogénica predominante en soluciones ácidas y neutras. La curcumina comercial es una mezcla de curcuminoides (aproximadamente 77% de diferuloilmetano, 18% de demetoxicurcumina y 5% de bisdemetoxicurcumina) [57]. La *Curcuma longa* crece principalmente en China e India, aunque también está presente en el resto del continente asiático y se ha utilizado ampliamente en la medicina ayurvédica durante siglos [58]. Sus efectos farmacológicos más relevantes son sus actividades antiinflamatorias [59], anticancerígenas [57], antioxidantes [60] y antimicrobianas [60].



**Figura 2.10.** Estructura química de la curcumina [5].

Aunque se ha demostrado en numerosos estudios que la curcumina es segura, no tóxica y bien tolerada en animales y humanos, no puede administrarse directamente a los pacientes debido a su escasa solubilidad en agua [56] (valor estimado: 3.12 mg/L a 25 °C [61]). En un intento por mejorar la eficacia terapéutica de la curcumina, se ha intentado aumentar su biodisponibilidad. Varios nanoportadores, como nanopartículas lipídicas sólidas [62], nanopartículas poliméricas naturales [63] o sintéticas [64] y nanopartículas inorgánicas [65] se pueden encontrar en la bibliografía como ejemplos de nanoplataformas para el suministro intracelular de curcumina. Recientemente, el interés de los investigadores se centra en el uso de biopolímeros como la SF para encapsular curcumina y otros fármacos similares [66]. Debido a su pequeño tamaño, las SFN pueden penetrar en los capilares, lo que favorece la absorción de fármacos por las células. Además, estas SFN son posibles sistemas de administración dirigida porque, por ejemplo, pueden administrar específicamente fármacos antitumorales a las células tumorales. Varios grupos de investigación han estudiado la encapsulación de curcumina en SFN mediante diferentes técnicas [67,68].

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo [5] estudió la síntesis de SFN cargadas con curcumina (Curc-SFN) con el objetivo de mejorar los métodos usados anteriormente, utilizando IL (acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]) y ultrasonidos de alta potencia para disolver la SF. La síntesis de Curc-SFN desarrollada es una opción de procesamiento más escalable y continua que las ya publicadas en la bibliografía. El fármaco se cargó en las SFN mediante adsorción física, Curc-SFN 1, y mediante coprecipitación, Curc-SFN 2, para obtener Curc-SFN.

Para la carga de curcumina por adsorción física, se usaron cuarenta mililitros de una solución de curcumina en etanol de 1 mg/mL para dispersar 325 mg de SFN obtenidas a partir de una disolución de SF/IL. La suspensión se sometió a ultrasonidos durante 5 min y se agitó suavemente a 30 rpm en un agitador orbital durante 24 h. A continuación, se centrifugaron las Curc-SFN 1 durante 15 min a 13400 rpm. Finalmente, se lavaron las Curc-SFN 1 con agua para eliminar los restos de etanol. El fármaco cargado en las nanopartículas se determinó indirectamente mediante la medición de la absorbancia UV de la curcumina a 421 nm en los sobrenadantes de centrifugación (etanol y agua) y en la solución de curcumina inicial.

Para obtener Curc-SFN 2 por coprecipitación, el fármaco se cargó en las nanopartículas durante el proceso de síntesis. En resumen, se disolvió una cantidad exactamente pesada de curcumina (25 mg) en 3 mL de solución de NaOH 0,1 M y esta solución se disolvió inmediatamente en 5 g de una disolución de SF/IL preparada previamente (10% en peso). La disolución de fármaco-SF/IL se calentó a 60 °C para reducir la viscosidad de la mezcla y se roció mediante un spray con nitrógeno sobre 100 mL de metanol agitado. La suspensión naranja se agitó durante 2 h antes de centrifugar a 13400 rpm durante 15 min, a 4 °C. En este caso, se realizaron tres lavados con agua para eliminar la IL y los restos de metanol. Finalmente, la dispersión fue liofilizada para obtener las SFN secas.

El contenido de carga de fármaco (DLC) y la eficiencia de encapsulación (EE) de las Curc-SFN 1 y Curc-SFN 2 obtenidas se calcularon de acuerdo con las siguientes expresiones a partir de las medidas de absorbancia UV-Vis de la curcumina:

$$DLC = \frac{\textit{masa del fármaco en nanopartículas}}{\textit{masa de nanopartículas cargadas}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

$$EE = \frac{\textit{masa del fármaco en nanopartículas}}{\textit{masa inicial del fármaco en la disolución de carga}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Como se observa en la Tabla 2.4, los valores de DLC en los ensayos de adsorción física fueron más altos que en los experimentos de coprecipitación, probablemente debido a que la relación de masa de curcumina/SF inicial era mucho más alta en los experimentos de adsorción física. Sin embargo, los valores de EE fueron aproximadamente del 50% para ambos tipos de nanopartículas. DLC y EE están en el mismo orden o incluso son mayores que los encontrados en la bibliografía [69,70].

**Tabla 2.4.** Carga de fármacos y eficacia de encapsulación de las Curc-SFN [5].

	Curc-SFN 1 <sup>a</sup>	Curc-SFN 2 <sup>a</sup>
DLC (%)	6.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1
EE (%)	54 ± 1	49 ± 3

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (n = 3)

El diámetro hidrodinámico medio ponderado por intensidad (*Z-average*), el índice de polidispersidad, PDI y el potencial-Z de todas las nanopartículas obtenidas se midieron mediante DLS y análisis de fase por dispersión de luz (PALS), respectivamente. Todas las medidas se realizaron en agua ultrapura a 25 °C. Los valores medios de las mediciones realizadas por triplicado se presentan en la Tabla 2.5. Los resultados mostraron que el *Z-average* de las SFNs fue menor que el de las partículas con curcumina, mientras que los valores de PDI fueron similares e inferiores a 0.15 para todos los tipos de nanopartículas, resultando distribuciones de tamaño prácticamente monodispersas. El Potencial-Z de las nanopartículas con y sin curcumina fue altamente negativo y del mismo orden de magnitud, lo que indica su elevada estabilidad coloidal y superior a los valores encontrados en estudios previos que sintetizan SFN por métodos clásicos [52,69], lo que refleja la mejora de la estabilidad de las SFN y, por tanto, de las Curc-SFN obtenidas con este nuevo procedimiento.

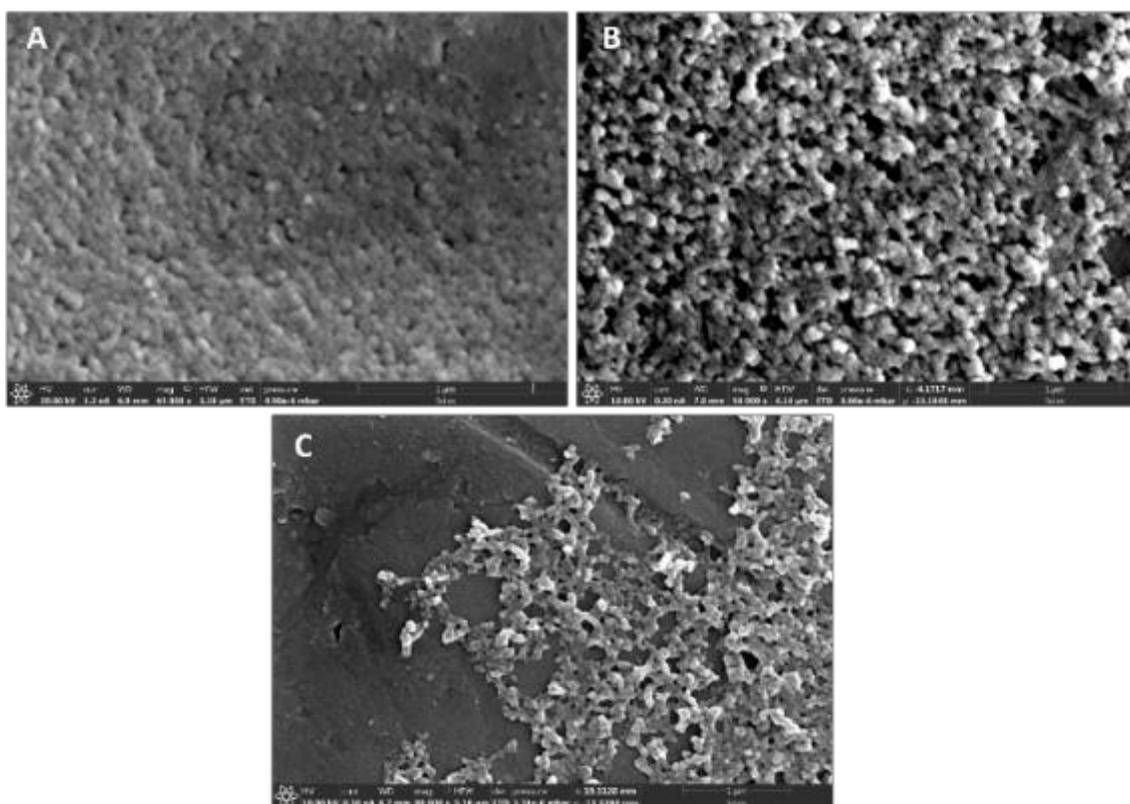
**Tabla 2.5.** Caracterización física de las Curc-SFN [5].

	Potencial-Z (mV) <sup>a</sup>	<i>Z-average</i> (nm) <sup>a</sup>	PdI <sup>a</sup>
Curc-SFN 1	-43 ± 3	166 ± 1	0.114 ± 0.003
Curc-SFN 2	-46 ± 5	171 ± 3	0.106 ± 0.017
SFN	-41 ± 1	158 ± 2	0.132 ± 0.011

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (n = 3)

## Capítulo 2

La morfología de las nanopartículas se examinó mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM). Como se puede observar en la Figura 2.11, SFN y Curc-SFN 1 presentan morfología nanoesférica. Sin embargo, las Curc-SFN 2 tienen una forma alargada. Las micrografías de FESEM mostraron tamaños más pequeños que las mediciones de DLS. Esto podría deberse al hinchamiento de las nanopartículas en la suspensión en agua emplada para las medidas de DLS. Esta diferencia también se ha observado en investigaciones anteriores [52,69].



**Figura 2.11.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de A) SFN B) Curc-SFN 1 and c) Curc-SFN 2 [5].

Las Curc-SFN obtenidas en este trabajo mejoraron la actividad antitumoral de la curcumina hacia las dos líneas celulares tumorales diferentes estudiadas (carcinoma hepatocelular, Hep3B y neuroblastoma humano, Kelly Cells), mientras que la viabilidad de las células sanas (células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana, hBMSCs) no disminuyó, lo que amplía la posibilidad de utilizar estas SFN, que han sido sintetizadas por un proceso fácilmente escalable a la industria, como sistemas futuros para otros fármacos de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, como la curcumina.

### 2.3. Conclusiones

El procesamiento de biopolímeros con IL es una tecnología nueva y emergente para la síntesis de nanopartículas. Los IL presentan una presión de vapor negligente, son no inflamables y fácilmente reciclables, una combinación que los categoriza como disolventes “verdes” y seguros para el operario. Hemos discutido el uso de diferentes biopolímeros, como celulosa, xilano, almidón, quitosano, queratina y SF, para la obtención de nanopartículas en procesos que involucran ILs. Se han sintetizado SFN mediante una nueva metodología que utiliza ultrasonidos de alta potencia para mejorar la disolución de la proteína en el IL. A partir de una disolución de SF/IL, se obtuvieron SFN mediante la regeneración de la SF en un disolvente orgánico polar. Las SFN mostraron un alto contenido en lámina  $\beta$ , similar al de las fibras nativas de SF. De esta manera, grandes cantidades de seda se pueden convertir en biomateriales directamente a partir de la disolución de SF/IL, para su uso en una amplia gama de aplicaciones. Centrándose en la aplicación biomédica, las Curc-SFN se sintetizaron con éxito mediante dos procedimientos respetuosos con el medio ambiente que utilizan IL y ultrasonidos de elevada potencia para disolver la SF. Se obtuvieron valores elevados de DLC y EE en ambos casos en comparación con los de la bibliografía. Las SFN y las Curc-SFN obtenidas mostraron una estrecha distribución de tamaños, con un diámetro hidrodinámico  $<175$  nm, y un potencial-Z elevado (en términos absolutos), lo que las convierte en excelentes nanoportadores para su uso en tratamientos terapéuticos



## Referencias

- Hyun Lee, S.; Miyauchi, M.; Dordick, J.S.; Linhardt, R.J. Preparation of Biopolymer-Based Materials Using Ionic Liquids for the Biomedical Application. *Am. Chem. Soc.* **2010**, *10*, 115–134.
- Nitta, S.K.; Numata, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1629–54.
- Yih, T.C.; Al-Fandi, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97*, 1184–1190.
- Lozano-Pérez, A.A.; Rivero, H.C.; Pérez Hernández, M. del C.; Pagán, A.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Cénis, J.L. Silk fibroin nanoparticles: Efficient vehicles for the natural antioxidant quercetin. *Int. J. Pharm.* **2017**, *518*, 11–19.
- Montalbán, M.; Coburn, J.; Lozano-Pérez, A.; Cenis, J.; Villora, G.; Kaplan, D. Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 126.
- Gomez-Murcia, V.; Montalban, M.G.; Gomez-Fernandez, J.C.; Almela, P. Development of Poly(lactide-co-glicolide) Nanoparticles Incorporating Morphine Hydrochloride to Prolong its Circulation in Blood. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 2015–2025.
- Ahmed, T.A.; El-Say, K.M. Development of alginate-reinforced chitosan nanoparticles utilizing W/O nanoemulsification/internal crosslinking technique for transdermal delivery of rabeprazole. *Life Sci.* **2014**, *110*, 35–43.
- Damgé, C.; Maincent, P.; Ubrich, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 163–170.
- Werfel, T.; Duvall, C. Polymeric nanoparticles for gene delivery. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*; Elsevier, 2016; pp. 147–188 ISBN 9780081005200.
- Yang, Y.-Y.; Wang, Y.; Powell, R.; Chan, P. Polymeric core-shell nanoparticles for therapeutics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 557–562.
- Elzoghby, A.O.; Samy, W.M.; Elgindy, N.A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 38–49.
- Mohammad Fauzi, A.H.; Amin, N.A.S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16*, 5770–5786.
- Keskin, S.; Kayrak-Talay, D.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 150–180.
- Montalbán, M.G.; Hidalgo, J.M.; Collado-González, M.; Díaz Baños, F.G.; Villora, G. Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri*: Correlation with structure and composition. *Chemosphere* **2016**, *155*, 405–414.
- Mudring, A.-V.; Alammari, T.; Bäcker, T.; Richter, K. Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids. In; 2010; pp. 177–188.
- Anastas, P.T.; Warner, J.C. 12 Principles of Green Chemistry Available online: <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html> (accessed on Oct 11, 2018).

## Capítulo 2

17. Torimoto, T.; Okazaki, K.; Kiyama, T.; Hirahara, K.; Tanaka, N.; Kuwabata, S. Sputter deposition onto ionic liquids: Simple and clean synthesis of highly dispersed ultrafine metal nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 243117.
18. Zhu, Y.-J.; Wang, W.-W.; Qi, R.-J.; Hu, X.-L. Microwave-Assisted Synthesis of Single-Crystalline Tellurium Nanorods and Nanowires in Ionic Liquids. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 1410–1414.
19. Bühler, G.; Feldmann, C. Microwave-Assisted Synthesis of Luminescent LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb Nanocrystals in Ionic Liquids. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 4864–4867.
20. Swatloski, R.P.; Spear, S.K.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4974–4975.
21. Phillips, D.M.; Drummy, L.F.; Conrady, D.G.; Fox, D.M.; Naik, R.R.; Stone, M.O.; Trulove, P.C.; De Long, H.C.; Mantz, R.A. Dissolution and Regeneration of *Bombyx mori* Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14350–14351.
22. Flannigan, D.J.; Hopkins, S.D.; Suslick, K.S. Sonochemistry and sonoluminescence in ionic liquids, molten salts, and concentrated electrolyte solutions. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 3513–3517.
23. Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cragolini, F.; Cenis, J.L.; Villora, G. Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *132*, 1–8.
24. Schlufter, K.; Schmauder, H.P.; Dorn, S.; Heinze, T. Efficient homogeneous chemical modification of bacterial cellulose in the ionic liquid 1-N-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 1670–1676.
25. Gautam, S.P.; Bundela, P.S.; Pandey, a K.; Awasthi, M.K.; Sarsaiya, S. A review on systematic study of cellulose. *J. Appl. Nat. Sci.* **2010**, *2*, 330–343.
26. Ashby, M.F.; Gibson, L.J.; Wegst, U.; Olive, R. The Mechanical Properties of Natural Materials. I. Material Property Charts. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1995**, *450*, 123–140.
27. Han, J.; Zhou, C.; French, A.D.; Han, G.; Wu, Q. Characterization of cellulose II nanoparticles regenerated from 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 773–781.
28. Köhler, S.; Liebert, T.; Heinze, T. Interactions of ionic liquids with polysaccharides. VI. Pure cellulose nanoparticles from trimethylsilyl cellulose synthesized in ionic liquids. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 4070–4080.
29. Swatloski, R.; Holbrey, J.; Weston, J.L.; Rogers, R.D. Preparation of magnetic cellulose composites using ionic liquids. *Chim. OGGI-CHEMISTRY TODAY* **2006**, *24*, 31.
30. Ebringerová, A.; Heinze, T. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 542–556.
31. Gericke, M.; Gabriel, L.; Geitel, K.; Benndorf, S.; Trivedi, P.; Fardim, P.; Heinze, T. Synthesis of xylan carbonates – An approach towards reactive polysaccharide derivatives showing self-assembling into nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *193*, 45–53.
32. Petzold-Welcke, K.; Schwikal, K.; Daus, S.; Heinze, T. Xylan derivatives and their application

- potential - Mini-review of own results. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *100*, 80–88.
33. Ross, A.S. Starch in Foods. *Food Carbohydr. Chem.* **2013**, 107–133.
  34. Pérez, S.; Baldwin, P.M.; Gallant, D.J. *Structural Features of Starch Granules I*; Third Edit.; Elsevier Inc., 2009; ISBN 9780127462752.
  35. Jane, J. *Structural Features of Starch Granules II*; Third Edit.; Elsevier Inc., 2009; ISBN 9780127462752.
  36. Zhou, G.; Luo, Z.; Fu, X. Preparation and characterization of starch nanoparticles in ionic liquid-in-oil microemulsions system. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 105–110.
  37. Zhou, G.; Luo, Z.; Fu, X. Preparation of starch nanoparticles in a water-in-ionic liquid microemulsion system and their drug loading and releasing properties. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8214–8220.
  38. Zhigang, L.; Linrong, S.; Meina, Z. Preparation of Starch Nanoparticles in a New Ionic Liquid-in-Oil Microemulsion. *J. Formul. Sci. Bioavailab.* **2018**, *01*.
  39. Wang, X.; Cheng, J.; Ji, G.; Peng, X.; Luo, Z. Starch nanoparticles prepared in a two ionic liquid based microemulsion system and their drug loading and release properties. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 4751–4757.
  40. Ji, G.; Luo, Z.; Xiao, Z.; Peng, X. Synthesis of starch nanoparticles in a novel microemulsion with two ILs substituting two phases. *J. Mater. Sci.* **2016**, *51*, 7085–7092.
  41. Divya, K.; Jisha, M.S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16*, 101–112.
  42. Torzsas, T.L.; Kendall, C.W.C.; Sugano, M.; Iwamoto, Y.; Rao, A. V. The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CF1 mice. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 73–77.
  43. Bharmoria, P.; Singh, T.; Kumar, A. Complexation of chitosan with surfactant like ionic liquids: Molecular interactions and preparation of chitosan nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *407*, 361–369.
  44. Kobiasi, M. Al; Chua, B.Y.; Tonkin, D.; Jackson, D.C.; Mainwaring, D.E. Control of size dispersity of chitosan biopolymer microparticles and nanoparticles to influence vaccine trafficking and cell uptake. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2012**, *100 A*, 1859–1867.
  45. Sonia, T.A.; Sharma, C.P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 784–792.
  46. Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. New Opportunities for an Ancient Material. *Science (80-. )*. **2010**, *329*, 528–531.
  47. Hofmann, S.; Wong Po Foo, C.T.; Rossetti, F.; Textor, M.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L.; Merkle, H.P.; Meinel, L. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 219–227.
  48. Ajisawa, A. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.* **1997**, *67*, 91–94.
  49. Asakura, T.; Watanabe, Y.; Uchida, A.; Minagawa, H. NMR of silk fibroin. Carbon-13 NMR

## Capítulo 2

- study of the chain dynamics and solution structure of *Bombyx mori* silk fibroin. *Macromolecules* **1984**, *17*, 1075–1081.
50. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631.
  51. Wang, Q.; Yang, Y.; Chen, X.; Shao, Z. Investigation of rheological properties and conformation of silk fibroin in the solution of AmimCl. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1875–1881.
  52. Zhang, Y.-Q.Q.; Shen, W.-D. De; Xiang, R.-L.L.; Zhuge, L.-J.J.; Gao, W.-J.J.; Wang, W.-B.B. Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J. Nanoparticle Res.* **2007**, *9*, 885–900.
  53. Yamada, H.; Nakao, H.; Takasu, Y.; Tsubouchi, K. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Mater. Sci. Eng. C* **2001**, *14*, 41–46.
  54. Kundu, J.; Chung, Y. Il; Kim, Y.H.; Tae, G.; Kundu, S.C. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int. J. Pharm.* **2010**, *388*, 242–250.
  55. Cao, Z.; Chen, X.; Yao, J.; Huang, L.; Shao, Z. The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter* **2007**, *3*, 910.
  56. Bhawana; Basniwal, R.K.; Buttar, H.S.; Jain, V.K.; Jain, N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2056–61.
  57. Anand, P.; Sundaram, C.; Jhurani, S.; Kunnumakkara, A.B.; Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* **2008**, *267*, 133–164.
  58. Wilken, R.; Veena, M.S.; Wang, M.B.; Srivatsan, E.S. Curcumin: A Review of Anti-Cancer Properties and Therapeutic Activity in Head & Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 12.
  59. Kohli, K.; Ali, J.; Ansari, M.J.; Raheman, Z. Cur cumin : A natural antiinflammatory agent Curcumin : *Indian J Pharmacol* **2005**, *37*, 141–147.
  60. Mahmood, K.; Zia, K.M.; Zuber, M.; Salman, M.; Anjum, M.N. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 877–890.
  61. US EPA, Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov. 2012.
  62. Hassan, H.A.; Florentin, M.; Sandrine, B.N.I.; Pierrick, D.; Jordane, J.; Michel, L. Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: influence of nanoparticles size on drug loading. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, n/a-n/a.
  63. Anitha, A.; Maya, S.; Deepa, N.; Chennazhi, K.P.; Nair, S. V.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 452–461.
  64. Akl, M.A.; Kartal-Hodzic, A.; Oksanen, T.; Ismael, H.R.; Afouna, M.M.; Yliperttula, M.; Samy, A.M.; Viitala, T. Factorial design formulation optimization and in vitro characterization of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for colon delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *32*, 10–20.
  65. Bhandari, R.; Gupta, P.; Dziubla, T.; Hilt, J.Z. Single step synthesis, characterization and

- applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *67*, 59–64.
66. Hu, K.; Huang, X.; Gao, Y.; Huang, X.; Xiao, H.; McClements, D.J. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chem.* **2015**, *182*, 275–281.
  67. Xie, M.-B. Bin; Li, Y.; Zhao, Z.; Chen, A.-Z.Z.; Li, J.-S.S.; Hu, J.-Y.Y.; Li, G.; Li, Z. Solubility enhancement of curcumin via supercritical CO<sub>2</sub> based silk fibroin carrier. *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *103*, 1–9.
  68. Song, W.; Muthana, M.; Mukherjee, J.; Falconer, R.J.; Biggs, C.A.; Zhao, X. Magnetic-Silk Core–Shell Nanoparticles as Potential Carriers for Targeted Delivery of Curcumin into Human Breast Cancer Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 1027–1038.
  69. Xiao, L.; Lu, G.; Lu, Q.; Kaplan, D.L. Direct Formation of Silk Nanoparticles for Drug Delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 2050–2057.
  70. Tian, Y.; Jiang, X.; Chen, X.; Shao, Z.; Yang, W. Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 7393–7398.



## Capítulo 3

# Influencia del proceso de desgomado en las propiedades de las nanopartículas de fibroína de seda

**Resumen:** Varios estudios previos han demostrado que el proceso que se utiliza para la eliminación de sericina de la seda, conocido como desgomado, tiene un gran impacto en la integridad de la SF y, en consecuencia, en las propiedades mecánicas y/o bioquímicas de los biomateriales obtenidos a partir de dicha proteína (por ejemplo, fibras, películas o *scaffolds*). Sin embargo, no hay referencias que describan la influencia de este proceso en las propiedades finales de las SFN. Ésta es la razón por la que en este capítulo se estudia la influencia de cuatro diferentes métodos de desgomado sobre las propiedades de las SFN. En esta parte del trabajo, los capullos de seda fueron desgomados siguiendo cuatro métodos estándar: autoclave, ebullición alcalina corta ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ebullición alcalina larga ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y ultrasonidos. Las fibras de SF resultantes se disolvieron en el IL acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y se utilizaron para la síntesis de nanopartículas por desolvatación rápida en disolventes orgánicos polares. Las eficiencias relativas de los procesos de desgomado y la integridad de las fibras de SF obtenidas se analizaron mediante la pérdida de masa, microscopía óptica, análisis termogravimétrico, espectroscopía infrarroja y SDS-PAGE. El tamaño y la morfología de las partículas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz. Los resultados mostraron que los diferentes tratamientos tuvieron un impacto notable en la integridad de las cadenas de SF, como lo confirma la electroforesis en gel, que puede correlacionarse con el tamaño medio de las partículas y los cambios en la distribución del tamaño. El tratamiento prolongado (2 h) de ebullición en solución alcalina ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 eq/L) condujo a las nanopartículas más pequeñas ( $156 \pm 3$  nm) con el potencial-Z más negativo ( $-30.2 \pm 1.8$  mV). El estudio confirma que los parámetros del proceso, tales como la composición de la solución y el tiempo de la etapa de desgomado, deben controlarse para alcanzar una reproducibilidad óptima en la producción de nanopartículas.

**Carissimi, G.;** Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; Villora, G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. **Polymers** (Basel). 2019, 11, 2045.



### 3.1. Introducción

Para la mayoría de las aplicaciones médicas de los biomateriales de seda [1], la SF debe purificarse eficazmente a partir de los capullos de seda (SC) mediante la eliminación de la sericina de seda (SS) por un proceso conocido como desgomado, el cual es un paso clave y reconocido comúnmente como uno de los procedimientos más importantes en la producción de biomateriales a base de seda [2]. La SF purificada se puede disolver en soluciones, como LiBr 9.3 mol/L [3] o en el reactivo de Ajisawa ( $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 1:2:8 en relación molar) [4], que es el más utilizado, pero también en algunos ILs, como cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ ) [5,6] o acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ( $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ ) [7], que son reconocidos como alternativas por ser eficientes y debido a sus interesantes propiedades como disolventes verdes [8–10]. Los ILs, con aniones halógeno o pequeños carboxilatos, son capaces de romper la red de enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares y, por lo tanto, dispersar las cadenas peptídicas de la SF [5]. La disolución convencional de SF en sales altamente concentradas es un proceso que consta de varias etapas que requieren mucho tiempo y que implica diálisis con agua destilada durante varios días para eliminar las sales y obtener una solución acuosa de SF [3] antes de su regeneración en estado sólido, en forma de SFN [4]. Además, la solución acuosa de SF obtenida después de la diálisis es relativamente inestable incluso a 4 °C, evolucionando a un hidrogel debido a cambios en el pH de la solución o un cambio de presión o agitación [11,12]. Alternativamente, las soluciones de SF en líquido iónico pueden ser preparadas de una forma más rápida y usarse directamente para precipitar nanopartículas [6,7] evitando la etapa de diálisis y dando lugar a soluciones de SF más estables.

Las sericinas de seda forman parte de una familia de proteínas globulares que son solubles en agua caliente o hirviendo debido a su composición, abundante en aminoácidos polares, como la serina o el ácido aspártico [13]. El proceso de desgomado se puede realizar utilizando diferentes metodologías que se basan en las diferencias de solubilidad entre SS y SF [14–17]. En general, se utiliza como medio de extracción un medio acuoso con temperaturas mayores a 60 °C, preferiblemente alcalino, en el que las SS son solubles y, por tanto, se separan de las fibras de SF, que permanecen esencialmente insolubles en estas condiciones. Recientemente, se han publicado varios métodos de desgomado que muestran el efecto de esta etapa crítica del proceso sobre la estructura y las propiedades de la SF para ser utilizada en múltiples aplicaciones [18–25]. Entre los diferentes métodos, se menciona frecuentemente el uso de un autoclave en diferentes configuraciones: en una solución acuosa sometida a 121 °C durante 20 minutos [21] o utilizando vapor de agua generado en el autoclave [16]. Si bien estos métodos

presentan un rendimiento menor, en términos de eliminación de la SS, que los protocolos que utilizan la ebullición alcalina, tienen la ventaja de tener costes de producción más bajos mientras mantienen características mecánicas aceptables de las fibras de SF y son muy útiles cuando se intenta recuperar SS sin sal mediante secado por atomización convencional [26,27]. Un método de desgomado utilizado con frecuencia para aplicaciones biomédicas de la SF consiste en hervir los capullos en una solución alcalina ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,02 mol/L) durante 30 minutos [3]. Este método extrae SS muy bien e implica una baja degradación de la SF, lo que lo hace útil para aplicaciones donde se necesita una alta pureza y una fuerte integridad de la SF. También se han descrito otros métodos en los que se utiliza la ebullición durante períodos más prolongados, por ejemplo, 120 minutos [28], o mediante extracción en agua caliente asistida por ultrasonidos [19] o utilizando una solución de 8 mol/L de urea a 80 °C durante 120 minutos [21]. Además, los trabajos experimentales sobre la eliminación de SS por diferentes enzimas proteasas [14,29] o ácidos orgánicos, como el ácido tartárico, también han demostrado un rendimiento eficiente [30,31].

Según estudios previos, los diferentes procesos de desgomado afectan a las propiedades de las fibras de SF [15,19,21,32,33] y también a la producción de materiales de ingeniería basados en ésta como películas [34–36], *scaffolds*-3D [28] o materiales electrohilados [37,38]. Varios estudios han afirmado que el proceso utilizado para el desgomado del SC tiene un fuerte impacto en la integridad de la SF y sus propiedades mecánicas después de procesarla en forma de biomateriales, pero, aun así, se carece de información sobre el impacto de este proceso en las SFN obtenidas. Se han publicado algunos estudios sobre cómo el desgomado afecta a la formación de partículas, pero se han centrado en micropartículas o se ha utilizado solo un único método de desgomado para la preparación de las nanopartículas. Por ejemplo, Wang y colaboradores [34] han estudiado el efecto sobre la preparación de microesferas de SF, señalando que el método de desgomado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30 min o urea 8 mol/L) tiene un gran efecto sobre la distribución del tamaño de las micropartículas, que se manifiesta a través de los cambios en el peso molecular de la SF. Seib y colaboradores [39] estudiaron el efecto del tiempo de desgomado (5, 20 y 60 min) sobre la formación de nanopartículas concluyendo que solo la seda desgomada durante 60 min a ebullición fue capaz de producir nanopartículas de manera eficiente por desolvatación con acetona. Los autores reconocen que se desconoce cómo afecta el tiempo de ebullición a las características de las partículas y, en consecuencia, a la eficacia de las SFN como sistema de administración de fármacos.

Numerosos estudios han demostrado las excelentes características de las SFN como vehículo portador de fármacos y biomoléculas [40–44], por lo que su producción escalable con

finés comerciales se consideraría factible en los próximos años. Por ello, es de gran interés conocer todos los parámetros que inciden en la formación de nanopartículas con el fin de estandarizar los procesos de síntesis y controlar sus características.

El presente estudio se centra en cómo el proceso de desgomado afecta a las características estructurales de las SFN (morfología, distribución de tamaño, potencial Z y densidad de carga superficial), con la intención de profundizar en los efectos de esta etapa del procesamiento de la seda en las propiedades de los biomateriales, ayudando a obtener resultados más reproducibles [6,12,38,45]. Para evaluar los diferentes procesos de desgomado de la seda y su posible efecto sobre las SFN, la seda fue desgomada mediante cuatro métodos diferentes que se encuentran entre los más representativos de la bibliografía: autoclave (D1), tratamiento alcalino con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durante 30 minutos (D2) o 120 minutos (D3), y un tratamiento con ultrasonidos de elevada potencia (D4). El rendimiento del proceso de desgomado se evaluó mediante la pérdida de peso de los SC. La integridad de las proteínas después de los diferentes procesos de desgomado y disolución en un IL fue estudiada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Se realizó una observación morfológica de las fibras de SF después de los procesos de desgomado mediante Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La estabilidad térmica de las fibras de SF se determinó mediante análisis termogravimétrico (TGA-DTA). Los cambios en la estructura secundaria de las muestras se controlaron mediante el índice de cristalinidad (CI%) de la muestra obtenida del análisis de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Finalmente, la SF obtenida por cada uno de los métodos de desgomado mencionados se utilizó para preparar SFN y su morfología se analizó mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM), mientras que su distribución de tamaño, potencial Z y densidad de carga superficial se obtuvo por dispersión dinámica de luz (DLS).

## 3.2. Materiales y Métodos

### 3.2.1 Materiales

Los capullos de seda (SC) se obtuvieron de gusanos de seda *Bombyx mori* criados en las instalaciones de sericultura del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA, Murcia, España) bajo una dieta de hojas frescas y naturales de *Morus alba L.* Las pupas dentro de los capullos fueron sometidas a calor seco (85 °C) [45] y, posteriormente, las crisálidas intactas se extrajeron manualmente de los capullos antes del procesamiento de la seda.

Todos los reactivos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España) con la excepción del metanol (Honeywell, Seelze, Alemania) y el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ( $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ ) 95% (Iolitec, Heilbronn, Alemania).

### 3.2.2 Métodos de desgomado

En este trabajo se eligieron cuatro métodos de desgomado que serán descritos a continuación. En todos los casos, los capullos de seda fueron cortados con tijeras en pequeñas piezas de *ca.* 5 mg y agregados a un recipiente con agua MilliQ o solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , según el método de desgomado. Con fines comparativos, la relación entre SF y disolvente se mantuvo en 1:200 (p/v) para todos los métodos. Para el método de desgomado en autoclave (D1) [21]; se introdujo un recipiente que conteniendo los capullos cortados en un autoclave Presoclave II 80 (P-Selecta, Barcelona, España) y mantenido a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos. En los casos de desgomado por ebullición alcalina corta (D2) [3,38] y desgomado mediante ebullición alcalina prolongada (D3) [28]; los capullos cortados fueron introducidos en un vaso de precipitado y hervidos en una disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 mol/L durante 30 y 120 minutos, respectivamente. Las suspensiones se mantuvieron en agitación con agitadores magnéticos y fueron ocasionalmente agitadas con una varilla de vidrio para asegurar el desgomado homogéneo. Finalmente, se utilizó ultrasonidos (D4) [19]; los capullos de seda cortados fueron introducidos un vaso de precipitado con agua MilliQ y sonicados con un equipo Branson Sonifier SFX-550 (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, CT, EE. UU.) equipado con una sonda disruptiva y punta plana de 1.27 cm de diámetro. La sonicación fue aplicada durante 30 minutos con una amplitud del 50% y la temperatura máxima se estableció en 60 °C. En la Tabla 3.1 se puede encontrar una breve descripción de los cuatro métodos con las características más representativas.

**Tabla 3.1.** Resumen de los métodos de desgomado utilizados.

Referencia	Proceso	Solvente	T (°C)	Tiempo (min)
<b>D1</b>	Autoclave	Agua MilliQ	121	30
<b>D2</b>	Ebullición alcalina corta	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>a</sup>	100	30
<b>D3</b>	Ebullición alcalina larga	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>a</sup>	100	120
<b>D4</b>	Ultrasonidos con sonda	Agua MilliQ	60	60

<sup>a</sup>  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 mol/L

Después de cada proceso de desgomado, la SF obtenida de cada lote se lavó dos veces con 1.5 L de agua destilada a 60 ° C durante 5 min para eliminar cualquier SS libre. Posteriormente, la SF fue secada durante 24 h en una campana de extracción hasta obtener un peso constante. Se calculó la pérdida de masa con la ecuación (3.1) después de los diferentes métodos de desgomado siguiendo el método descrito anteriormente [24],  $m_{\text{antes del desgomado}}$  y  $m_{\text{después del desgomado}}$  son la masa seca antes y después del desgomado, respectivamente.

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \left( \frac{m_{\text{antes del desgomado}} - m_{\text{después del desgomado}}}{m_{\text{antes del desgomado}}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.2.3 Preparación de nanopartículas de fibroína de seda

La preparación de SFN se basó en el método descrito por Montalbán y colaboradores [7]. En resumen, las fibras de SF obtenidas de los diferentes métodos de desgomado se disolvieron en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] (10% en peso) utilizando ultrasonidos de alta potencia. Posteriormente, con el fin de reducir la viscosidad de las mezclas, se agregaron 3 mL de agua MilliQ (18 MΩ/cm) a 5 g de la disolución SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y se calentó a 60°C. A continuación, la solución fue atomizada en forma de aerosol mediante una boquilla de dos fluidos de 0,7 mm de diámetro interno controlada termostáticamente (de un Mini Spray Dryer B-290, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suiza, N ° de pieza 044698) utilizando N<sub>2</sub> comprimido (1 bar) en 100 mL de metanol frío (-20 ° C) suavemente agitado. La suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 2 horas y las nanopartículas se separaron por centrifugación y varios lavados con metanol (1x) y agua (3x). Finalmente, las SFNs se liofilizaron utilizando un Freeze Dryer Edwards Modulyo 4K (Edwards High Vacuum International, Crawley, Reino Unido) a -55 ° C y 0,5 mbar durante 72 h. El metanol y el [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] se recuperaron y purificaron del sobrenadante mediante destilación simple.

### 3.2.4 Electroforesis en gel

La electroforesis se realizó con las soluciones de SF en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] de acuerdo con el protocolo de Laemmli [46] con el fin de comparar la integridad de la proteína después de los diferentes procesos de desgomado. Las diferentes muestras de SF disueltas en el líquido iónico como se describió anteriormente, se diluyeron (1% p/v) con agua MilliQ, se mezclaron con tampón de carga (1:1) que contenía β-mercaptoetanol (10% v/v) y se calentaron a 95 °C durante 5 min para conseguir la desnaturalización de proteínas. A continuación, las concentraciones de proteína se unificaron a 50 µg de muestra por carril y la electroforesis se realizó siguiendo el

protocolo descrito por el fabricante en un sistema de electroforesis horizontal Amersham ECL Gel (código n.o. 28-9906-08) (GE Healthcare Europe, GmbH, Freiburg, Alemania) conectado a una fuente de alimentación BioRad a 100 V (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) mediante el uso de un gel de acrilamida con un gradiente de 4-20% en peso para una mejor resolución de proteínas (Amersham GE, código n.o. 28-9901-59) y 250 mL de un tampón de funcionamiento en gel Amersham ECL, (Código n.o. 28-9902-52). Como referencia, se cargó una alícuota de 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie al 0.25% (Acros Organics, Geel, Bélgica), se fijaron, se decoloraron en una mezcla de etanol/agua y se fotografiaron para su análisis.

#### 3.2.5 Caracterización de fibras y nanopartículas de fibroína

Para la caracterización morfológica de la SF y las SFN, las imágenes de microscopía electrónica se registraron mediante un SEM JEOL JSM 6100 (Tokio, Japón) y FE-SEM Thermo Scientific Apreo S (Brno, República Checa), respectivamente. Para las muestras de SF, las fibras se pegaron en un trozo de aluminio con una fina película de carbono autoadherente y luego se recubrieron con una capa de oro de *ca.* 10 nm de espesor. El SEM fue operado a 20 kV. Para las SFN, una gota de la dispersión fue depositada en un disco de mica (V1 del más alto grado, Ted Pella, inc., Redding, CA, EE. UU.), se secó al aire y luego se pulverizó con platino durante 5 minutos, lo que resultó en un espesor de película de 5.13 nm. (Leica, EM ACE600, Leica Microsystems Inc, Concord, ON, Canadá). Los discos de mica fueron pretratados retirando las capas superiores con cinta adhesiva tres veces antes de colocar la muestra.

Las propiedades térmicas de la SF se midieron mediante un analizador gravimétrico térmico (TA instruments, SDT 2960 simultáneo TGA-DTA, Waters LLC, New Castle, DE, EE. UU.) en un rango de temperatura de 25-800 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno inerte en un recipiente abierto. La pérdida de peso y la diferencia de temperatura entre la muestra y una referencia inerte se registraron y representaron simultáneamente frente a la temperatura para el análisis termogravimétrico (TGA) y el análisis térmico diferencial (DTA), respectivamente.

Los espectros de infrarrojos fueron obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR) con el fin de comparar el efecto de los diferentes procesos de desgomado sobre el índice de cristalinidad (CI%) de las muestras [47,48]. Los espectros ATR-FTIR se registraron en un espectrómetro Nicolet iS5

acoplado a un módulo ATR iD7 de cristal de diamante (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó el software OMNIC V9.9.471 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para controlar el equipo y el postprocesamiento de los datos espectrales, incluidas las correcciones de línea base y ATR. Las mediciones se realizaron con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en el rango espectral de  $4000\text{--}550\text{ cm}^{-1}$  mediante la recopilación de 64 barridos utilizando una apodización N-B fuerte y corrección de fase Mertz. Un blanco fue recogido antes de cada medida. Todas las muestras se secaron al vacío antes de la evaluación para minimizar la contribución de agua a los espectros.

El CI% de las muestras de SF se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de cristalinidad (CI\%)} = \frac{A_{1260}}{A_{1235}} \times 100 \quad (3.2)$$

donde  $A_{1260}$  y  $A_{1235}$  representan la absorbancia medida a  $1260$  y  $1235\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, después de realizar una corrección de la línea base (En la Figura S3.1 de la información suplementaria al final de este Capítulo, se presenta un ejemplo de la línea de base trazada en la banda de absorción Amida III para el cálculo del CI).

La caracterización de las nanopartículas en cuanto a su tamaño y características superficiales se realizó mediante DLS utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), equipado con un láser de  $4\text{ mW}$  de potencia con una longitud de onda de  $633\text{ nm}$ . El diámetro hidrodinámico medio ponderado por intensidad, expresado como *Z-average*, y el potencial-Z se midieron mediante técnicas DLS y PALS, respectivamente. Se observó que las muestras no absorbían a  $633\text{ nm}$  en las condiciones de medición. Se preparó una dispersión de SFN de  $1\text{ mg/mL}$  en una disolución  $1\text{ mM}$  de NaCl mediante tratamiento de  $1\text{ minuto}$  de ultrasonidos a una amplitud del  $30\%$  con pulsos de  $15\text{ s}$  antes y se cargó a una celda capilar desechable DTS1070 para medidas de potencial Z (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). La luz retrodispersada se midió a  $173^\circ$  con respecto a la fuente después de  $120\text{ s}$  de tiempo de equilibrio a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . El software integrado de Malvern calcula el *Z-average* y la distribución de tamaño a partir del ajuste de la función de autocorrelación mediante análisis de *cumulants* y múltiples decaimientos exponenciales por mínimos cuadrados no negativos (propósito general en las opciones del software Malvern), respectivamente. Los resultados de tamaño mostrados son el promedio de  $3$  medidas, donde cada una consistió en  $12$  ensayos de  $10\text{ s}$  cada uno sin tiempo de espera entre las medidas. El potencial Z se calculó mediante la ecuación de Henry utilizando

## Capítulo 3

la movilidad electroforética de las SFN. Se asumió la aproximación de Smoluchowski ( $\kappa\alpha = 1.5$ ). Los resultados del potencial Z son el promedio de 6 medidas tomadas de forma totalmente automática por el software con un mínimo de 12 ejecuciones.

La densidad de carga superficial ( $\rho$ ) de una partícula coloidal esférica se obtuvo siguiendo el método propuesto por Makino y Ohshima a partir del potencial-Z y la fuerza iónica del medio [49].

Las ecuaciones detalladas y los valores de los parámetros utilizados para el cálculo de la densidad de carga superficial se describen en la información complementaria (véase la Tabla S3.1).

### 3.2.6 *Análisis Estadístico*

Los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar, calculados a partir de tres muestras independientes por condición de desgomado. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el software Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Como se cumplieron la normalidad (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ ) y la homocedasticidad (Levene,  $p > 0.05$ ), la significancia estadística se determinó utilizando las pruebas paramétricas de Tukey ( $p < 0.05$ ) y ANOVA ( $p < 0.05$ ) para las comparaciones de dos o más grupos, respectivamente.

## 3.3. **Resultados y discusión**

### 3.3.1 *Resultados del Desgomado*

Los SC y la SF obtenida después del proceso de desgomado fueron pesados y sus diferencias de masa se presentan en la Tabla 3.2. De los resultados obtenidos, la pérdida de peso sigue la serie D4 < D1 < D2 < D3. Los métodos D1 y D2 lograron una pérdida de peso similar, de 31 y 32.4%, respectivamente. El método D3 muestra una mejora notable en la severidad del tratamiento en términos de tiempo con respecto al D2, y la pérdida de peso alcanzó el 44.4%, la más alta de los diferentes métodos ensayados. El método D4 produjo la menor pérdida de masa, con solo el 25.9%. Suponiendo que solo el 25-30% del peso total en los capullos corresponde a la fracción SS [13,50,51], podemos inferir que no solo se ha perdido sericina en el tratamiento D3, sino también parte de la SF, debido a las severas condiciones a las que se somete a las fibras, un fenómeno previamente descrito [24].

**Tabla 3.2** Eficiencia del desgomado expresada en términos de pérdida de masa e índice de cristalinidad (CI) de las muestras de SF: D1) Autoclave, D2) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30', D3) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120' y D4) Ultrasonidos.

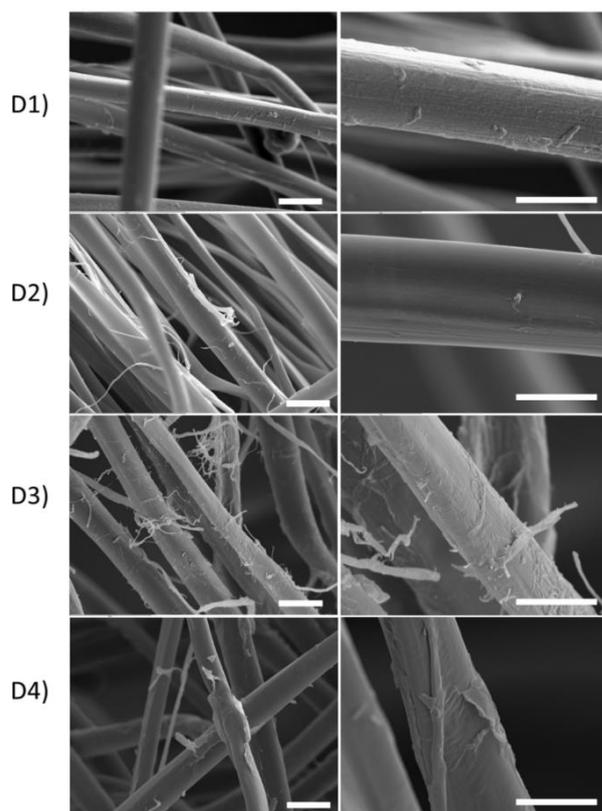
<b>Muestra</b>	<b>Pérdida de masa (% p/p) <sup>a</sup></b>	<b>CI (%) <sup>a</sup></b>
<b>SC ext/int<sup>b</sup></b>	-	49.3/50.7 ± 0.5/0.8
<b>SF-D1</b>	31.3 ± 0.5	59 ± 2
<b>SF-D2</b>	32.4 ± 0.8	56 ± 3
<b>SF-D3</b>	44.4 ± 1.0	59 ± 2
<b>SF-D4</b>	25.9 ± 1.2	52 ± 1

<sup>a</sup> Los resultados se muestran como promedio ± desviación estándar, n = 3.

<sup>b</sup> ext. e int. representan la cara externa e interna del capullo, respectivamente.

La integridad de la fibra de SF tras los diferentes tratamientos de desgomado fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido. Como se puede observar en la Figura 3.1, existen notables diferencias en la superficie de las fibras de SF, debido al daño relativo sufrido durante cada tratamiento.

Las imágenes de las muestras de SF a dos aumentos presentaron diferencias visibles en la superficie de las fibras. Se puede observar que la muestra SF-D1 muestra una superficie mayoritariamente lisa, pero que aún presenta pequeños restos de SS adheridos a las fibras. La muestra SF-D2 presentó la superficie más lisa, casi completamente libre de SS. La muestra SF-D3 reveló una estructura muy dañada, sin signos claros de SS, pero completamente recubierta con microfibras desprendidas. Estas irregularidades reflejan la intensa degradación producida por este método de desgomado. Por su parte, la muestra SF-D4 no presenta microfibras desenredadas, pero la superficie irregular reveló la presencia de SS, como ha sido publicado anteriormente para este método de desgomado [52,53].



**Figura 3.1.** Imágenes comparativas obtenidas con microscopía electrónica de barrido a dos aumentos de las fibras de SF desgomadas por los procesos: **(D1)** Autoclave, **(D2)**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30', **(D3)**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  120' y **(D4)** Ultrasonidos. (Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ).

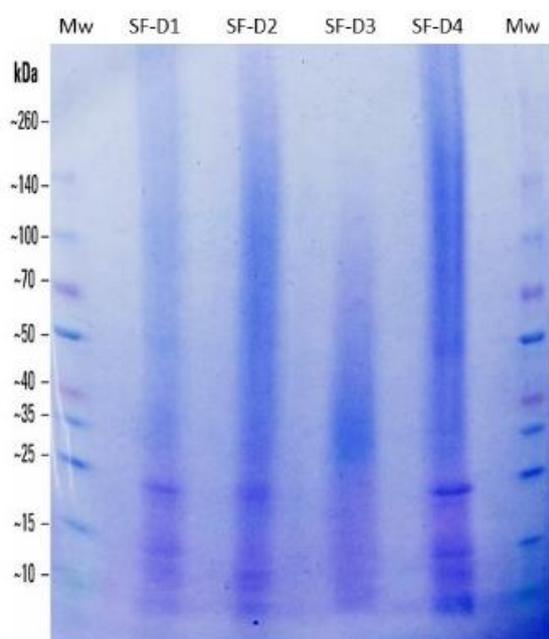
### 3.3.2 Análisis del índice de cristalinidad de la fibroína de seda

La determinación del CI (%) por espectroscopía ATR-FTIR es una herramienta útil para evaluar el efecto del proceso de desgomado debido a las notables diferencias de las estructuras secundarias de las SS y la SF [54], que se traducen en marcadas diferencias en la banda amida III [55,56]. Se espera que los valores de CI aumenten a medida que se elimina SS debido a que la SF presenta una estructura más cristalina que las SS [57,58]. El CI% se calculó con la relación de las bandas de absorción a  $1260\text{ cm}^{-1}$  (estructuras cristalinas, lámina  $\beta$ ) [59] y  $1235\text{ cm}^{-1}$  (estructuras amorfas, ovillo estadístico) [60] de los espectros registrados (ver Figura S3.1). Los resultados para el CI% de las diferentes muestras se muestran en la Tabla 3.2. Todas las muestras de SF mostraron un aumento de CI con respecto al SC, como era de esperar. No es de extrañar que SF-D1 y SF-D3 presentaran los CI más altos, ambos del 59%, pero, probablemente, debido a diferentes factores. Por un lado, el tratamiento con carbonato alcalino tiene el potencial de degradar parcialmente las fibras de SF, especialmente aquellas regiones con menor cristalinidad, resultando en un aumento en el CI global, un efecto publicado

previamente en la bibliografía [47]. Este resultado está de acuerdo con la mayor pérdida de masa entre las muestras (44,4%) observada durante el tratamiento. Por otro lado, el proceso de autoclave con alta presión y alta temperatura induciría un aumento en el contenido total de la lámina a través de un proceso de reordenamiento interno de las cadenas facilitado por moléculas de agua también descrito por Xu y colaboradores [61]. El método D2 dio lugar a un aumento moderado del CI% (56%) en comparación con D1, con una pérdida de masa similar. La SF desgomada por ultrasonidos mostró el CI% más bajo (52%), lo que se correlaciona bien con el hecho de que es la muestra con menor pérdida de masa (25.9%), y las SS probablemente todavía estén adheridas a la superficie de la SF, disminuyendo el valor del CI global.

### 3.3.3 Electroforesis en gel

El efecto del método de desgomado sobre el peso molecular (Mw) de las cadenas de SF fue estudiado mediante electroforesis en gel, y el resultado se muestra en la Figura 3.2. La SF nativa consiste en una cadena pesada (H), una cadena ligera (L), y una glicoproteína (P25), y sus respectivos pesos moleculares son 391, 26 y 24 kDa (30 kDa, si incluimos los oligosacáridos). Las cadenas H y L están unidas por un puente disulfuro [62] y seis de estos dímeros se unen a una unidad de P25 en una relación molar de 6:6:1 [63]. Esta proteína, P25, fue solo ligeramente visible en el gel de electroforesis (Figura 3.2.) en el carril de SF-D4.



**Figura 3.2.** Electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) Análisis de los componentes proteicos de la SF después de los diferentes procesos de desgomado: (D1) Autoclave; (D2) Ebullición alcalina corta; (D3) Ebullición alcalina intensiva y (D4) Sonda de ultrasonidos. Carril MW: Marcador de peso molecular.

Las muestras de SF estudiadas presentaron grandes diferencias entre ellas, como se aprecia en la electroforesis de la Figura 3.2. La muestra SF-D1 mostró una degradación a lo largo de todo el carril y se pueden observar bandas claras a 26 y 15 kDa. Por su parte, SF-D2 mostró una degradación de color que abarca la zona de tamaños de desde 140 kDa hacia abajo; la cadena L de SF es claramente visible a 26 kDa y una marca tenue a 15 kDa. La muestra SF-D3 presentó una distribución continua de tamaño entre 100 y 10 kDa con una zona más oscura entre 30-40 kDa, y no se detectaron bandas a 26 o 24 kDa. Por último, la muestra SF-D4 mostró una degradación heterogénea a lo largo de todo el carril con zonas más oscuras a 140, 100 y 50 kDa y bandas claras a 26 y 15 kDa.

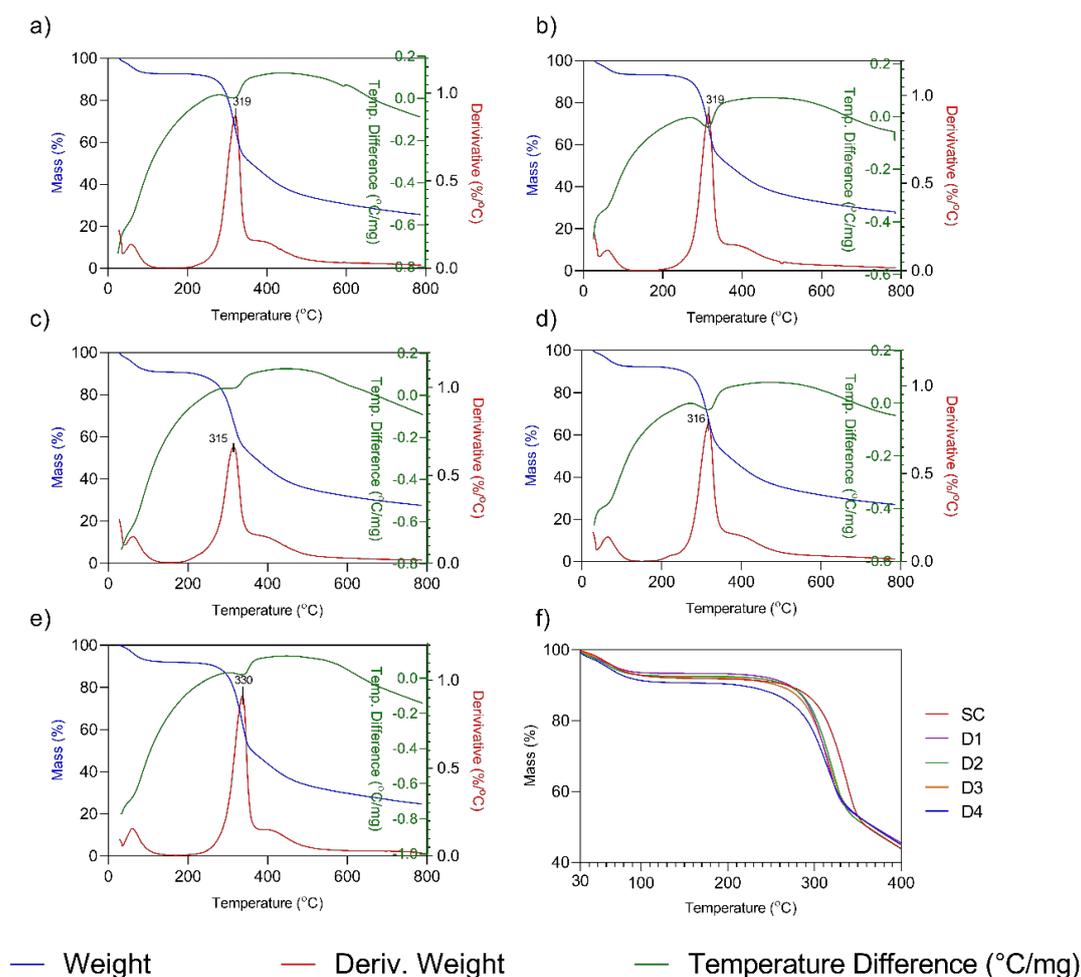
Las zonas difuminadas de color que se observan en la distribución del peso molecular medio-alto pueden interpretarse como fragmentos de la cadena H como resultado de la degradación del proceso de desgomado [26]. Se considera que el método D1 es el tratamiento menos agresivo para la SF, que se denota por la baja intensidad de la mancha en el carril, con solo una pequeña fracción de la cadena H degradada que entra al gel, mientras que la fracción principal de la proteína no pudo ingresar al gel debido al tamaño de las cadenas. Por otro lado, la cadena L de 26 kDa es claramente evidente, lo que acentúa la hipótesis del tratamiento D1 que produce una menor degradación de la SF. Se han publicado resultados similares para el desgomado en autoclave [21]. Las muestras SF-D2 y SF-D4 presentaban una degradación de color moderadamente oscuro en la parte superior del gel (*ca.* 260-50 kDa) similar al descrito previamente [6], con bandas a 120 kDa (SS) [64], 50 kDa (Cadena H de SF), 35 kDa (cadena H de SF), 26 kDa (cadena L de SF) y 15 kDa (SS) [13]. Las colecciones de bandas y el difuminado en la parte superior del gel confirmaron la degradación de la cadena H de SF y la SS restante, como se observa en las imágenes del microscopio óptico y electrónico. Esto fue especialmente evidente para SF-D4 como muestran las imágenes SEM (Figura 3.1) y el bajo CI%. La SS comprende una gran familia de proteínas, y se pueden clasificar en tres grupos según su posición en la fibra, las capas externa, media e interna. Las capas internas contienen las proteínas más pequeñas y menos solubles en agua. Estas capas internas de SS tienen un peso molecular de 14.4 kDa [13]. Las bandas de 15 kDa observadas para las muestras SF-D1,

SF-D2 y SF-D4 podrían corresponder a estas proteínas de SS internas. Este hecho se correlaciona con las imágenes de microscopía óptica, donde las muestras SF-D1 y SF-D2 presentaron pequeños restos de SS todavía adheridos y SF-D4 presentó bandas de SS con pesos moleculares mayores. Entre los tratamientos estudiados, la ebullición alcalina durante 120 minutos produjo la mayor degradación de las cadenas H y L, ya que no se pudieron identificar signos de fragmentos de alto peso molecular ( $> 100$  kDa) o bandas de cadenas ligeras a 26 kDa. Este tratamiento estrecha la distribución del peso molecular y lo concentra en la parte inferior del rango.

Mediante el análisis del gel, se concluye que los diferentes tratamientos de desgomado produjeron distintos grados de degradación de las cadenas de SF siguiendo la serie: D1 <D4 <D2 <D3. Así, la ebullición alcalina durante 120 min resultó ser el proceso más agresivo para el desgomado de SF, lo que coincide con otros autores [16,32].

#### 3.3.4 *Propiedades Térmicas*

Los resultados obtenidos para TGA-DTA de los SC y las SF después de los cuatro procesos de desgomado diferentes se muestran en la Figura 3.3, junto con la temperatura de descomposición media ( $T_{dm}$ ) indicada por el máximo de la primera derivada. La  $T_{dm}$  corresponde a una transición endotérmica (máximo negativo de la curva DTA). La pérdida de masa en la primera transición a  $T < 100$  °C, se atribuye a la evaporación del agua. Como puede observarse, en todos los casos, el porcentaje de residuos en peso se reduce drásticamente después de 315–319 °C debido a la degradación de la SF, que se atribuye a la degradación térmica de las estructuras ordenadas en lámina  $\beta$  [65]. Los dos métodos de desgomado suave para la SF (D1 y D2) mostraron una  $T_{dm}$  igual a 319 °C. Las fibras desgomadas por los tratamientos más agresivos, procesos D3 y D4, mostraron la menor  $T_{dm}$  a 315 y 316 °C, respectivamente. Comparativamente, la muestra del SC mostró una  $T_{dm}$  significativamente más elevada, que alcanzó los 330 °C (Figura 3.3e). Esta mayor estabilidad térmica del capullo ha sido descrita previamente [2].



**Figura 3.3.** Análisis Termogravimétrico y Diferencial Térmico (TGA-DTA) de los SC y las fibras de SF después de los diferentes procesos de desgomado: (a) D1, Autoclave; (b) D2, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30'; (c) D3, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120'; (d) D4, Ultrasonidos; (e) SC, capullo de seda y (f) curvas TGA de todas las muestras.

### 3.3.5 Tamaño y morfología de las nanopartículas de fibroína de seda

Las cuatro SF desgomadas se procesaron para producir SFN como se indica en la sección experimental, y sus características hidrodinámicas fueron determinadas por DLS para evaluar cómo el proceso de desgomado afecta a la distribución de tamaño final, el PDI, el potencial Z y la densidad de carga superficial de las nanopartículas resultantes. La distribución de tamaño y las imágenes FE-SEM de las SFN se muestran en la Figura 3.4, y los valores de *Z-average* y PDI, calculados con el enfoque de *cumulants*, se presentan en la Tabla 3.3. Todas las SFN presentaron una distribución de tamaños monomodal con valores bajos de PDI (<0.2). En las

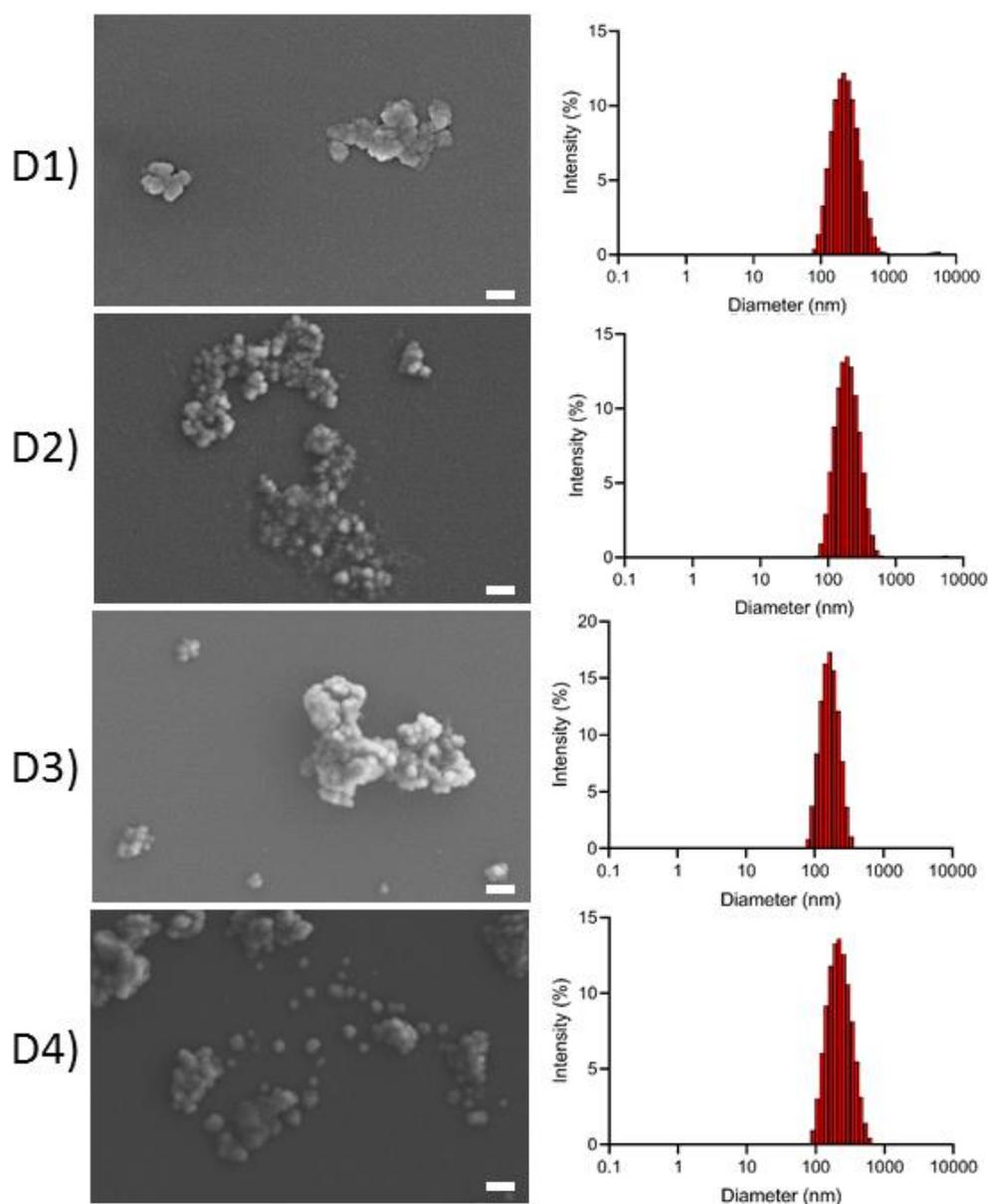
imágenes de FE-SEM, las SFN aparecieron como grupos de nanopartículas con una morfología casi esférica.

No obstante, hubo diferencias significativas tanto en el *Z-average* como en las distribuciones de tamaño entre las muestras de SFN ( $p < 0.05$ ). Como se muestra en la Tabla 3.3, tanto el *Z-average* como el PDI de las nanopartículas variaron en el orden: D1 > D4 > D2 > D3, siendo D3-SFN la muestra que presentó la distribución de tamaño más estrecha y el *Z-average* más pequeño de todas las muestras, lo que correlaciona con ser la muestra con mayor degradación de la SF observada en el análisis de electroforesis en gel. Por tanto, la longitud de las cadenas de péptidos afectaría al tamaño final de las nanopartículas. Cuanto menor sea el tamaño de las cadenas de péptidos, más pequeñas serán las nanopartículas resultantes.

**Tabla 3.3.** Diámetro hidrodinámico medio ponderado por intensidad (*Z-average*), índice de polidispersidad y potencial-Z de las SFN obtenido mediante la SF obtenida a partir de los procesos de desgomado: (D1) Autoclave, (D2) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30', (D3) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120' y (D4) Ultrasonidos.

Muestra	<i>Z-average</i> (nm) <sup>a</sup>	PDI	Potencial-Z (mV) <sup>a</sup>	Densidad de carga superficial (C/m <sup>2</sup> )	Cargas negativas (mM/g)
SFN-D1	214 ± 4	0.185 ± 0.003	-26 ± 1	-2.16 ± 0.04 · 10 <sup>-3</sup>	4.48 · 10 <sup>-1</sup>
SFN-D2	179 ± 1	0.146 ± 0.008	-30 ± 2	-2.53 ± 0.12 · 10 <sup>-3</sup>	6.29 · 10 <sup>-1</sup>
SFN-D3	156 ± 3	0.087 ± 0.002	-30 ± 2	-2.57 ± 0.06 · 10 <sup>-3</sup>	7.31 · 10 <sup>-1</sup>
SFN-D4	207 ± 4	0.152 ± 0.004	-25 ± 2	-2.01 ± 0.06 · 10 <sup>-3</sup>	4.32 · 10 <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Los resultados se muestran como promedio ± desviación estándar, n = 3.



**Figura 3.4.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) de SFN con su correspondiente distribución de tamaño en intensidad medidas por dispersión dinámica de luz (DLS) preparadas a partir de SF desgomada por: (D1) autoclave, (D2) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30', (D3) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120' y (D4) Ultrasonidos. Barra de escala = 200 nm.

Todas las muestras presentaron un potencial Z negativo que varió entre -24.7 y -30.2 mV (Tabla 3.3) que refleja la estabilidad de las suspensiones acuosas de nanopartículas debido a las fuerzas de repulsión electrostática entre partículas cargadas negativamente. Las nanopartículas obtenidas de las fibras de SF desgomadas con el método alcalino presentaron potenciales Z similares, pero más altos en valor absoluto que los tratamientos que utilizan “solo

agua". Este hecho puede explicarse por el mayor valor de pH del disolvente en el tratamiento, que podría producir un mayor número de grupos carboxilo desprotonados, confiriendo una carga neta más negativa a las SFN.

La densidad de carga superficial puede ser un parámetro más descriptivo del efecto del tratamiento de desgomado sobre las características de las nanopartículas porque su cálculo no utiliza solo el potencial Z sino también el tamaño de las nanopartículas. Como se observa en la Tabla 3.3, la densidad de carga superficial alcanza valores de aproximadamente  $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ C/m}^2$ . Las nanopartículas obtenidas a partir de SF desgomadas en tratamientos solo con agua presentaron una densidad menor en torno a  $2.0 \cdot 10^{-3} \text{ C/m}^2$ . Considerando las nanopartículas como esferas con un diámetro equivalente al *Z-average*, se puede calcular la concentración de cargas negativas por unidad de masa, que varió desde  $7.31 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol/g}$  para SFN-D3 hasta  $4.32 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol/g}$  para SFN-D4. El aumento del número de grupos carboxilato accesibles al disolvente facilita la funcionalizar las nanopartículas.

### 3.4. Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar los efectos de cuatro métodos de desgomado: autoclave, ebullición alcalina corta e intensiva (30 y 120 min, respectivamente) y ultrasonidos de alta potencia, sobre la integridad de la SF y, en consecuencia, sobre las SFN obtenidas. Se planteó la hipótesis de que, con una mayor degradación, se podrían lograr nanopartículas más pequeñas, debido a que cadenas de polímero más pequeñas son utilizadas como bloques de construcción.

La integridad de las fibras de SF se analizó mediante electroforesis en gel, donde se interpretó que las distribuciones de peso molecular más pequeñas reflejaban un mayor grado de degradación. El método de autoclave fue el menos agresivo en cuanto a la integridad de la SF, al tiempo que produjo una buena eliminación de la SS. Se observó que los métodos alcalinos eran más agresivos con la SF en comparación con el resto de los tratamientos. Un aumento en el tiempo de procesamiento alcalino conlleva un aumento de la degradación de la SF, reduciendo aún más la distribución del peso molecular, como se esperaba. Si bien se

detectaron pequeñas cantidades de SS cuando las fibras de SF se trataron con el proceso suave, no se observaron restos de SS después del proceso alcalino largo. El método de ultrasonidos tuvo un rendimiento inferior en términos de eliminación de SS en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, pero produjo un daño comparativamente menor en las fibras de SF. Se observó un aumento general en la estructura de la lámina  $\beta$  durante la preparación de SFN, con la consiguiente reducción de estructuras menos ordenadas (hélice  $\alpha$  o estructuras irregulares).

Los resultados mostraron que una mayor degradación de la SF condujo a una reducción en el tamaño medio y la distribución de tamaño de las SFN. Sin embargo, los cambios significativos en el potencial Z y la densidad de carga superficial entre las SFN procedentes de diferentes tratamientos pueden atribuirse a la naturaleza de los disolventes utilizados para el desgomado (es decir, solución alcalina o agua ultra pura).

Aunque según la bibliografía, el desgomado con solución de carbonato de sodio durante 30 minutos es el mejor proceso de desgomado para la producción de biomateriales implantables de SF [24], permitiendo retener la integridad del SF y lograr la eliminación completa de la SS, para la preparación de nanofármacos como sistemas de administración, el tratamiento severo D3 es el proceso de desgomado más eficaz, no solo por el tamaño y el potencial Z, sino también por el aumento de los grupos carboxilato en SFN-D3, que mejora la disponibilidad de sitios reactivos en la superficie de la partícula. Estos grupos carboxilato se pueden funcionalizar fácilmente mediante el acoplamiento de carbodiimida [66], proporcionando una superficie más favorable como sistema de administración de fármacos basado en nanoportadores.

Como observación final, el método de desgomado empleado para la purificación de la SF resultó ser un paso clave en el protocolo utilizado para la preparación de SFN, ya que la integridad de la proteína afecta al tamaño medio, la distribución del tamaño y la densidad de carga superficial de las partículas.

## Referencias

1. Holland, C.; Numata, K.; Rnjak-Kovacina, J.; Seib, F.P. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*.
2. Mazzi, S.; Zulker, E.; Buchicchio, J.; Anderson, B.; Hu, X. Comparative thermal analysis of Eri, Mori, Muga, and Tussar silk cocoons and fibroin fibers. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, *116*, 1337–1343.
3. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631.
4. Ajisawa, A. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.* **1997**, *67*, 91–94.
5. Phillips, D.M.; Drummy, L.F.; Conrady, D.G.; Fox, D.M.; Naik, R.R.; Stone, M.O.; Trulove, P.C.; De Long, H.C.; Mantz, R.A. Dissolution and Regeneration of *Bombyx mori* Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14350–14351.
6. Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cragolini, F.; Cenis, J.L.; Villora, G. Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *132*, 1–8.
7. Montalbán, M.; Coburn, J.; Lozano-Pérez, A.; Cenis, J.; Villora, G.; Kaplan, D. Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 126.
8. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Rubio, M.; Villora, G. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using supported liquid membranes based on ionic liquids. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2007**, *46*, 818–824.
9. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Villora, G. On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of rac-2-pentanol. *J. Memb. Sci.* **2008**, *314*, 238–246.
10. Rogers, R.D.; Seddon, K.R. Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science (80)*. 2003, *302*, 792–793.
11. Wang, H.; Zhang, Y.; Shao, H.; Hu, X. A study on the flow stability of regenerated silk fibroin aqueous solution. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *36*, 66–70.
12. Aznar-cervantes, S.D.D.; Abel, A.; García, M.; Villora, G.; Lozano-Pérez, A.A.; García Montalban, M.; Villora, G.; Vicente-Cervantes, D.; Cenis, J.L.; García Montalbán, M.; *et al.* Importance of refrigeration time in the electrospinning of silk fibroin aqueous solutions. *J. Mater. Sci.* **2015**, *50*, 4879–4887.

### Capítulo 3

13. Wang, Y.-J.; Zhang, Y.-Q. Three-layered sericins around the silk fibroin fiber from *Bombyx mori* cocoon and their amino acid composition. *Adv. Mater. Res.* **2011**, *175–176*, 158–163.
14. Freddi, G.; Mossotti, R.; Innocenti, R. Degumming of silk fabric with several proteases. *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 101–112.
15. Mahmoodi, N.M.; Moghimi, F.; Arami, M.; Mazaheri, F. Silk degumming using microwave irradiation as an environmentally friendly surface modification method. *Fibers Polym.* **2010**, *11*, 234–240.
16. Wang, R.; Zhu, Y.; Shi, Z.; Jiang, W.; Liu, X.; Ni, Q.Q. Degumming of raw silk via steam treatment. *J. Clean. Prod.* **2018**, *203*, 492–497.
17. Cao, T.T.; Zhang, Y.Q. Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *61*, 940–952.
18. Pérez-Rigueiro, J.; Elices, M.; Llorca, J.; Viney, C. Effect of degumming on the tensile properties of silkworm (*Bombyx mori*) silk fiber. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *84*, 1431–1437.
19. Yuksek, M.; Kocak, D.; Beyit, A.; Merdan, N. Effect of Degumming Performed with Different Type Natural Soaps and Through. **2012**, *6*, 801–808.
20. Wang, F.; Zhang, Y.Q. Effects of alkyl polyglycoside (APG) on *Bombyx mori* silk degumming and the mechanical properties of silk fibroin fibre. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *74*, 152–158.
21. Kim, H.J.; Kim, M.K.; Lee, K.H.; Nho, S.K.; Han, M.S.; Um, I.C. Effect of degumming methods on structural characteristics and properties of regenerated silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 294–302.
22. Kumar, S.; Singh, S.K. Fabrication and characterization of fibroin solution and nanoparticle from silk fibers of *Bombyx mori*. *Part. Sci. Technol.* **2017**, *35*, 304–313.
23. Wang, Y.; Guo, J.; Zhou, L.; Ye, C.; Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L.; Ling, S. Design, Fabrication, and Function of Silk-Based Nanomaterials. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1–24.
24. Nultsch, K.; Bast, L.K.; Näf, M.; Yakhliifi, S. El; Bruns, N.; Germershaus, O. Effects of Silk Degumming Process on Physicochemical, Tensile, and Optical Properties of Regenerated Silk Fibroin. *Macromol. Mater. Eng.* **2018**, *303*, 1–10.
25. Wang, L.; Luo, Z.; Zhang, Q.; Guan, Y.; Cai, J.; You, R.; Li, X. Effect of Degumming Methods on the Degradation Behavior of Silk Fibroin Biomaterials. *Fibers Polym.* **2019**, *20*, 45–50.
26. Genç, G.; Narin, G.; Bayraktar, O. Spray drying as a method of producing silk sericin powders. *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* **2009**, *37*, 78–86.
27. Lalit Jajpura, A.R. The Biopolymer Sericin: Extraction and Applications. *J. Text. Sci. Eng.* **2015**,

- 05, 1–5.
28. Nultsch, K.; Germershaus, O. Silk fibroin degumming affects scaffold structure and release of macromolecular drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 254–261.
  29. Gulrajani, M.L.; Gupta, S.V.; Gupta, A.; Suri, M. Degumming of silk with different protease enzymes. *Indian J. Fibre Text. Res.* **1996**, *21*, 270–275.
  30. Freddi, G.; Allera, G.; Candiani, G. Degumming of silk fabrics with tartaric acid. *J. Soc. Dye. Colour.* **2008**, *112*, 191–195.
  31. Khan, M.M.R.; Tsukada, M.; Gotoh, Y.; Morikawa, H.; Freddi, G.; Shiozaki, H. Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8439–8445.
  32. Wang, H.Y.; Zhang, Y.Q. Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization. *Soft Matter* **2013**, *9*, 138–145.
  33. Wang, F.; Cao, T.T.; Zhang, Y.Q. Effect of silk protein surfactant on silk degumming and its properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 131–136.
  34. Wang, Z.; Yang, H.; Li, W.; Li, C. Effect of silk degumming on the structure and properties of silk fibroin. *J. Text. Inst.* **2018**, *5000*, 1–7.
  35. Allardyce, B.J.; Rajkhowa, R.; Dilley, R.J.; Atlas, M.; Kaur, J.; Wang, X. The impact of degumming conditions on the properties of silk films for biomedical applications. *Text. Res. J.* **2015**, *0*, 1–13.
  36. Lee, J.H.; Song, D.W.; Park, Y.H.; Um, I.C. Effect of residual sericin on the structural characteristics and properties of regenerated silk films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 273–278.
  37. Park, B.K.; Um, I.C. Effect of molecular weight on electro-spinning performance of regenerated silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 1166–1172.
  38. Aznar-Cervantes, S.D.; Vicente-Cervantes, D.; Meseguer-Olmo, L.; Cenis, J.L.; Lozano-Pérez, A.A. Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 1945–1950.
  39. Seib, F.P.; Jones, G.T.; Rnjak-Kovacina, J.; Lin, Y.; Kaplan, D.L. pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1606–1611.
  40. Zhao, Z.; Li, Y.; Xie, M. Bin Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 4880–4903.
  41. Liu, Q.; Liu, H.; Fan, Y. Preparation of silk fibroin carriers for controlled release. *Microsc. Res.*

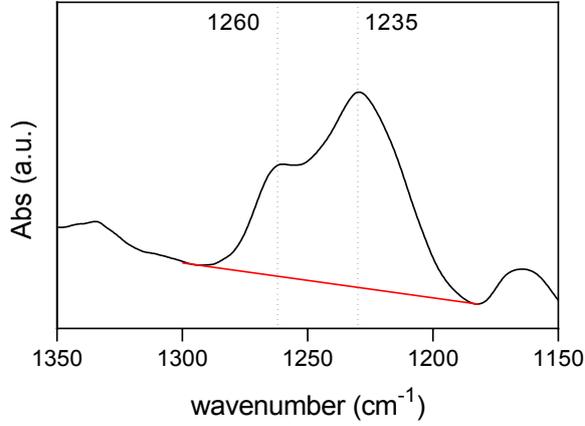
- Tech.* **2017**, *80*, 312–320.
42. Mottaghitlab, F.; Farokhi, M.; Shokrgozar, M.A.; Atyabi, F.; Hosseinkhani, H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J. Control. Release* **2015**, *206*, 161–176.
  43. Montalbán, M.G.; Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.; Coburn, J.M.; Kaplan, D.L.; Villora, G. Biopolymeric Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids. In *Recent Advances in Ionic Liquids*; IntechOpen, 2018; pp. 3–26.
  44. Philipp Seib, F. Silk nanoparticles—an emerging anticancer nanomedicine. *AIMS Bioeng.* **2017**, *4*, 239–258.
  45. Aznar-Cervantes, S.D.; Pagan, A.; Monteagudo Santesteban, B.; Cenis, J.L. Effect of different cocoon stifling methods on the properties of silk fibroin biomaterials. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6703.
  46. U.K. Lammler Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
  47. Bhat, N. V.; Nadiger, G.S. Crystallinity in silk fibers: Partial acid hydrolysis and related studies. *J. Appl. Polym. Sci.* **1980**, *25*, 921–932.
  48. Nadiger, G.S.; Bhat, N. V. Effect of plasma treatment on the structure and allied textile properties of mulberry silk. *J. Appl. Polym. Sci.* **1985**, *30*, 4127–4135.
  49. Makino, K.; Ohshima, H. Electrophoretic mobility of a colloidal particle with constant surface charge density. *Langmuir* **2010**, *26*, 18016–18019.
  50. Zhang, Y.-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 91–100.
  51. Mondal, M.; Trivedy, K.; Kumar, S.N. The silk protein,sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn, -a review. *Casp. J Env Sci* **2007**, *5*, 63–76.
  52. Nakpathom, M.; Somboon, B.; Narumol, N. Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: An injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel. *J. Microsc. Soc. Thai.* **2009**, *23*, 142–146.
  53. Bawazeer, T.M.; Alsoufi, M.S. Surface Characterization and Properties of Raw and Degummed (*Bombyx mori*) Silk Fibroin Fiber toward High Performance Applications of “*Kisswa Al-Kabba.*” *Int. J. Curr. Res.* **2017**, *9*, 48335–48343.
  54. Lotz, B.; Colonna Cesari, F. The chemical structure and the crystalline structures of *bombyx mori* silk fibroin. *Biochimie* **1979**, *61*, 205–214.
  55. Ling, S.; Qi, Z.; Knight, D.P.; Shao, Z.; Chen, X. Synchrotron FTIR microspectroscopy of single natural silk fibers. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3344–3349.

56. Koperska, M.A.; Pawcenis, D.; Bagniuk, J.; Zaitz, M.M.; Missori, M.; Łojewski, T.; Łojewska, J. Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy. *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, *105*, 185–196.
57. Marsh, R.E.; Corey, R.B.; Pauling, L. An Investigation of the structure of solk fibroin\*. **1955**, *16*.
58. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24*, 401–416.
59. Shao, J.; Zheng, J.; Liu, J.; Carr, C.M. Fourier transform Raman and Fourier transform infrared spectroscopy studies of silk fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*, 1999–2004.
60. Garside, P.; Wyeth, P. Crystallinity and degradation of silk: Correlations between analytical signatures and physical condition on ageing. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2007**, *89*, 871–876.
61. Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Dynamic Protein-Water Relationships during Beta Sheet Formation Dynamic Protein - Water Relationships during -Sheet Formation. **2016**, 3939–3948.
62. Zhou, C.Z.; Confalonieri, F.; Jacquet, M.; Perasso, R.; Li, Z.G.; Janin, J. Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *44*, 119–122.
63. Inoue, S.; Tanaka, K.; Arisaka, F.; Kimura, S.; Ohtomo, K.; Mizuno, S. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40517–40528.
64. Takasu, Y.; Yamada, H.; Tsubouchi, K. Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 2715–2718.
65. Zhang, Y.-Q.Q.; Shen, W.-D. De; Xiang, R.-L.L.; Zhuge, L.-J.J.; Gao, W.-J.J.; Wang, W.-B.B. Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J. Nanoparticle Res.* **2007**, *9*, 885–900.
66. Murphy, A.R.; Kaplan, D.L. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6443–6450.



### 3.5. Información suplementaria Capítulo 3

*Caracterización morfológica, fisicoquímica y estructural de fibras de SF y SFN*



**Figura S3.1.** Ejemplo de línea base trazada en la banda de absorción de Amida III para el cálculo del índice de cristalinidad.

*Cálculo de la densidad de carga superficial ( $\rho$ ) de una partícula esférica coloidal*

Para una nanopartícula con densidad de carga superficial constante, la densidad de carga superficial es un parámetro más característico que el potencial  $Z$ ,  $\psi_0$ , porque para tales partículas el potencial  $Z$  no es constante y depende de la concentración de electrolito. El método se basa en la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\kappa kT}{ze} \sinh\left(\frac{ze\psi_0}{2kT}\right) \left[ 1 + \frac{1}{\kappa a} \frac{1}{\cosh^2(ze\psi_0/4kT)} + \frac{1}{(\kappa a)^2} \frac{8 \ln \left[ \cosh\left(\frac{ze\psi_0}{4kT}\right) \right]}{\sinh^2(ze\psi_0/2kT)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (S3.1)$$

Donde  $\kappa$  es el parámetro de Debye-Hückel definido por:

$$\kappa = \left[ \frac{1000e^2 N_A (2I)}{\varepsilon kT} \right]^{1/2} \quad (S3.2)$$

y  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\varepsilon_r$  es la permitividad relativa del solvente,  $\varepsilon_0$  es la permitividad del vacío,  $\varepsilon$  es la permitividad,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $e$  es la carga eléctrica elemental,  $I$  es la fuerza iónica;  $a$  es el radio de las nanopartículas esféricas,  $\psi_0$  es el potencial- $Z$  y  $z$  es la valencia del electrolito. Todos los valores de los

parámetros utilizados para el cálculo de la carga de densidad superficial se muestran en la Tabla S3.1.

**Tabla S3.1.** Lista de parámetros utilizados para calcular la densidad de carga superficial.

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>
<b>Permitividad relativa 25 °C, <math>\epsilon_r</math></b>	78,30	adim.
<b>Permitividad de un vacío, <math>\epsilon_0</math></b>	8,85E <sup>-12</sup>	C <sup>2</sup> /(J·m)
<b>Permitividad, <math>\epsilon</math></b>	6,93E <sup>-10</sup>	C <sup>2</sup> /(J·m)
<b>Constante de Boltzmann, k</b>	1,38E <sup>-23</sup>	J/K
<b>El número de Avogadro, <math>N_A</math></b>	6,02E <sup>+23</sup>	mol <sup>-1</sup>
<b>Carga eléctrica elemental, e</b>	1,60E <sup>-19</sup>	C
<b>Temperatura, T</b>	298,15	K
<b>Fuerza iónica, I</b>	1,00E <sup>-03</sup>	M
<b>Parámetro de Debye-Hückel, <math>\kappa</math></b>	1,04E <sup>+08</sup>	m <sup>-1</sup>
<b>Valencia electrolítica, z</b>	1	adim.

<sup>a</sup> Adim., Adimensional

## Capítulo 4

# Estructura secundaria de nanopartículas de fibroína de seda obtenidas con líquidos iónicos: un estudio de espectroscopia infrarroja

**Resumen:** La SF del gusano de seda *Bombyx mori* es un polímero biocompatible excepcional para la producción de biomateriales. Su impresionante combinación de resistencia, flexibilidad y degradabilidad está relacionada con la estructura secundaria de la proteína, la cual puede alterarse durante la fabricación de biomateriales. El presente capítulo analiza la estructura secundaria de la SF durante la producción de nanopartículas utilizando ILs y ultrasonidos de elevada potencia mediante un nuevo procedimiento basado en espectroscopía de infrarrojos. El espectro infrarrojo de las fibras de SF muestra una composición del 58% en lámina  $\beta$ , un 9% de estructuras en forma de giro y un 33% en estructuras irregulares y/o similares a giros. Cuando la SF se disolvió en ILs, su banda amida I se asemeja a la de la seda soluble y no se detectó absorción de lámina  $\beta$ . Las SFN regeneradas a partir de la disolución de ILs exhibieron una banda amida I que se asemeja a la de las fibras de SF, pero con un contenido reducido de lámina  $\beta$  y un incremento de giros correspondientes a la disminución de las láminas, lo que sugiere una transición incompleta de giros a láminas durante el proceso de regeneración. Tanto el análisis del espectro infrarrojo experimental como los cálculos computacionales del espectro sugieren que en dicha deficiencia está implicado un tipo particular de estructura de lámina  $\beta$ , mientras que en las fibras de SF se encuentran presentes otros dos tipos de estructura de lámina  $\beta$ .

**Carissimi, G.;** Baronio, C.M.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. On the Secondary Structure of Silk Fibroin Nanoparticles Obtained Using Ionic Liquids: An Infrared Spectroscopy Study. **Polymers (Basel)**. 2020, 12, 1294.



## 4.1. Introducción

La SF del gusano de seda *Bombyx mori* es una proteína fibrosa que presenta notables propiedades mecánicas, que aún son difíciles de conseguir por polímeros sintéticos [1]. Esta proteína es producida y almacenada en la glándula de seda posterior y media como un gel semilíquido, en el que la proteína se encuentra en un estado soluble en agua [2] con una estructura parcialmente ordenada [3], comúnmente conocida como *silk I*. Durante el proceso de hilado, la estructura secundaria de la SF cambia de semiordenada a una compuesta principalmente por láminas  $\beta$  antiparalelas, adoptando una estructura cristalina conocida como *silk II* [4,5]. Este estado es insoluble en agua y presenta todas las impresionantes y conocidas propiedades mecánicas de la seda [6]. La transición de estructura *silk I* a *silk II* se puede lograr fácilmente en el laboratorio y la seda regenerada resultante se puede utilizar para producir una gran variedad de materiales de bioingeniería [7,8], incluidos, entre otros, dispositivos de fijación de fracturas óseas [9], estructuras para ingeniería de tejidos [10–12], biosensores [13,14] y nanopartículas para aplicaciones de administración de fármacos [15,16]. Estas últimas han atraído una atención considerable debido a la capacidad de las SFN para cargar una amplia variedad de compuestos terapéuticos [17], mejorar la penetración celular [18] y la versatilidad que presenta la matriz de SF a través de la modificación química para programar diferentes funciones en la nanopartícula [19–22]. Para la aplicación de la SF en biotecnología, la estructura *silk I* representa un material de partida idóneo. Sin embargo, la obtención directa de la SF nativa con estructura *silk I* es muy costosa, ya que se basa en la extracción directa de las proteínas de la glándula del gusano [23] o en la purificación de proteínas recombinantes [24]. La alternativa común es usar las fibras ya hiladas (*silk II*) para producir *silk I*. Sin embargo, la producción de *silk I* a partir de *silk II* puede ser un desafío, ya que esta última presenta una gran red de enlaces de hidrógeno entre los monómeros de SF, que previenen su disociación.

Como ya se ha comentado previamente, el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo ha desarrollado un procedimiento novedoso para disolver la SF con estructura *silk II* en ILs acelerado por ultrasonidos [25]. La disolución de SF puede utilizarse directamente

para la producción de nanopartículas [26–28], cuando esta es precipitada sobre un disolvente orgánico polar como el metanol teniendo lugar un proceso de desolvatación que regenera la estructura de *silk II*. Este procedimiento representa una mejora con respecto a los métodos tradicionales [29,30] principalmente debido a: (i) la presión de vapor insignificante y la fácil reciclabilidad de los ILs, lo que los convierte en una alternativa más "ecológica" a los disolventes orgánicos convencionales [31–33], (ii) la posibilidad de obtener elevadas concentraciones de SF en una solución estable (hasta un 25% p/p [26]) y (iii) la facilidad general con la que la SF puede disolverse.

La estructura de *silk II* es conocida y ha sido estudiada previamente mediante cristalografía de rayos X [34], resonancia magnética nuclear (RMN) [35,36] y espectroscopía infrarroja [37,38]. Los modelos para la estructura de la *silk I* han sido presentados y respaldados por datos de RMN [3] e infrarrojos [37]. Sin embargo, la estructura de SF disuelta en ILs y la regeneración de la seda en nanopartículas a partir de esta solución nunca ha sido estudiada.

Hay muchos métodos disponibles para estudiar la estructura secundaria de las proteínas, los cuales tienen sus ventajas y desventajas. La cristalografía de rayos X proporciona una alta resolución estructural, pero esta técnica requiere el crecimiento de un cristal de proteína que excluye su aplicabilidad a los dominios amorfos de las fibras de SF [39]. La espectroscopía de RMN multidimensional es también una herramienta poderosa para las determinaciones estructurales y su implementación en estado sólido permite estudiar también proteínas grandes como la SF [36]. Por su parte, la microscopía crioelectrónica es una técnica relativamente nueva y potente para la determinación estructural pero no parece haber sido utilizada para obtener estructuras de resoluciones atómicas de seda. No obstante, estos métodos son costosos, requieren mucha manipulación y las proteínas de interés no pueden estudiarse en todas las condiciones que podrían ser de interés tecnológico. El análisis por dicroísmo circular (CD) es una alternativa útil para estimar las cantidades relativas de estructuras secundarias. Sin embargo, las estructuras de lámina  $\beta$  generan diversos espectros de CD en función de la torsión de la lámina lo que hace que el análisis de la SF sea bastante complicado [40,41]. Además, las muestras que contienen grandes partículas dispersarán una cantidad significativa de luz y las

fibras grandes tienden a precipitar, lo que tiene dos consecuencias: (i) conduce a artefactos en el espectro de CD [42] y (ii) el subconjunto de partículas/fibras con menor tamaño dominaran el espectro de CD.

Aquí, se optó por utilizar la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR), dado que es una herramienta versátil y económica para determinar la estructura secundaria de las proteínas [43–45]. Su principal ventaja para el presente estudio es que permite monitorizar todo el proceso de producción de nanopartículas. Nos centramos en la absorción de la banda amida I de la estructura de la proteína ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), que es causada principalmente por las vibraciones de estiramiento C=O de los grupos amida. Las vibraciones conjuntas de diferentes grupos amida se acoplan llevando a vibraciones colectivas con frecuencias que son sensibles a la estructura secundaria [46]. En consecuencia, las diferentes estructuras secundarias absorben en regiones espectrales específicas [44,47–50] pero el espectro también es sensible a otros detalles estructurales como la extensión y torsión de las láminas  $\beta$  [44,51,52]. El perfil de la banda amida I suele ser amplio y las bandas componentes de los diferentes elementos estructurales deben identificarse mediante procedimientos que impliquen una "mejora de la resolución" matemática, por ejemplo, mediante el cálculo de la segunda derivada, que enfatiza las bandas componentes agudas y suprime las amplias. Así, las bandas componentes identificadas de esta forma se utilizan luego para ajustar el espectro de absorbancia y el contenido relativo de la estructura secundaria es evaluado a partir de las áreas relativas de las bandas asociadas con las diferentes estructuras secundarias. La información sobre la estructura secundaria y la precisión de su estimación son generalmente similares para la espectroscopia infrarroja y de CD [53–56], con una posible mejor predicción de las láminas  $\beta$  mediante espectroscopía infrarroja [57–59]. El error absoluto del contenido de la estructura secundaria obtenido a partir de espectroscopía infrarroja se encuentra en el rango del 3% al 10% para varios métodos de evaluación diferentes [54–58,60–65].

En este trabajo, la banda amida I se analizó mediante un nuevo método basado en el ajuste simultáneo del espectro de absorción y de su segunda derivada [66]. El método minimiza la

desviación entre el ajuste y el espectro de absorbancia y, al mismo tiempo, la desviación entre la segunda derivada del ajuste y la segunda derivada del espectro de absorbancia experimental. De esta forma se aprovecha más información espectral que en el caso de utilizar solo el ajuste del espectro de absorción porque las bandas agudas dominan la segunda derivada del espectro, mientras que las bandas amplias tienen una influencia mayor en el espectro de absorbancia. En consecuencia, las bandas de componentes agudas son “capturan” mejor ajustando la segunda derivada, mientras que las bandas de componentes amplias se estudian mejor mediante el ajuste simultáneo del espectro de absorbancia. De esta forma se obtienen resultados de ajuste muy robustos. Además de los experimentos, se llevaron a cabo cálculos computacionales para simular el espectro de infrarrojo de diferentes estructuras de láminas  $\beta$  dentro de la SF para confirmar la asignación de banda. Utilizando este procedimiento, en este capítulo se estudia por primera vez la estructura secundaria de la SF en estado de fibra (*silk II*) disuelta en el IL acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>], y después de la regeneración en SFN. Los resultados mostraron que la SF disuelta no contiene estructuras de láminas  $\beta$  y que, tras la regeneración en SFN, se forman dos de los tres tipos de estructuras de láminas  $\beta$  que se encuentran en las fibras de SF, mientras que el tercer tipo se forma en menor medida. Más adelante se discutirán las implicaciones estructurales.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1 Materiales

El IL [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] (> 95% de pureza) fue suministrado por IoliTec GmbH (Heilbronn, Alemania) y se usó sin purificación adicional. Durante la experimentación, se utilizó agua purificada (18.2 M $\Omega$ ·cm a 25 °C) obtenida de un sistema de agua ultrapura Millipore Direct-Q1, (Billerica, MA, EE. UU). Todos los demás productos químicos y disolventes eran de pureza analítica y se utilizaron sin purificación adicional.

La SF utilizada en este estudio fue extraída de capullos de seda blancos de gusanos de seda *Bombyx mori* criados en las instalaciones de sericultura de IMIDA (Murcia, España) con una dieta a base de hojas frescas de *Morus alba L.* Las pupas intactas fueron extraídas a mano de los capullos de seda entre dos y siete días después del proceso de hilado para evitar

contaminación con el gusano. Para extraer la SF, los capullos de seda fueron triturados en un molino hasta 1 mm de tamaño de partícula y luego fueron hervidos en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 N durante 120 min para eliminar la SS, ceras y otras posibles impurezas. La SF insoluble fue enjuagada a fondo con agua ultrapura a 60 °C y fue secada al aire en una campana extractora hasta obtener un peso constante.

#### 4.2.2 *Disolución de fibroína de seda*

La solución de SF en  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  (SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ ) se preparó añadiendo gradualmente SF hasta un 10% p/p en  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  bajo la aplicación de ultrasonidos utilizando un Sonicador Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, CT, EE. UU.) equipado con una punta plana de 12 mm de diámetro al 30% de amplitud, en pulsos de 15s encendido/15s apagado hasta la completa disolución de la SF. La temperatura de la solución fue controlada constantemente para que no superara los 75 °C, para evitar la degradación de la proteína. Con el fin de reducir la viscosidad, se añadieron 3 mL de agua a 5 g de disolución de SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  (SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}$ ). Para evitar la superposición entre la banda amida I de la SF y la absorción del modo de flexión del  $\text{H}_2\text{O}$ , esta última fue substituida por  $\text{D}_2\text{O}$  para obtener el espectro de infrarrojo. La disolución resultante se denomina SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{D}_2\text{O}$  a lo largo de este capítulo.

#### 4.2.3 *Preparación de nanopartículas de fibroína de seda*

Las SFN se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Lozano-Pérez y colaboradores [26] con modificaciones [27]. Brevemente, la disolución de SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}$  fue calentada hasta 60 °C en un baño termostático y luego pulverizada sobre metanol frío (-20 °C) utilizando un inyector de dos fluidos con diámetro interno de 0.7 mm (Mini Spray Dryer B-290, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suiza, N ° de pieza 044698) y  $\text{N}_2$  a 1 bar de presión como dispersante del aerosol. Cuando la disolución de SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}$  entra en contacto con el metanol, se produce un proceso de desolvatación y se forman las nanopartículas. La dispersión recién formada se mantuvo en agitación durante 2 h para permitir el cambio estructural en la SF. Finalmente, las nanopartículas fueron lavadas tres veces (una con metanol

y dos con agua ultrapura) mediante sucesivas centrifugaciones y eliminación del sobrenadante y, posteriormente, fueron liofilizadas durante 72 h para obtener un polvo fino.

### 4.2.4 Espectroscopia infrarroja

Los espectros de absorción de infrarrojos fueron registrados con un espectrómetro FTIR Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) equipado con un accesorio ATR de diamante de una reflexión y ángulo de incidencia de  $45^\circ$  (Platinum, Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) y purgado continuamente con aire seco reducido en  $\text{CO}_2$ . Los interferogramas fueron registrados con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  con un factor de llenado de ceros de 2 y transformada de Fourier utilizando la función de apodización Blackman-Harris de 3 términos. Cada espectro medido se promedió a partir de 300 escaneos a una tasa de recopilación de datos de 160 kHz. Antes de cada medida, se adquirió un espectro de fondo sin muestra utilizando el mismo número de escaneos.

Los espectros de las fibras de SF orientadas estadísticamente ( $<1 \text{ mm}$ ) y de las muestras de SFN se obtuvieron presionando el polvo de proteína seca con la prensa del accesorio ATR sobre el cristal. Para las soluciones SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O, se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la disolución sobre el cristal del ATR y se midieron inmediatamente. También se registraron los espectros del IL y del IL con D<sub>2</sub>O para utilizarlos posteriormente para restar el disolvente de las disoluciones de SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O, respectivamente. Para cada caso, la influencia del factor de resta en los espectros de amida I resultantes se analizó utilizando tres valores diferentes (Figura S4.1). Los datos espectrales fueron pretratados trazando una línea de base recta desde  $1740$  a  $1560 \text{ cm}^{-1}$  para las fibras de SF y las SFN y desde  $1720$  a  $1600 \text{ cm}^{-1}$  para disoluciones de SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O. En ningún caso fue necesario aplicar correcciones por absorbancia de vapor de agua.

Las cadenas laterales de aminoácidos a veces generan problemas durante el análisis cuando se ajustan bandas de componentes a la banda amida I. Sin embargo, la composición aminoacídica de la SF está determinada fundamentalmente por tres aminoácidos, glicina

(46.3%), alanina (30.8%) y serina (8.9%) [67], ninguno de los cuales da una señal en la región amida I [68]. Los aminoácidos que se absorben en la región amida I y están presentes en la SF son tirosina (5.0%), glutamina (1.3%) y arginina (0.5%) [67]. Los dos últimos están en una concentración demasiado baja para tener un efecto significativo. Sin embargo, la tirosina tiene una concentración más alta y presenta dos bandas de absorción a 1590 y 1615  $\text{cm}^{-1}$  en estudios de compuestos modelo [69]. No obstante, sus absorptividades molares son bastante bajas [64] y, por tanto, la contribución de la tirosina fue despreciada para el análisis de los espectros.

#### 4.2.5 *Análisis espectral y ajuste de curvas*

La estructura secundaria de la SF se analizó mediante el ajuste de bandas del espectro de amida I y su segunda derivada simultáneamente como describen Baldassarre y colaboradores [66]. El ajuste de la banda se realizó utilizando el software *Kinetics* elaborado y amablemente proporcionado por el profesor Erik Goormaghtigh (ULB, Bruselas) basado en el lenguaje de programación MATLAB y ejecutado en MATLAB versión 2013b. La segunda derivada se suavizó con el algoritmo Savitzky-Golay utilizando 13 puntos consecutivos y fue multiplicada por un factor de 300 para aumentar su peso en el ajuste. La segunda derivada de la banda amida I se utilizó para decidir el número y la posición inicial de las bandas para luego ser ajustadas por *Kinetics*. Se permitió que las bandas se movieran en un rango de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$  desde su posición inicial. El contorno de las bandas utilizadas fue un promedio ponderado de una línea gaussiana y lorentziana con un peso inicial de 0.5 y el programa era libre de establecer cualquier peso. El programa ajustó el ancho completo a la mitad de la altura (FWHH) de las bandas en un rango de 0 a 50  $\text{cm}^{-1}$ , comenzando en 25  $\text{cm}^{-1}$ . El contenido de la estructura secundaria se estimó a partir de las áreas relativas de las bandas.

#### 4.2.6 *Cálculos computacionales de la banda Amida I*

Los cálculos fueron realizados para dos estructuras de SF diferentes, que se basaron en los modelos proporcionados por Asakura y colaboradores [70]. Estos modelos se ampliaron a capas apiladas de láminas  $\beta$  más grandes utilizando el programa Mercury y se editaron manualmente para eliminar los residuos que sobresalían del centro de las láminas apiladas.

## Capítulo 4

Cada estructura se compone del mismo número de hebras (32 hebras) y del mismo número de residuos por hebra (8 grupos amida completos por hebra). Las hebras están organizadas en 4 capas de láminas  $\beta$  con 8 hebras cada una.

Los espectros de amida I simulados fueron calculados a partir de matrices de fuerza constante de masa normalizada (matriz F) utilizando un programa escrito en MATLAB [71]. Inicialmente, se asignó a cada grupo amida una constante de fuerza diagonal normalizada en masa de  $1.7128 \text{ mdyn}\text{\AA}^{-1} \text{ u}^{-1}$ , correspondiente a  $1705 \text{ cm}^{-1}$ . Los elementos diagonales de las matrices F se modificaron de acuerdo con el efecto del entorno local [72] y el efecto del enlace de hidrógeno entre grupos amida, utilizando un modelo sugerido por Ge y colaboradores [73], que se basa en la energía de enlaces de hidrógeno propuesta por Kabsch-Sander [74]. Los coeficientes para calcular el cambio de frecuencia del enlace de hidrógeno al oxígeno del carbonilo y el hidrógeno de la amida fueron  $2.4 \text{ cm}^{-1}/\text{kcal}$  y  $1.0 \text{ cm}^{-1}/\text{kcal}$ , respectivamente. Las constantes de acoplamiento se obtuvieron a partir de cálculos de teoría funcional de la densidad para las interacciones vecinas más cercanas [72] y se calcularon a partir del acoplamiento de dipolos de transición para otras interacciones. Los parámetros utilizados para calcular las constantes de acoplamiento del dipolo de transición fueron optimizadas previamente [75]. La magnitud de la derivada del dipolo se fijó en  $2.20 \text{ D}\text{\AA}^{-1} \text{ u}^{-1/2}$ , el ángulo fue fijado en  $22^\circ$  y A, un parámetro que describe el efecto del enlace de hidrógeno en la magnitud de la derivada del dipolo, fue fijado en 0.01 cm. La posición del momento dipolar de transición se ubicó a  $1.043 \text{ \AA}$  del átomo de C a lo largo del enlace C=O y  $0.513 \text{ \AA}$  a lo largo del enlace C-N.

Los número de onda y las intensidades de los modos normales de la banda amida I se recuperaron de la solución del problema de valores propios y vectores propios de las matrices F [76]. Los espectros de la banda amida I se calcularon asumiendo líneas gaussianas con  $16 \text{ cm}^{-1}$  de ancho total a la mitad del máximo para cada modo normal de amida I.

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1 Fibras de fibroína de Seda

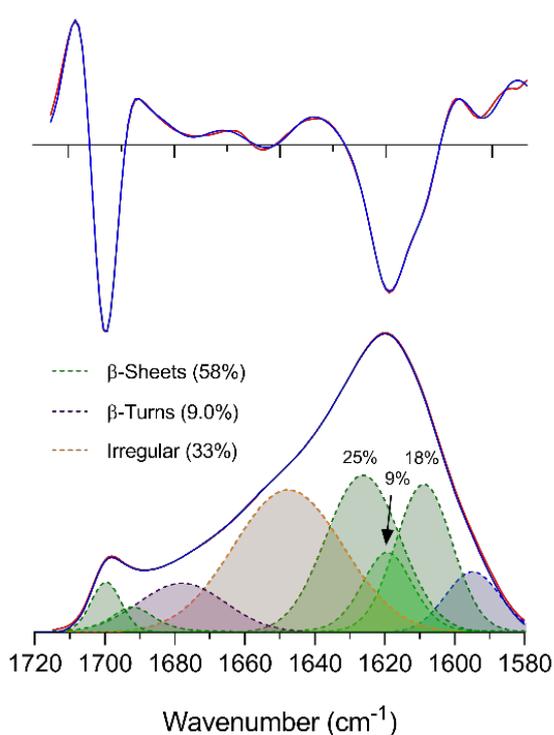
Mediante espectroscopía infrarroja se analizó la estructura secundaria de la SF de *Bombyx mori* en estado de fibras, disueltas en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] (SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]) y en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y D<sub>2</sub>O (SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O), y después de la regeneración en forma de SFN.

Los resultados para el ajuste de bandas de la banda amida I de la fibra de SF se presentan en la Figura 4.1, mientras que los parámetros de las bandas para todos los ajustes se pueden encontrar en la Tabla 4.1. La banda amida I se ajustó con ocho bandas, de las cuales la banda por debajo de 1600 cm<sup>-1</sup> se consideró absorción de grupos de cadena laterales y no se incluyó en el porcentaje total de absorbancia en la región amida I. Las bandas en 1700 y 1692 cm<sup>-1</sup>, se asignaron al componente con número de onda elevado de láminas β antiparalelas [43,77]. Se eligió una banda en 1678 cm<sup>-1</sup> para ajustar la región de número de onda medio-alto (1690-1660 cm<sup>-1</sup>) y se asignó a estructuras en forma de giro [38,62]. En la región media de la banda amida I (1635-1660 cm<sup>-1</sup>), se utilizó una banda a 1648 cm<sup>-1</sup> para el modelo y se logró un ajuste perfecto para el espectro de absorbancia y un buen ajuste para la segunda derivada. Incluso cuando se utilizaron dos o tres bandas, el ajuste en la región media no mejoró (datos no mostrados). Elegimos utilizar el modelo más simple y asignamos el área de la banda a 1648 cm<sup>-1</sup> (33% de todo el área de amida I) a estructuras irregulares [78] y en forma de giro. En principio, esta banda también podría asignarse a hélices α, cuya presencia se ha descrito previamente en la región media de la banda de amida I para fibras de SF en estudios de infrarrojo [38,79,80]. Sin embargo, los datos experimentales recientes no apoyan la presencia de hélices α en la estructura *Silk II* [36], por lo que no fueron consideradas en nuestra interpretación. Además, el ancho de la banda está en consonancia con la asignación de estructuras irregulares [78].

**Tabla 4.1.** Parámetros de las bandas ajustadas de fibras de SF, SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>], SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O y SFN.

Centro (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad	FWHH (cm <sup>-1</sup> )	fg <sup>a</sup>	Área relativa (%)
<b>Fibras de SF– secas/estado-H</b>				
1700	0.0139	10.1	0.90	3.3
1692	0.0070	14.6	0.46	2.9
1678	0.0136	29.2	1.00	9.0
1648	0.0394	36.8	1.00	32.9
1626	0.0435	24.9	1.00	24.6
1619	0.0221	17.0	0.82	9.2
1609	0.0410	19.0	0.96	18.1
<b>SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/estado-H</b>				
1692	0.0134	18.8	0.85	11.7
1680	0.0253	21.1	1.00	23.3
1659	0.0526	28.4	1.00	65.0
<b>SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O/parcialmente deuterado</b>				
1686	0.0018	19.5	1.00	2.1
1672	0.0187	28.4	1.00	31.8
1648	0.0334	33.0	1.00	66.1
<b>SFN – secas/estado-H</b>				
1700	0.0262	9.5	1.00	2.1
1692	0.0143	15.1	0.28	2.4
1674	0.0536	35.4	1.00	15.9
1646	0.1157	34.3	1.00	33.4
1624	0.1353	24.4	1.00	27.7
1621	0.0743	15.0	0.71	10.6
1610	0.0599	15.7	1.00	7.9

<sup>a</sup> Los valores de fg denotan la fracción contributiva al contorno total de la línea gaussiana. SF, fibroína de seda; [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>], acetato de 1-etil-3-metilimidazolio; SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>], fibroína de seda disuelta en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]; SF-[emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>]/D<sub>2</sub>O, fibroína de seda disuelta en [emim<sup>+</sup>][AcO<sup>-</sup>] y agua deuterada; SFN, nanopartículas de fibroína de seda; FWHH, amplitud completa a media altura.



**Figura 4.1.** Ajuste de bandas a la banda amida I y su segunda derivada de las fibras SF. Arriba: segunda derivada de la absorbancia; abajo: espectro de absorbancia de ATR-FTIR. Azul: espectro experimental y segunda derivada experimental; Rojo: espectro ajustado y segunda derivada ajustada. La absorbancia máxima de ATR fue de 0.083 a 1620 cm<sup>-1</sup>.

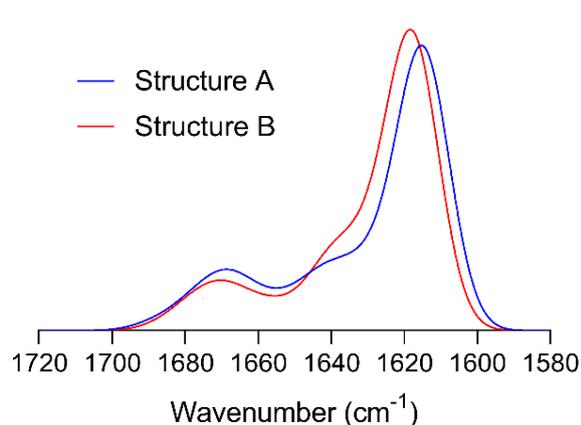
Según el análisis de la segunda derivada de la banda amida I en la región de la lámina  $\beta$  (ca. 1610-1640 cm<sup>-1</sup> [78], Figura 4.1), esta contiene al menos tres bandas: una ubicada a 1619 cm<sup>-1</sup> correspondiente al pico central, una segunda a 1609 cm<sup>-1</sup> correspondiente al hombro de la banda principal del espectro de absorbancia, y una tercera banda que se infiere de la asimetría de la banda principal en ca. 1630 cm<sup>-1</sup>. Es de tener en cuenta que nuestra asignación de la banda en 1609 cm<sup>-1</sup> a láminas  $\beta$  se diferencia de asignaciones anteriores a Tyr [38,81] y esto se debe a su baja abundancia relativa en la proteína (5%) y a su absorción relativamente débil [64].

La introducción de tres bandas en la región de número de onda al programa proporcionó un buen ajuste de la región espectral y su segunda derivada con bandas centradas en 1626, 1619 y 1609 cm<sup>-1</sup>, posiblemente indicando tres estructuras de lámina  $\beta$  diferentes. Cabe mencionar que se obtuvo un ajuste deficiente en la segunda derivada si la banda de 1626 cm<sup>-1</sup> no era incluida (datos no mostrados). El contenido total de láminas  $\beta$  estimado por este estudio fue del 58%, lo cual está en consonancia con estudios previos de infrarrojo [82], Raman-IR [83] y RMN [35] que indican un contenido de lámina  $\beta$  de 50%, 50% y 60%, respectivamente.

Las tres bandas correspondientes a láminas  $\beta$  mencionadas fueron asignadas a diferentes estructuras de láminas  $\beta$  sugeridas en estudios anteriores. La estructura *silk II* se compone de regiones cristalinas y no cristalinas, que representan el 56% y el 44% de la fibra, respectivamente. En 1999, Takahashi y colaboradores [34] propusieron un modelo de dos estructuras de láminas  $\beta$  apiladas presentes en la región cristalina. Estas dos estructuras se definen por la orientación del grupo metilo de las alaninas en la secuencia de poli (AG) dentro de las láminas apiladas, que ocurren estadísticamente en una proporción de 2:1 dentro de la unidad de cristal, denominada A y B, respectivamente. Este modelo fue redefinido posteriormente por Asakura y colaboradores [35] en 2002 que corrigieron las distancias de enlaces de hidrogeno. En el modelo de Takahashi, las longitudes de los enlaces de hidrógeno entre cadenas NH  $\cdots$  OC son de 2.1 Å para Ala y 2.6 Å para Gly, mientras que en el modelo Asakura ambas distancias son 1.8 Å, determinadas a partir del mismo desplazamiento químico en estudios de RMN [70]. Además, Asakura y colaboradores [36] propusieron la existencia de un tercer tipo de lámina  $\beta$ , una lámina deformada en la fracción no cristalina de la estructura *silk II*. En general, sus ensayos experimentales indicaron un 22% de láminas  $\beta$  distorsionadas, más un 25% y un 13% de los dos modelos de láminas  $\beta$  apiladas, lo que suma un contenido total de láminas  $\beta$  del 60% [70]. Este número está en consonancia con nuestros resultados del 58% para el contenido total de láminas  $\beta$ . Curiosamente, la banda a 1626  $\text{cm}^{-1}$  en nuestros resultados representó el 25% de la absorción en el rango amida I, mientras que las bandas de 1619 y 1609  $\text{cm}^{-1}$  representaron el 9% y 18%, respectivamente. Debido a que las láminas  $\beta$  distorsionadas aparecen en números de onda más altas que las láminas planas [52], asignamos la banda de número de onda alto a láminas distorsionadas. Las áreas de las bandas correspondientes a número de onda bajo y medio poseen una relación 2:1, igual que la encontrada para los modelos estructurales A y B, respectivamente, en el trabajo de Asakura y colaboradores. Por lo tanto, se asignó la banda de 1609  $\text{cm}^{-1}$  a la estructura A y la banda de 1619  $\text{cm}^{-1}$  a la estructura B.

Hasta ahora, las bandas descritas utilizando espectroscopía ATR-FTIR no han sido asignadas previamente a las diferentes estructuras de láminas  $\beta$  de la SF. Por esta razón, se

puso a prueba nuestra hipótesis de que la estructura A absorbe en un número de onda más baja que la estructura B mediante cálculos computacionales del espectro infrarrojo de estas estructuras utilizando los modelos proporcionados por Asakura y colaboradores [70]. Los resultados se muestran en la Figura 4.2, donde se puede ver que la estructura A sí absorbe en números de onda más bajas que la estructura B, lo que respalda la asignación de banda propuesta anteriormente.

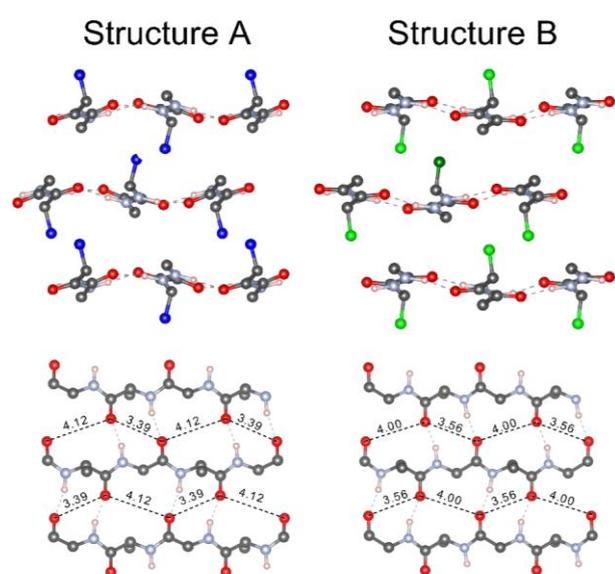


**Figura 4.2.** Espectros simulados de la banda amida I para las estructuras A y B de láminas  $\beta$  antiparalelas [70].

La diferencia principal entre las dos estructuras radica en la orientación del grupo metilo de la alanina como se representa en la Figura 4.3, fila superior. Por un lado, en la estructura A, el grupo metilo apunta hacia un  $H\alpha$  de Gly. Por otro lado, en la estructura B, el grupo metilo apunta al centro del par de enlaces de hidrógeno Gly $\cdots$ Ala entre cadenas. Las diferentes orientaciones de los grupos metilo están acompañadas por diferencias más sutiles en la estructura de la cadena principal, que comprenden diferentes ángulos diedros, longitudes de enlaces de hidrógeno y distancias entre los oxígenos de los carbonilos en cadenas adyacentes. Las diferentes distancias entre los oxígenos para las estructuras A y B, indican una posición lateral ligeramente diferente entre dos cadenas adyacentes. La distancia entre el oxígeno de una cadena y los dos oxígenos más cercanos de las cadenas adyacentes es menor en la estructura B (3.56 y 4.00 Å) que en la estructura A (3.39 y 4.12 Å) como se muestra en la Figura 4.3, fila inferior. Esto tendrá consecuencias en el espectro de la banda amida I debido a que las interacciones de los grupos amida más cercanos en las cadenas adyacentes (conectadas por un bucle pequeño de enlace de hidrógeno) conducen a un desplazamiento descendente de la banda

principal de la lámina  $\beta$ , mientras que con el siguiente grupo amida más cercano (conectado por un bucle grande de enlace de hidrógeno) conducen a un desplazamiento ascendente [84,85]. Las distancias indican que la interacción de desplazamiento descendente es más fuerte en la estructura A y la interacción de desplazamiento ascendente más débil. Esta expectativa es confirmada mediante una inspección de las constantes de acoplamiento determinadas en el curso de nuestros cálculos del espectro. Se concluye que los diferentes desplazamientos laterales de las cadenas adyacentes en la seda A y B contribuyen a las diferentes posiciones espectrales del máximo de absorción de amida I.

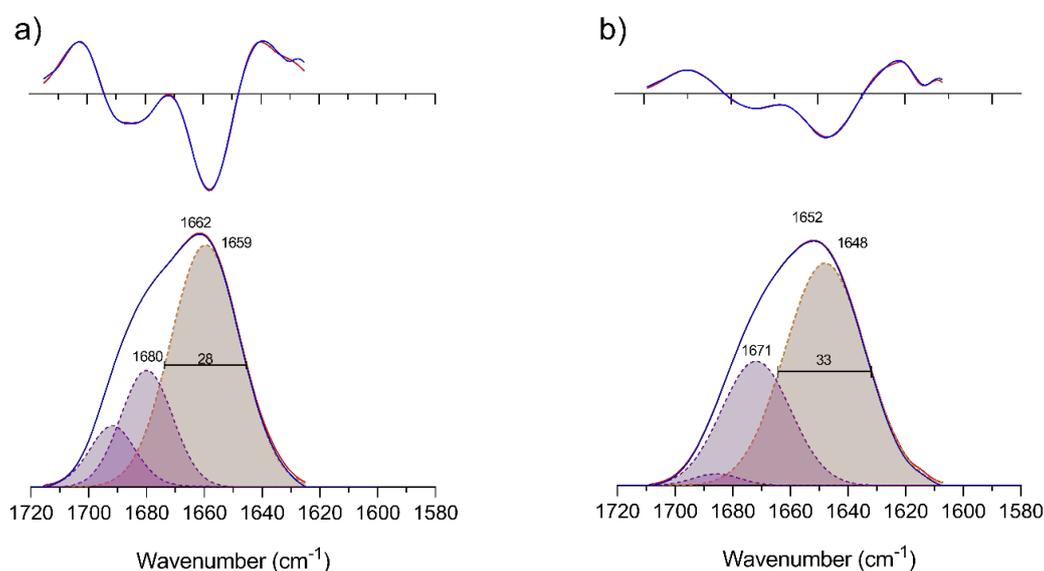
Resumiendo esta asignación de bandas para la fibra de SF, puede afirmarse que nuestro análisis proporciona una excelente concordancia con el estudio de RMN de Asakura y colaboradores [70]. Se ha reproducido el contenido total de lámina  $\beta$  y la cantidad de láminas  $\beta$  distorsionadas con diferencia de un pequeño porcentaje. También se obtuvo la relación 2:1 entre las ocurrencias de las estructuras A y B (aunque el contenido absoluto de estas estructuras es algo menor que en el estudio de RMN). Esta concordancia valida el procedimiento utilizado en este capítulo y demuestra que es posible distinguir diferentes tipos de lámina  $\beta$  en la SF mediante espectroscopía infrarroja.



**Figura 4.3.** Modelos moleculares de estructuras A (columna izquierda) y B (columna derecha). Fila superior, diferente orientación del grupo metilo de las estructuras A y B con sus respectivos grupos de metilo etiquetados en azul y verde. Fila inferior, distancias entre los oxígenos más cercanos en cadenas adyacentes. Las distancias se miden en Ángstrom (Å) [70].

### 4.3.2 Disolución de fibroína de seda en líquido iónico y líquido iónico acuoso

La banda amida I de la SF disuelta en  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  y  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{D}_2\text{O}$  no mostró absorción de lámina  $\beta$  ya que no se detectaron bandas en la región de  $1610\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$  (Figura 44), tal y como se encuentra reportado para la SF con estructura *silk I* en estudios anteriores [86–88]. El ajuste de la banda de amida I en ambos disolventes se realizó con 3 bandas. En ambos casos, la banda ubicada en números de onda más bajas cubre dos tercios del área de la banda amida I y el tercio restante se dividió entre las otras dos bandas. En la disolución que contiene  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 4.4b), las bandas son más anchas y están ubicadas a  $10\text{ cm}^{-1}$  menos en el espectro. Se observó un cambio descendente de la misma magnitud cuando se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  (Figura S4.1), lo que indica que los grupos  $\text{C}=\text{O}$  están participando en una red de enlaces de hidrógeno con agua [89]. El área de la banda posicionada en los números de onda más alto se redujo drásticamente, lo que sugiere que algunas estructuras son menos estables en presencia de agua o que los carbonilos libres se unen al H del agua y, por lo tanto, se desplazan al rojo. La omisión de esta banda provocó un ajuste deficiente (datos no mostrados).



**Figura 4.4.** Ajuste de bandas de la banda amida I y su segunda derivada de la SF disuelta en (a)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  y (b)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  y  $\text{D}_2\text{O}$  después de restar la absorbancia de los disolventes. Arriba: segunda derivada de la absorbancia; abajo: espectro de absorbancia de ATR. Azul: espectro experimental y segunda derivada experimental; Rojo: espectro ajustado y segunda derivada ajustada. La absorbancia de ATR máxima fue 0.055 a  $1662\text{ cm}^{-1}$  para el panel (a) y 0.037 a  $1652\text{ cm}^{-1}$  para el panel (b).

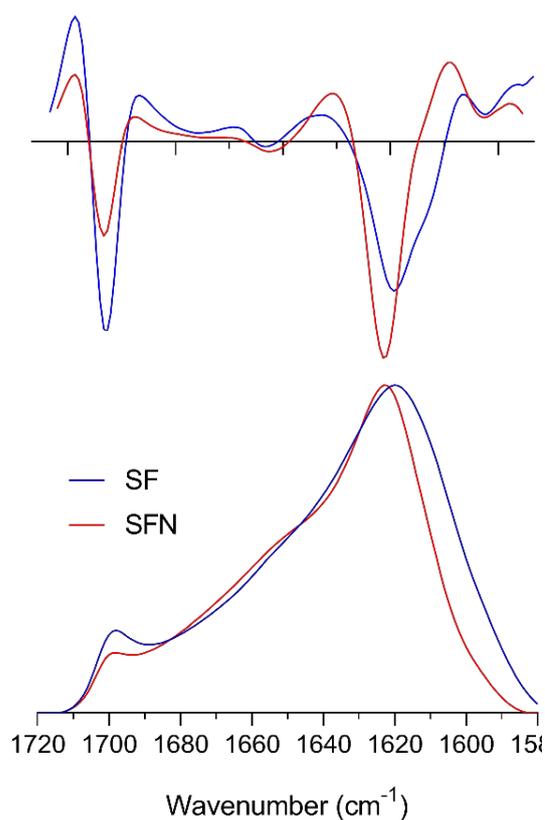
No es fácil realizar una asignación de banda aquí, ya que no hay referencias previas sobre estructuras secundarias de proteínas en ILs. Sin embargo, la asignación a estructuras irregulares y giros estaría en línea con las asignaciones de bandas convencionales para proteínas en una solución acuosa. Sohn y colaboradores [90,91] sugirieron que el estado de *silk I* debe tener un orden de estructura superior en lugar de simplemente una combinación de estructuras aleatorias para lograr el nivel de organización que requiere la estructura *silk II*. Asakura y col. [3] propusieron una estructura de giros  $\beta$  de tipo II repetida para la secuencias poli AG de la SF en el estado de *silk I*. Mediante espectroscopía infrarroja se han obtenido evidencias de los giros  $\beta$  de tipo II en la estructura de la *silk I* [37,92]. Esta estructura consta de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el átomo de oxígeno del carbonilo de un residuo Gly en la posición  $i$  y un residuo Ala en la posición  $i+3$ . Aunque la posible presencia de una hélice  $\alpha$  en la SF con estado *silk I* ha sido rechazada en estudios previos [36,93], esta u otra estructura en la disolución del IL no puede descartarse por completo.

### 4.3.3 Nanopartículas de fibroína de seda

Después de disolver la SF en el IL y su posterior regeneración en nanopartículas, el contorno de la banda amida I de las SFN se asemeja a la de las fibras de SF con estructura *silk II*, pero con cambios sutiles que se pueden apreciarse mejor a partir de su segunda derivada (Figura 4.5). En el rango de número de onda bajos, la banda principal en *ca.*  $1620\text{ cm}^{-1}$  es más aguda y la absorbancia a  $1609\text{ cm}^{-1}$  se redujo drásticamente. Este cambio puede observarse claramente en la segunda derivada del espectro de absorbancia y podría indicar que alguna forma de estructura de lámina  $\beta$  se reduce en el proceso de formación de SFN en comparación con la observada en las fibras de SF. Además, la menor absorción medida a  $1700\text{ cm}^{-1}$  es una prueba más de un menor contenido en láminas  $\beta$ .

El ajuste de la banda amida I de las SFN (Figura 4.6) produjo un patrón de bandas similar al observado para las fibras de SF (Figura 4.1). Sin embargo, el área relativa de la banda de número de onda medio-alto en  $1674\text{ cm}^{-1}$  asignada a estructuras en forma de giros aumentó de 9% a 16%, mientras que el área relativa de la banda de número de onda baja en  $1610\text{ cm}^{-1}$ ,

asignada en este capítulo a láminas  $\beta$  de la estructura A, se redujo del 18% al 8% (Tabla 4.1). Las dos bandas de elevado número de onda asignadas a láminas  $\beta$  también se redujeron, especialmente la banda a  $1700\text{ cm}^{-1}$ . El resto de las bandas no mostró variación significativa.

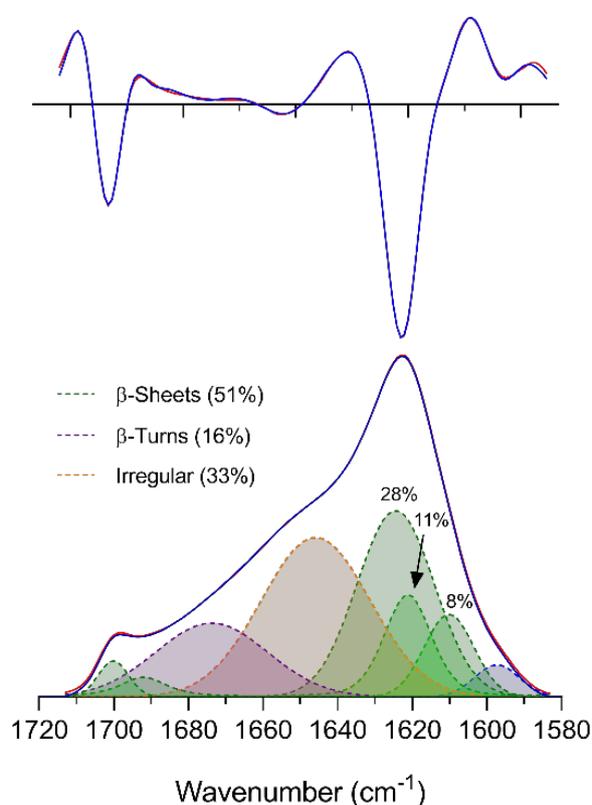


**Figura 4.5.** Espectro infrarrojo y su segunda derivada de fibras de SF (azul) y SFN (rojo). Arriba: segunda derivada de la absorbancia, abajo: espectro de absorbancia de ATR normalizado de la banda amida I. La absorbancia de ATR máxima fue 0.083 a  $1620\text{ cm}^{-1}$  para SF y 0.248 a  $1622\text{ cm}^{-1}$  para SFN.

La formación de láminas  $\beta$  a partir de la SF con estructura *silk I* puede desencadenarse mediante diferentes procesos, incluido el uso de disolventes orgánicos polares [94], estrés mecánico [95] y cambios de pH o fuerza iónica [96]. El proceso influye en la estructura de los productos de seda finales como lo indican sus diferentes espectros de IR en el rango amida I. Por ejemplo, las bandas asignadas a láminas  $\beta$  en películas de SF regeneradas a partir de diferentes procesos de procesamiento con agua mostraron áreas relativas de bandas correspondientes a láminas  $\beta$  significativamente diferentes [87,97]. La disparidad de intensidad de estas bandas de componentes indica que diferentes protocolos de regeneración regeneran las estructuras de la lámina  $\beta$  en distintos grados. La variación espectral incluye una banda cercana a  $1610\text{ cm}^{-1}$ , que se ha observado previamente en los espectros de IR de la seda regenerada [38,81,97,98]. Aparece como un marcado hombro cerca de  $1610\text{ cm}^{-1}$  en los

espectros de SF de *Antheraea assamensis*, cuando la SF es regenerada en isopropanol, pero este es más débil cuando se utilizaron otros disolventes [81]. La observación es paralela a nuestros resultados con la seda *Bombyx mori*, donde una banda en una posición espectral similar es más débil en la SF regenerada que en las fibras hiladas de forma nativa. A partir de posiciones espectrales similares, se llega a la conclusión de que un tipo similar de estructura de lámina  $\beta$  es sensible al proceso de regeneración en ambos tipos de seda y sugerimos que es la estructura A [70].

En resumen, las SFN sintetizadas en este capítulo presentaron un 7% más de estructuras en forma de giro que las fibras de SF y un contenido de láminas  $\beta$  un 7% menor. Estos resultados sugieren (i) que el proceso de regeneración de las láminas  $\beta$  de tipo A no fue completo, (ii) que las estructuras de láminas  $\beta$  distorsionadas y de tipo B se regeneran preferiblemente sobre las láminas  $\beta$  de tipo A en el procedimiento utilizado aquí, y (iii) que las estructuras en forma de giro se transforman en láminas  $\beta$ . Esta última afirmación concuerda con los modelos propuestos anteriormente según los cuales las láminas  $\beta$  se forman a partir de estructuras en forma de giro [3,90].



**Figura 4.6.** Ajuste de la banda amida I y su segunda derivada de SFN regeneradas. Arriba: segunda derivada de la absorbancia; abajo: espectro de absorbancia de ATR. Azul: espectro experimental y segunda derivada experimental; Rojo: espectro ajustado y segunda derivada ajustada. La absorbancia de ATR máxima fue de 0.248 a 1622 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.4. Conclusiones

Utilizando un nuevo procedimiento basado en espectroscopía de infrarrojos, se obtuvo una descripción detallada de los componentes de la estructura secundaria de las fibras de SF (*silk II*), de la SF disuelta en el líquido iónico y de las SFN regeneradas.

Según el análisis efectuado en este estudio, las fibras de SF contienen un 58% de láminas  $\beta$ , un 33% de estructuras irregulares y/o giros y un 9% de giros. Las tres bandas a 1626, 1619 y 1609  $\text{cm}^{-1}$  utilizadas para ajustar la región de láminas  $\beta$  se asignaron a láminas distorsionadas y las dos estructuras de láminas  $\beta$ , B y A [70], respectivamente. La asignación de las bandas fue respaldada por espectros de amida I obtenidos por simulación y la abundancia relativa de cada estructura está en consonancia con estudios previos realizados con RMN [70].

La SF disuelta en IL demostró tener una estructura similar a la SF con estructura *silk I*, caracterizada por el contorno de la banda amida I. Esto está en consonancia con la hipótesis que sostiene que la estructura *silk I* contiene estructuras irregulares y giros  $\beta$  de tipo II. Los resultados demuestran el poder de solvatación de los ILs para romper los enlaces de hidrógeno de las estructuras  $\beta$  hidrófobas, lo que tiene posibles aplicaciones en muchos otros campos, incluido el de las enfermedades amiloides [99]. Además, la pérdida de estructuras  $\beta$  detectada es una observación importante dado que presenta un punto de partida para la manipulación biotecnológica de las propiedades de la seda, para dar lugar a muchos biomateriales.

Las SFN regeneradas mostraron un contorno de la banda amida I y una composición de estructura secundaria similares a la de las fibras de SF, pero con una disminución del 7% en el contenido de la lámina  $\beta$  y un aumento en las estructuras con forma de giros de la misma magnitud. Estos resultados apuntan a una regeneración incompleta de la estructura de la lámina  $\beta$  a partir de estructuras con forma de giros en el proceso de regeneración utilizando metanol. Se sugiere que la estructura de lámina  $\beta$  afectada es del tipo A, mientras que las otras dos estructuras de lámina  $\beta$  conocidas se forman en una extensión similar a la de las fibras de SF.



## Referencias

1. Fink, T.D.; Zha, R.H. Silk and Silk-Like Supramolecular Materials. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39*, 1–17.
2. Sehnal, F.; Sutherland, T. Silks produced by insect labial glands. *Prion* **2008**, *2*, 145–153.
3. Asakura, T.; Ashida, J.; Yamane, T.; Kameda, T.; Nakazawa, Y.; Ohgo, K.; Komatsu, K. A repeated  $\beta$ -turn structure in poly(Ala-Gly) as a model for silk I of *Bombyx mori* silk fibroin studied with two-dimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 291–305.
4. Vollrath, F.; Knight, D.P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **2001**, *410*, 541–548.
5. Asakura, T.; Yao, J. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR study on structural heterogeneity in *Bombyx mori* silk fiber and their generation by stretching. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2706–2713.
6. Xu, G.; Gong, L.; Yang, Z.; Liu, X.Y. What makes spider silk fibers so strong? from molecular-crystallite network to hierarchical network structures. *Soft Matter* **2014**, *10*, 2116–2123.
7. Vepari, C.; Kaplan, D.L. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci.* **2009**, *32*, 991–1007.
8. Huang, W.; Ling, S.; Li, C.; Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 6486–6504.
9. Perrone, G.S.; Leisk, G.G.; Lo, T.J.; Moreau, J.E.; Haas, D.S.; Papenburg, B.J.; Golden, E.B.; Partlow, B.P.; Fox, S.E.; Ibrahim, A.M.S.; *et al.* The use of silk-based devices for fracture fixation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–9.
10. Fomby, P.; Cherlin, A.J.; Hadjizadeh, A.; Doillon, C.J.; Sueblinvong, V.; Weiss, D.J.; Bates, J.H.T.; Gilbert, T.; Liles, W.C.; Lutzko, C.; *et al.* skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2010**, *12*, 181–204.
11. Altman, G.H.; Horan, R.L.; Lu, H.H.; Moreau, J.; Martin, I.; Richmond, J.C.; Kaplan, D.L. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4131–4141.
12. Liu, H.; Fan, H.; Wang, Y.; Toh, S.L.; Goh, J.C.H. The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, *29*, 662–674.
13. Demura, M.; Asakura, T. Immobilization of glucose oxidase with *Bombyx mori* silk fibroin by only stretching treatment and its application to glucose sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33*, 598–603.
14. Xu, M.; Jiang, Y.; Pradhan, S.; Yadavalli, V.K. Use of Silk Proteins to Form Organic, Flexible, Degradable Biosensors for Metabolite Monitoring. *Front. Mater.* **2019**, *6*, 1–9.
15. Mottaghitalab, F.; Farokhi, M.; Shokrgozar, M.A.; Atyabi, F.; Hosseinkhani, H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J. Control. Release* **2015**, *206*, 161–176.
16. Pham, D.T.; Tiyaboonchai, W. Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. *Drug Deliv.* **2020**, *27*, 431–448.
17. Tomeh, M.A.; Hadianamrei, R.; Zhao, X. Silk fibroin as a functional biomaterial for drug and gene delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 1–22.

## Capítulo 4

18. Takeuchi, I.; Shimamura, Y.; Kakami, Y.; Kameda, T.; Hattori, K.; Miura, S.; Shirai, H.; Okumura, M.; Inagi, T.; Terada, H.; *et al.* Transdermal delivery of 40-nm silk fibroin nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *175*, 564–568.
19. Totten, J.D.; Wongpinyochit, T.; Carrola, J.; Duarte, I.F.; Seib, F.P. PEGylation-Dependent Metabolic Rewiring of Macrophages with Silk Fibroin Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 14515–14525.
20. Maziz, A.; Leprette, O.; Boyer, L.; Blatché, C.; Bergaud, C. Tuning the properties of silk fibroin biomaterial via chemical cross-linking. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2018**, *4*.
21. Pham, D.T.; Saelim, N.; Tiyaboonchai, W. Crosslinked fibroin nanoparticles using EDC or PEI for drug delivery: physicochemical properties, crystallinity and structure. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*, 14087–14103.
22. Pham, D.T.; Saelim, N.; Tiyaboonchai, W. Paclitaxel loaded EDC-crosslinked fibroin nanoparticles: a potential approach for colon cancer treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 413–424.
23. Hossain, K.S.; Ochi, A.; Ooyama, E.; Magoshi, J.; Nemoto, N. Dynamic light scattering of native silk fibroin solution extracted from different parts of the middle division of the silk gland of the *Bombyx mori* silkworm. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 350–359.
24. Arcidiacono, S.; Mello, C.; Kaplan, D.; Cheley, S.; Bayley, H. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 31–38.
25. Villora G., Lozano-Pérez, A. A., C.-A.J.L. Método para la obtención de partículas de proteína regenerada a partir de proteína disuelta, empleando líquidos iónicos y ultrasonidos 2015, Patente Española: ES 2482342.
26. Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cragolini, F.; Cenis, J.L.; Villora, G. Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *132*, 1–8.
27. Montalbán, M.; Coburn, J.; Lozano-Pérez, A.; Cenis, J.; Villora, G.; Kaplan, D. Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 126.
28. Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; Villora, G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 2045.
29. Ajisawa, A. Dissolution aqueous of silk fibroin with calciumchloride / ethanol solution. *J. Sericultural Sci. Japan* **1997**, *67*, 91–94.
30. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631.
31. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Rubio, M.; Villora, G. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using supported liquid membranes based on ionic liquids. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2007**, *46*, 818–824.
32. Hernández-Fernández, F.J.; de los Ríos, A.P.; Tomás-Alonso, F.; Gómez, D.; Villora, G. On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of

- rac-2-pentanol. *J. Memb. Sci.* **2008**, *314*, 238–246.
33. Rogers, R.D.; Seddon, K.R. Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science (80-. )*. 2003, *302*, 792–793.
  34. Takahashi, Y.; Gehoh, M.; Yuzuriha, K. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*). *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 127–138.
  35. Asakura, T.; Yao, J.; Yamane, T.; Umemura, K.; Ulrich, A.S. Heterogeneous structure of silk fibers from *Bombyx mori* resolved by <sup>13</sup>C solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8794–8795.
  36. Asakura, T.; Okushita, K.; Williamson, M.P. Analysis of the structure of *Bombyx mori* silk fibroin by NMR. *Macromolecules* **2015**, *48*, 2345–2357.
  37. Taddei, P.; Monti, P. Vibrational infrared conformational studies of model peptides representing the semicrystalline domains of *Bombyx mori* silk fibroin. *Biopolymers* **2005**, *78*, 249–258.
  38. Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* **2006**, *39*, 6161–6170.
  39. Cullity, B.D. *Elements of X-ray diffraction*; Addison-Wesley Pub. Co.: Reading, Mass., 1956;
  40. Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E3095 LP-E3103.
  41. Manning, M.C.; Illangasekare, M.; W. Woody, R. Circular dichroism studies of distorted  $\alpha$ -helices, twisted  $\beta$ -sheets, and  $\beta$ -turns. *Biophys. Chem.* **1988**, *31*, 77–86.
  42. Bustamante, C.; Tinoco, I.; Maestre, M.F. Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 3568–3572.
  43. Barth, A.; Zscherp, C. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 369–430.
  44. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101.
  45. Goormaghtigh, E.; Raussens, V.; Ruyschaert, J.M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1999**, *1422*, 105–185.
  46. Krimm, S.; Bandekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181–364.
  47. Goormaghtigh, E.; Cabiaux, V.; Ruyschaert, J.M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* **1994**, *23*, 405–450.
  48. Jackson, M.; Mantsch, H.H. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the determination of protein structure. *Biochemistry* **1995**, *30*, 95–120.
  49. Arrondo, J.L.R.; Muga, A.; Castresana, J.; Goñi, F.M. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**,

- 59, 23–56.
50. Fabian & Mäntele *In Handbook of vibrational spectroscopy*; Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 2002;
  51. Chirgadze, Y.N.; Nevskaya, N.A. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheet. *Biopolymers* **1976**, *15*, 627–636.
  52. Kubelka, J.; Keiderling, T.A. Differentiation of  $\beta$ -sheet-forming structures: Ab initio-based simulations of IR absorption and vibrational CD for model peptide and protein  $\beta$ -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12048–12058.
  53. Goormaghtigh, E.; Gasper, R.; Bénard, A.; Goldsztein, A.; Raussens, V. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: Redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, *1794*, 1332–1343.
  54. Lee, D.C.; Mitchell, R.C.; Haris, P.I.; Chapman, D. Determination of Protein Secondary Structure Using Factor Analysis of Infrared Spectra. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9185–9193.
  55. Baumruk, V.; Pancoska, P.; Keiderling, T.A. Predictions of secondary structure using statistical analyses of electronic and vibrational circular dichroism and fourier transform infrared spectra of proteins in H<sub>2</sub>O. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 774–791.
  56. Kalnin, N.N.; Baikalov, I.A.; Venyaminov, S.Y. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. III. Estimation of the protein secondary structure. *Biopolymers* **1990**, *30*, 1273–1280.
  57. Dousseau, F.; Pézolet, M. Determination of the Secondary Structure Content of Proteins in Aqueous Solutions from Their Amide I and Amide II Infrared Bands. Comparison between Classical and Partial Least-Squares Methods. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8771–8779.
  58. Sarver, R.W.; Krueger, W.C. Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis. *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 89–100.
  59. Pribic, R.; Vanstokkum, I.H.M.; Chapman, D.; Haris, P.I.; Bloemendal, M. Protein Secondary Structure from Fourier Transform Infrared and/or Circular Dichroism Spectra. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 366–378.
  60. Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.M.; Raussens, V. Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2946–2957.
  61. Oberg, K.A.; Fink, A.L. A new attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution. *Anal. Biochem.* **1998**, *256*, 92–106.
  62. Byler, D.M.; Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
  63. Dong, A.; Huang, P.; Caughey, W.S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3303–3308.
  64. Rahmelow, K.; Hübner, W.; Ackermann, T. Infrared absorbances of protein side chains. *Anal. Biochem.* **1998**, *257*, 1–11.
  65. Vedantham, G.; Sparks, H.G.; Sane, S.U.; Tzannis, S.; Przybycien, T.M. A holistic approach for

- protein secondary structure estimation from infrared spectra in H<sub>2</sub>O solutions. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 33–49.
66. Baldassarre, M.; Li, C.; Eremina, N.; Goormaghtigh, E.; Barth, A. Simultaneous fitting of absorption spectra and their second derivatives for an improved analysis of protein infrared spectra. *Molecules* **2015**, *20*, 12599–12622.
  67. Wray, L.S.; Hu, X.; Gallego, J.; Georgakoudi, I.; Omenetto, F.G.; Schmidt, D.; Kaplan, D.L. Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2011**, *99 B*, 89–101.
  68. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. **2000**, *74*, 141–173.
  69. Chirgadze, Y.N.; Fedorov, O. V.; Trushina, N.P. Estimation of amino acid side chain absorption in the IR spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* **1975**, *14*, 679.
  70. Asakura, T.; Ohata, T.; Kametani, S.; Okushita, K.; Yazawa, K.; Nishiyama, Y.; Nishimura, K.; Aoki, A.; Suzuki, F.; Kaji, H.; *et al.* Intermolecular packing in *B. mori* silk fibroin: Multinuclear NMR study of the model peptide (Ala-Gly)<sub>15</sub> defines a heterogeneous antiparallel antipolar mode of assembly in the silk II form. *Macromolecules* **2015**, *48*, 28–36.
  71. Karjalainen, E.-L.E.L.; Ersmark, T.; Barth, A. Optimization of model parameters for describing the amide I spectrum of a large set of proteins. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4831–4842.
  72. Gorbunov, R.D.; Kosov, D.S.; Stock, G. Ab initio-based exciton model of amide I vibrations in peptides: Definition, conformational dependence, and transferability. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*.
  73. Maekawa, H.; Toniolo, C.; Broxterman, Q.B.; Ge, N.H. Two-dimensional infrared spectral signatures of 310- And  $\alpha$ -helical peptides. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3222–3235.
  74. Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–2637.
  75. Baronio, C.M.; Barth, A. The Amide I Spectrum of Proteins – Optimization of Transition Dipole Coupling Parameters using Density Functional Theory Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 1703–1714.
  76. Torii, H.; Tasumi, M. *in Infrared spectroscopy of biomolecules*, eds. H. H. Mantsch and D. Chapman; Henry H. Mantsch, D.C., Ed.; Wiley-Liss, New York, 1996; ISBN ISBN: 978-0-471-02184-1.
  77. Karjalainen, E.L.E.-L.E.L.; Ravi, H.K.; Barth, A. Simulation of the amide I absorption of stacked  $\beta$ -sheets. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 749–757.
  78. Chirgadze, Y.N.; Brazhnikov, E. V. Intensities and Other Spectral Parameters of Infrared Amide Bands of Polypeptides in the  $\beta$ - and Random Forms. *Biopolymers* **1974**, *13*, 1701–1712.
  79. Zhou, C.Z.; Confalonieri, F.; Jacquet, M.; Perasso, R.; Li, Z.G.; Janin, J. Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *44*, 119–122.
  80. Edwards, H.G.M.; Farwell, D.W. Raman spectroscopic studies of silk. *J. Raman Spectrosc.* **1995**, *26*, 901–909.
  81. Goujon, N.; Rajkhowa, R.; Wang, X.; Byrne, N. Effect of solvent on ionic liquid dissolved

- regenerated antheraea assamensis silk fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128*, 4411–4416.
82. Paquet-Mercier, F.; Lefèvre, T.; Auger, M.; Pézolet, M. Evidence by infrared spectroscopy of the presence of two types of  $\beta$ -sheets in major ampullate spider silk and silkworm silk. *Soft Matter* **2013**, *9*, 208–215.
  83. Lefèvre, T.; Rousseau, M.E.; Pézolet, M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2885–2895.
  84. Huang, R.; Wu, L.; McElheny, D.; Bouř, P.; Roy, A.; Keiderling, T.A. Cross-strand coupling and site-specific unfolding thermodynamics of a trpzip  $\beta$ -Hairpin Peptide using  $^{13}\text{C}$  isotopic labeling and IR spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5661–5674.
  85. Huang, R.; Setnička, V.; Etienne, M.A.; Kim, J.; Kubelka, J.; Hammer, R.P.; Keiderling, T.A. Cross-strand coupling of a  $\beta$ -hairpin peptide stabilized with an Aib-Gly turn studied using isotope-edited IR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13592–13603.
  86. Chen, X.; Shao, Z.; Marinkovic, N.S.; Miller, L.M.; Zhou, P.; Chance, M.R. Conformation transition kinetics of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophys. Chem.* **2001**, *89*, 25–34.
  87. Hu, X.; Shmelev, K.; Sun, L.; Gil, E.S.; Park, S.H.; Cebe, P.; Kaplan, D.L. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1686–1696.
  88. Lu, Q.; Hu, X.; Wang, X.; Kluge, J.A.; Lu, S.; Cebe, P.; Kaplan, D.L. Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1380–1387.
  89. Nie, B.; Stutzman, J.; Xie, A. A vibrational spectral marker for probing the hydrogen-bonding status of protonated Asp and Glu residues. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2833–2847.
  90. Sohn, S.; Strey, H.H.; Gido, S.P. Phase behavior and hydration of silk fibroin. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 751–757.
  91. Sohn, S.; Gido, S.P. Wet-spinning of osmotically stressed silk fibroin. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2086–2091.
  92. Monti, P.; Taddei, P.; Freddi, G.; Ohgo, K.; Asakura, T. Vibrational  $^{13}\text{C}$ -cross-polarization/magic angle spinning NMR spectroscopic and thermal characterization of poly (alanine-glycine) as model for silk I *Bombyx mori* fibroin. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2003**, *72*, 329–338.
  93. Yamane, T.; Umemura, K.; Asakura, T. The structural characteristics of *Bombyx mori* silk fibroin before spinning as studied with molecular dynamics simulation. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8831–8838.
  94. Montalbán, M.G.; Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.; Coburn, J.M.; Kaplan, D.L.; Villora, G. Biopolymeric Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids. In *Recent Advances in Ionic Liquids*; IntechOpen, 2018; pp. 3–26.
  95. Xie, F.; Zhang, H.; Shao, H.; Hu, X. Effect of shearing on formation of silk fibers from regenerated *Bombyx mori* silk fibroin aqueous solution. *Biol. Macromol.* **2006**, *38*, 284–288.
  96. Zhou, P.; Xie, X.; Knight, D.P.; Zong, X.; Deng, F.; Yao, W. Effects of pH and Calcium Ions on the Conformational Transitions in Silk Fibroin Using 2D Raman Correlation Spectroscopy

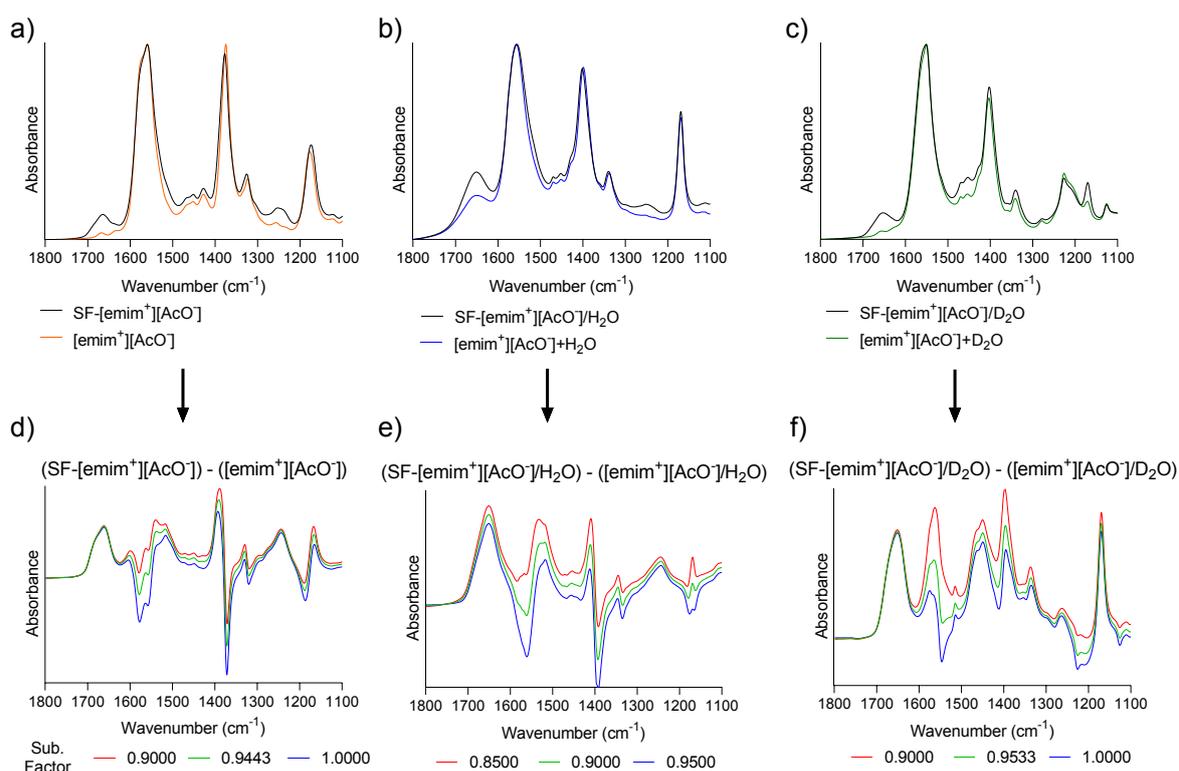
- and  $^{13}\text{C}$  Solid-State NMR. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11302–11311.
97. Cebe, P.; Partlow, B.P.; Kaplan, D.L.; Wurm, A.; Zhuravlev, E.; Schick, C. Silk I and Silk II studied by fast scanning calorimetry. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 323–332.
  98. Percot, A.; Colombari, P.; Paris, C.; Manh, H.; Wojcieszak, M.; Mauchamp, B. Water dependent structural changes of silk from *Bombyx mori* gland to fibre as evidenced by Raman and IR spectroscopies. *Vib. Spectrosc.* **2014**, *73*, 79–89.
  99. Takekiyo, T.; Yoshimura, Y. Suppression and dissolution of amyloid aggregates using ionic liquids. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 853–860.



## 4.5. Información suplementaria Capítulo 4

### Substracción espectral de los disolventes

Para estudiar la SF disuelta en  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  y  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{agua}$ , medimos los espectros de las soluciones y realizamos una resta para eliminar la absorción de los disolventes. Este procedimiento puede ser muy sensible al factor de resta utilizado. Por esta razón, se probaron varios factores de resta, los resultados se recogen en la Figura S4.1. Para la disolución SF- $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ , Figura S4.1d, se observa que la banda amida I resultante es insensible al factor de resta utilizado. En el caso de la disolución  $[\text{SF}-[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}]$ , Figura S4.1e, la banda de absorción de agua en *ca.* 1655 cae en la región amida I, lo que hace que el espectro de diferencia en esa región sea sensible al factor de resta. Para superar este problema, se utilizó agua deuterada en su lugar, donde la región amida casi no se ve afectada por el factor de resta utilizado como se muestra en la Figura S4.1f.



**Figura S4.1.** Fila superior: Disoluciones de SF en a)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$ , b)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}$  y c)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{D}_2\text{O}$ . Fila inferior: espectros de SF después de restar la absorción del disolvente d)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]$  e)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{H}_2\text{O}$  y f)  $[\text{emim}^+][\text{AcO}^-]/\text{D}_2\text{O}$  con diferentes factores de resta indicados en las cifras.



## Capítulo 5

# Cuantificación directa del contenido de fármaco en nanopartículas poliméricas mediante espectroscopía infrarroja

**Resumen:** La nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tales como los sistemas de administración de nanofármacos dirigidos, mecanismos de liberación controlada y liberación bajo demanda sensible a estímulos, así como la producción de agentes teranósticos. Es requisito indispensable para el uso de nanopartículas como sistemas de administración de fármacos poder cuantificar con precisión la cantidad de fármaco cargada, una tarea para la que actualmente se utilizan dos procedimientos. Sin embargo, ambos presentan ciertas deficiencias como pueden ser la dificultad de la extracción del fármaco y del proceso de separación sólido-líquido, así como errores de dilución. Este capítulo describe un método nuevo, robusto y simple para la cuantificación directa de fármacos en nanopartículas poliméricas utilizando ATR-FTIR, que puede adaptarse a una amplia variedad de sistemas de administración de fármacos. En este capítulo se utilizan SFN y naringenina (NAR) como nanoportador y fármaco modelo, respectivamente. Para validar el método se determinó la especificidad, linealidad, límite de detección, precisión y exactitud. Se observó una buena relación lineal entre el 0 y el 7.89% de la masa relativa de NAR con un coeficiente de correlación de 0.973. La precisión se determinó mediante el método de adición y recuperación. Los resultados mostraron una recuperación promedio del 104%. Se determinó que el límite de detección y el límite de cuantificación del contenido de carga de fármaco eran de 0.3 y 1.0%, respectivamente. La robustez del método se demuestra por las notables similitudes entre las calibraciones realizadas utilizando dos configuraciones de equipos distintas en dos instituciones diferentes.

**Carissimi, G.;** Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. Direct Quantification of Drug Loading Content in Polymeric Nanoparticles by Infrared Spectroscopy. **Pharmaceutics** 2020, 12, 912.



## 5.1. Introducción

El uso de nanopartículas como sistemas de administración de fármacos ya es una realidad, con más de 50 nanomedicinas aprobadas por la FDA en abril del 2016, y se prevén más en un futuro cercano [1]. El uso de nanopartículas como sistemas de administración puede proporcionar numerosos beneficios [2–4], incluida la administración del fármaco a células tumorales [5,6], la liberación controlada y la biodistribución [7], todo lo cual resulta en una reducción de los efectos secundarios y un aumento de la eficacia del fármaco [8,9]. Entre las nanopartículas poliméricas utilizadas como sistemas de administración, las nanopartículas basadas en SF del gusano de seda *Bombyx mori* han mostrado resultados prometedores, en parte debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad [10–16]. Su capacidad para penetrar membranas biológicas y su alta capacidad de carga de fármacos significa que las SFN puede mejorar en gran medida los tratamientos terapéuticos [17,18]. Además, la superficie SFN puede funcionalizarse con moléculas como péptidos u otras moléculas pequeñas de reconocimiento para la administración dirigida [19,20].

Sin embargo, para que las nanopartículas puedan ser utilizadas como sistemas de administración de fármacos la cantidad de fármaco cargado debe cuantificarse con precisión. Hasta la fecha, se utilizan principalmente dos procedimientos para esta tarea los cuales se basan en una medición directa o indirecta del contenido de fármaco cargado (DLC) en la nanopartícula. En el método indirecto [21–25], se prepara una solución de carga del fármaco y se determina su composición antes de añadirla a las nanopartículas. La dispersión se mantiene en agitación durante el periodo de carga por adsorción, y al final del proceso [13], las partículas se separan de la disolución de carga, normalmente por centrifugación o filtración, y se determina el fármaco restante en el sobrenadante. Finalmente, la cantidad de fármaco en las nanopartículas se calcula mediante un balance de materia. Sin embargo, como usualmente se utilizan elevadas concentraciones de fármaco para la solución de carga, se necesitan grandes factores de dilución para mantener la señal del analito en el rango operativo del equipo, cuando se utilizan espectrómetros UV-visible convencionales o cromatógrafos líquidos de alta resolución. Esto proporciona incertidumbre y, por lo tanto, reduce la exactitud y la precisión

del contenido de fármaco determinado. Además, este procedimiento no se puede utilizar para el control independiente del contenido de fármaco de nanoformulaciones comerciales, porque solo el productor tendrá acceso a la solución de carga. Además, el contenido de fármaco puede cambiar durante el almacenamiento, en cuyo caso un análisis de la solución de carga no tendrá sentido.

En cuanto al método directo [26–29], el fármaco es extraído de las partículas cargadas con un disolvente adecuado; luego, las partículas son sedimentadas mediante centrifugación y, finalmente, se determina el fármaco en el sobrenadante. Sin embargo, se ha demostrado que los métodos de separación como la filtración o la centrifugación no siempre son eficaces para separar las nanopartículas de la fase líquida, lo que conduce a errores en las mediciones espectroscópicas [30,31]. Aun así, extraer la totalidad del fármaco cargado no es tarea fácil y aún resulta más difícil verificar la cantidad extraída. Además, ambos métodos asumen que la absorción del fármaco está en el rango de UV-visible y que no hay interferencia de las nanopartículas y sus componentes disociados que pueden permanecer en disolución después del proceso de separación.

Por estas razones, este capítulo desarrolla un método robusto y simple para cuantificar directamente fármacos en dispersiones/suspensiones de nanopartículas que puede ser adaptado fácilmente para su uso con otros tipos de nanoestructuras. Hasta ahora, esta es la primera vez que se ha utilizado la ATR-FTIR para la cuantificación directa de la carga de fármaco de las nanopartículas. La espectroscopía infrarroja es una técnica ampliamente utilizada en la industria farmacéutica con aplicaciones que van desde análisis cualitativos a cuantitativos [32–37]. En cuanto a los análisis cuantitativos, su principal ventaja sobre la espectroscopía UV-visible es que prácticamente todos los compuestos absorben la luz infrarroja y, por tanto, pueden analizarse. Además, el espectro de infrarrojo muestra típicamente un gran número de bandas de absorción características con baja superposición dado que estas están distribuidas en un amplio rango espectral.

Como fármaco modelo, se ha utilizado NAR cargada en SFN. La NAR es un flavonoide natural [38,39], que recientemente ha demostrado su buena compatibilidad con la SF [16]. La

NAR ha atraído un gran interés en el campo de la medicina debido a sus propiedades antioxidantes [40], antiinflamatorias [41] y anticancerígenas [42–46]. Sin embargo, la cuantificación de NAR sigue siendo un problema, especialmente cuando se carga en nanopartículas basadas en proteínas, ya que su absorción máxima a 289 nm se superpone a la absorción de aminoácidos aromáticos de las proteínas. En este capítulo, la robustez del método propuesto se confirma por los resultados consistentes obtenidos en dos laboratorios diferentes en una colaboración entre la Universidad de Murcia (España) y la Universidad de Estocolmo (Suecia). Las dos instituciones utilizaron equipos diferentes y sus respectivas latitudes son significativamente diferentes, lo que significa que el rendimiento del método se puede comparar a diferentes temperaturas y en diferentes condiciones climáticas.

## 5.2. Materiales y Métodos

### 5.2.1 *Materiales*

La SF utilizada en este trabajo fue extraída de capullos de seda de *Bombyx mori* que fueron proporcionados por el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (Murcia, España). La SF se purificó como ha sido publicado anteriormente en la bibliografía [47]. Brevemente, los capullos de seda fueron triturados en un molino y se filtraron a través de una malla de acero inoxidable de 1 mm y después se hirvieron durante 2 h en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 N para eliminar la SS, las ceras y otras impurezas. Después, la SF se recogió en un filtro con tamaño de poro de 0.1 mm y se lavó a fondo con agua tibia para eliminar la SS libre. Finalmente, la SF se secó al aire en una campana extractora hasta que alcanzó un peso constante. La NAR fue suministrada por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se utilizó tal y como se recibió. Durante toda la experimentación se utilizó agua purificada obtenida a partir de un sistema de agua ultrapura Millipore Direct-Q1 (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  a 25 °C; Billerica, MA, EE. UU.).

### 5.2.2 Preparación de solución stock de nanopartículas y fármaco

Las SFN se prepararon como se describe en la bibliografía [13,16]. Las SFN liofilizadas se dispersaron en agua ultrapura mediante una sonda de ultrasonidos hasta una concentración final de 20 mg/mL. Se preparó una solución stock de 15 mg/mL de NAR en etanol agitando vigorosamente hasta alcanzar una disolución completa. A lo largo de la experimentación, todas las soluciones que contienen NAR se mantuvieron siempre protegidas de la luz.

### 5.2.3 Muestras de calibración para NAR en SFN

Para calibrar el método ATR-FTIR, se prepararon seis muestras con masas relativas de NAR ( $NAR\%$ ) de 0, 1.06, 2.10, 4.11, 6.04 y 7.89%, calculadas como se describe en la ecuación (5.1), donde  $m_{NAR}$  y  $m_{SFN}$  son las masas de NAR y SFN en la dispersión NAR/SFN, respectivamente.

$$NAR\% = \frac{m_{NAR}}{m_{NAR} + m_{SFN}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Las muestras se prepararon añadiendo un volumen fijo de dispersión stock de SFN, seguido de un volumen variable de solución stock de NAR y, finalmente, un volumen variable de etanol puro para que el volumen total fuera 100  $\mu$ L. El etanol puro se añadió para mantener una proporción constante de etanol al 30 V/V%, asegurando así que las SFN permanecieran dispersas sin precipitar y la NAR totalmente disuelta. La masa de SFN se mantuvo constante en todas las muestras y solo se incrementó la masa de NAR. Estas muestras fueron utilizadas para medir la contribución de NAR libre y adsorbida a las SFN, indistintamente al espectro de absorción infrarroja para construir la curva de calibración. Las muestras se prepararon diariamente y se midieron por triplicado en la Universidad de Estocolmo y en la Universidad de Murcia, dando un total de seis rectas de calibrado, las cuales se obtuvieron en días diferentes.

### 5.2.4 Muestras de SFN cargadas con NAR

Para comprobar la capacidad de detección y cuantificación de fármacos en nanopartículas mediante espectroscopía ATR-FTIR, se cargaron tres muestras de SFN con NAR mediante

incubación de las partículas en una disolución del fármaco con concentraciones de 0.30, 1.2 y 4.5 mg/mL durante 24 h. Las muestras se denominaron SFN<sub>NAR</sub>-0.3 mg/mL, SFN<sub>NAR</sub>-1.2 mg/mL y SFN<sub>NAR</sub>-4.5 mg/mL, de acuerdo con la concentración del fármaco en la solución de carga, y se prepararon por triplicado en diferentes días. La concentración final de SFN en cada muestra fue de 14 mg/mL y el volumen final de la muestra de carga fue de 100 µL. Al igual que para las muestras del calibrado, las disoluciones de carga de fármaco contenían etanol al 30%, lo que garantiza que las SFN permanecieran totalmente dispersas y la NAR totalmente disuelta. Las dispersiones de carga SFN/NAR fueron sonicadas antes de comenzar el período de incubación para asegurar la homogeneidad. Pasado el tiempo de incubación, las nanopartículas se centrifugaron durante 20 min a  $12.100 \times g$ , tras lo cual se eliminó el sobrenadante con el fármaco libre. Posteriormente, las nanopartículas se lavaron con etanol al 30% para eliminar el fármaco no adsorbido. Finalmente, las nanopartículas cargadas de fármaco se dispersaron en agua ultrapura mediante ultrasonidos antes de proceder a la cuantificación del fármaco.

El contenido de fármaco cargado (DLC) y la eficiencia de encapsulación (EE) de las SFN<sub>NAR</sub> se calcularon de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$DLC(\%) = \frac{\text{masa de NAR en la nanopartículas}}{\text{masa de SFN}_{NAR}} \cdot 100 \quad (5.2)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{masa de NAR en la nanopartículas}}{\text{masa de NAR en la disolución de carga}} \cdot 100 \quad (5.3)$$

En la ecuación (5.2), la masa de SFN<sub>NAR</sub> es la suma de las masas de NAR y SFN en las nanopartículas cargadas, es decir, el mismo valor que en el denominador de la ecuación (5.1). Por lo tanto, el DLC se puede determinar directamente a partir de la recta de calibrado.

### 5.2.5 *Adquisición de espectros y pretratamiento de datos*

Los espectros de absorción infrarroja medidos en la Universidad de Estocolmo se registraron en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) equipado con un detector de telururo de mercurio-cadmio refrigerado por nitrógeno líquido, y con un accesorio ATR de diamante con un ángulo de incidencia de  $45^\circ$  y una reflexión (Platinum, Bruker Optics, Ettlingen, Alemania). El equipo fue purgado continuamente con aire seco reducido en  $\text{CO}_2$ . Cada espectro medido se promedió a partir de 300 barridos a una velocidad de recopilación de datos de 9.38 barridos por segundo.

Los espectros de absorción infrarroja medidos en la Universidad de Murcia se registraron en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier iS5-Nicolet (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado y con un accesorio ATR de diamante con un ángulo de incidencia de  $45^\circ$  y una reflexión (módulo iD7 ATR, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Cada espectro medido fue el promedio de 32 barridos a una velocidad de recopilación de datos de 0.47 barridos por segundo.

En ambos casos, los interferogramas se registraron con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  con un factor de llenado de ceros de 2, y se realizó la transformada de Fourier utilizando la función de apodización de 3 términos de Blackman-Harris. Se recogió un espectro de fondo sin una muestra con el mismo número de barridos antes de cada medida. Los espectros de las muestras se adquirieron en forma de películas secas colocando  $2.5 \mu\text{L}$  de la dispersión de nanopartículas sobre el cristal ATR y secándola bajo una suave corriente de nitrógeno antes de medir como se describió anteriormente. El espesor de la película puede tener efectos significativos en el espectro ATR resultante [48,49]; para obtener resultados reproducibles, el espesor de la película seca debe ser mayor que la profundidad de penetración de la onda evanescente en la muestra. Para asegurar esto, se colocó un trozo de cinta plástica encima de la muestra de película seca, se aplicó presión con la prensa ATR y después se adquirió la medida. La ausencia de señales de la cinta en el espectro garantizó que la profundidad de penetración de la onda evanescente era menor que el grosor de la película seca y, por tanto, que la cantidad de muestra

colocada sobre el cristal ATR era suficiente. Este procedimiento se realizó solo una vez; a continuación, el volumen y la concentración se mantuvieron constantes durante el resto de la experimentación.

Como pretratamiento para la cuantificación del fármaco, cada espectro se obtuvo en la región entre 1350 y 900  $\text{cm}^{-1}$ ; luego, se restó una línea de base trazando líneas rectas entre los mínimos del espectro de las SFN en 1350, 1316, 1185, 1134 y 900  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente, la escala de absorbancia se normalizó a 1 utilizando la banda amida III de la SF (1229  $\text{cm}^{-1}$ ). Se eligió la banda de 1085  $\text{cm}^{-1}$  de NAR para cuantificar el contenido de NAR en SFN debido a su alto coeficiente de absorción y su insensibilidad a la incorporación de NAR en SFN (ver Resultados y Discusión). Las muestras del calibrado se utilizaron para establecer una correlación entre la cantidad de NAR y la absorbancia a 1085  $\text{cm}^{-1}$  tal y como se describe en Resultados y Discusión.

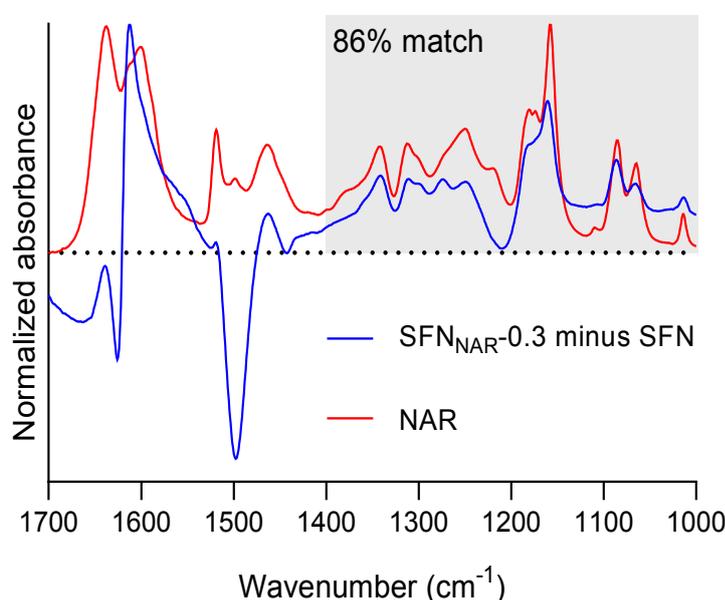
### 5.3. Resultados y Discusión

#### 5.3.1 Especificidad de la espectroscopia ATR-FTIR para identificar fármacos en SFN

La especificidad de la espectroscopia ATR-FTIR se comprobó analizando la coincidencia espectral entre el espectro de SFN<sub>NAR-0.3</sub> y el de NAR pura. Antes de comparar ambos espectros, se restó un espectro de SFN al espectro de SFN<sub>NAR-0.3</sub>. Como no fue posible realizar una sustracción consistente de las bandas de amida I y II de las SFN, el criterio elegido para la resta espectral fue obtener una banda positiva y una negativa en las posiciones de las bandas de amida I y II, respectivamente, mientras intentamos maximizar las señales de NAR. Se utilizó el software OMNIC V9.9.473 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para comparar el espectro resultante y el espectro de NAR, que se pueden ver en la Figura 5.1. La región de 1700 a 1450  $\text{cm}^{-1}$  fue distorsionada por la sustracción del espectro de SFN debido a la presencia de las intensas bandas amida I y II, y, por tanto, fue excluida de la coincidencia espectral. Solo la región de 1400 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  resaltada por el área gris en la figura se usó para analizar la coincidencia espectral. El software OMNIC encontró una coincidencia del 86%.

Este resultado demuestra que es posible identificar el fármaco en las nanopartículas, incluso a bajas concentraciones de este.

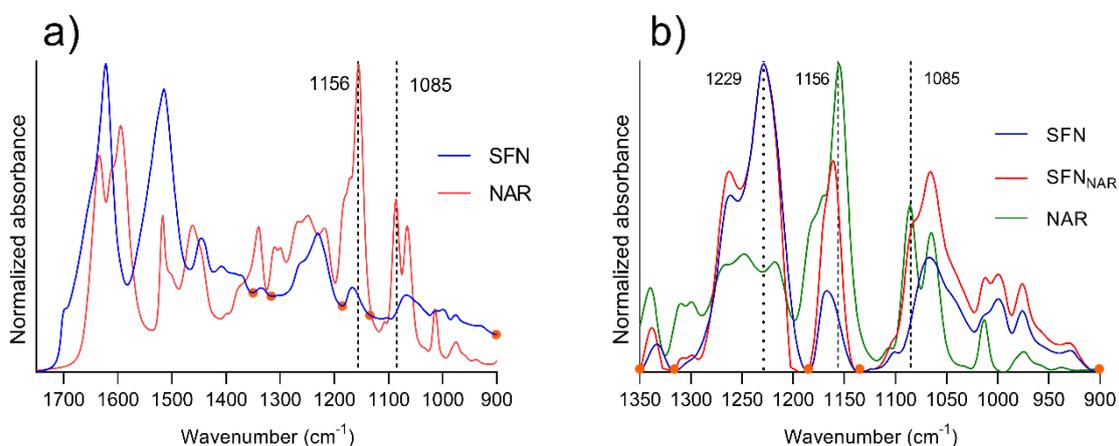
El resultado sugiere que este procedimiento también podría usarse con otras proteínas como portadores de fármacos, porque la absorción de estas es relativamente débil por debajo de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , donde el espectro de infrarrojos es muy característico de la estructura de las moléculas. Por tanto, la región de huella dactilar del espectro de infrarrojo puede utilizarse para identificar fármacos.



**Figura 5.1.** Especificidad de la espectroscopía ATR-FTIR para identificar fármacos en nanopartículas de fibroína de seda (SFN). En azul, el espectro resultante después de restar el espectro de SFN del espectro SFN<sub>NAR</sub>-0.3. En rojo, el espectro de NAR medido a partir de una película seca. El rectángulo gris muestra el área utilizada para hacer coincidir.

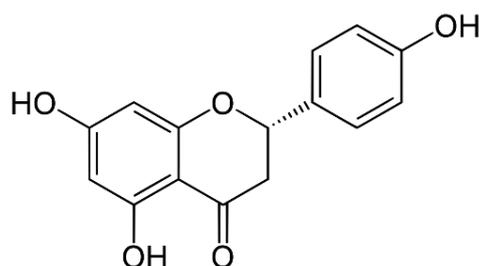
### 5.3.2 Identificación de la mejor banda marcadora de NAR en muestras de SFN<sub>NAR</sub>

El primer paso en el proceso de cuantificación fue identificar una señal fuerte de NAR en el espectro de IR y con baja interferencia de la matriz de SF, que se utilizará para generar una curva de calibrado. En la Figura 5.2a, los espectros de SFN y NAR se presentan desde 1750 hasta  $900\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de SFN presenta las bandas de amida I, II y III esperadas a 1620, 1514 y  $1229\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, para la proteína de SF [50–52].



**Figura 5.2.** (a) Espectros de absorción infrarroja originales de SFN y NAR. (b) Espectros de absorción infrarroja corregidos por línea base de SFN, NAR y SFN<sub>NAR</sub>-1.2. Los espectros de SFN y SFN<sub>NAR</sub> se normalizan a una absorbancia de 1 en el máximo de la banda de amida III a 1229 cm<sup>-1</sup>. El espectro de NAR se normaliza a una absorbancia de 1 a 1156 cm<sup>-1</sup>. Todas las muestras se midieron como una película seca obtenida a partir de una solución de etanol al 30%. Los círculos naranjas indican los puntos de la línea de base.

El espectro de NAR presenta fuertes bandas de absorción ubicadas en 1633, 1609, 1594, 1169, 1156, 1085 y 1065 cm<sup>-1</sup>. Las primeras tres bandas provienen de vibraciones que comprenden diferentes combinaciones de estiramiento C=O, estiramiento C-C del anillo y vibraciones de flexión OH [53,54]. El lector puede consultar la Figura 5.3 para conocer la estructura de NAR. Estas tres bandas se superponen con la banda de amida I fuerte de las SFN, lo que hace que la detección de NAR a partir de estas señales sea difícil; por lo tanto, no se tomaron en cuenta para el análisis.



**Figura 5.3.** Estructura de NAR.

Las bandas en 1169 y 1156  $\text{cm}^{-1}$  surgen de una combinación de vibraciones de flexión de OH y  $\text{CH}_2$  [54]. Ninguna de estas bandas se consideró para la cuantificación, ya que los hidroxilos pueden interactuar con la matriz proteica de las SFN, lo que podría provocar desplazamientos de las bandas debido a interacciones entre la NAR y las SFN. De hecho, se puede ver en la Figura 5.2b que la banda de absorción de 1156  $\text{cm}^{-1}$  de NAR se desplaza hacia arriba en 6  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro de SFN cargadas con NAR (SFN<sub>NAR</sub>-1.2). Como se indicó anteriormente, esto probablemente se debe a enlaces de hidrógeno con la matriz de la proteína. Este hecho hace que la banda no sea adecuada para de cuantificar debido a su ambigua posición espectral y debido a un posible impacto de los enlaces de hidrógeno en la intensidad de la banda. Por último, las bandas en 1085 y 1065  $\text{cm}^{-1}$ , que surgen de las vibraciones esqueléticas aromáticas del anillo de flavona [54] de NAR, también se pueden detectar en el espectro SFN<sub>NAR</sub> y son buenas candidatas para seleccionarse como bandas marcadoras de cuantificación, ya que no se observó ningún desplazamiento entre la NAR libre y cargada en la nanopartícula. Sin embargo, esta última banda está cerca de un máximo de absorción de las SFN, lo que dificulta la distinción entre absorción de NAR y de las SFN. Por el contrario, la banda fuerte y nítida de 1085  $\text{cm}^{-1}$  está ubicada en una pendiente del espectro SFN y, por lo tanto, puede distinguirse de ella y utilizarse para la cuantificación. Por este motivo, se decidió utilizar esta banda para la cuantificación.

El siguiente paso consistió en identificar una banda de la matriz de proteínas que se pueda utilizar para la normalización. En este punto, también es importante verificar que no haya desplazamientos en las bandas de absorción de la matriz del polímero, que podrían ser inducidos por la interacción con el fármaco. Por ejemplo, se puede observar en la Figura 5.1 que la sustracción de la absorción de SFN del espectro de absorción de SFN<sub>NAR</sub>-0.3 no canceló la absorbancia en las regiones de amida I y II de absorción de proteínas (téngase en cuenta que la cantidad de NAR en las SFN es mucho menor que las concentraciones utilizadas para la carga e indicadas en el espectro de SFN<sub>NAR</sub> en la Figura 5.1; por lo tanto, la contribución de NAR es insignificante en los rangos espectrales de amida I y II). Esto se debe a un desplazamiento de las bandas amida I y II de las SFN puras y cargadas con fármaco, que

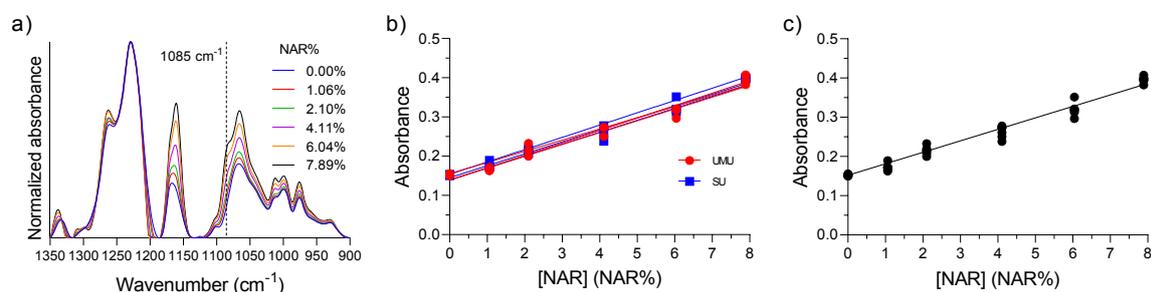
posiblemente se produjo por interacciones entre el fármaco y la matriz del polímero. Aquí, la banda amida III en  $1229\text{ cm}^{-1}$ , que es la señal más fuerte de SFN en la región de  $1350\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  y que no mostró ningún desplazamiento, fue usada para la normalización.

Con la banda de cuantificación del fármaco y la banda de normalización de la matriz de nanopartículas identificadas, los espectros deben corregirse por la línea de base antes de continuar con el resto de operaciones. Como puntos de línea de base, se seleccionaron los bordes de los espectros ( $1350$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ ), los mínimos en ambos lados de la banda de normalización ( $1316$  y  $1185\text{ cm}^{-1}$ ) y un punto adicional cerca de la banda de cuantificación en un mínimo del espectro de SFN ( $1134\text{ cm}^{-1}$ ). Estos se muestran como círculos naranjas en la Figura 5.2.

### 5.3.3 Curva de calibrado

La siguiente etapa en el proceso de cuantificación fue obtener la curva de calibrado mediante la relación entre la carga de fármaco y la absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$ . Esto se logró analizando las muestras de calibrado con cantidades conocidas de SFN y NAR. En la Figura 5.4a se presenta un ejemplo de una serie de espectros normalizados y corregidos de la línea de base de muestras de calibrado que contienen una cantidad creciente de NAR, en la que se puede ver claramente un aumento de la absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$  a medida que aumenta la concentración de NAR. Los ajustes de las seis series de calibrado independientes, es decir, tres obtenidas en la Universidad de Murcia y tres obtenidas en la Universidad de Estocolmo, se muestran en la Figura 5.4b. En la Figura 5.4c, se ajustó una curva de calibrado a todos los datos individuales. Esta curva de calibrado se utilizó posteriormente para la cuantificación en este capítulo. La señal al 0 NAR% en las Figuras 5.4b y c proviene de la absorción de las SFN. Los datos se ajustaron mediante regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. Para la curva de calibrado final que se muestra en la Figura 5.4c, la intersección con el eje Y se restringió para que fuera igual al valor promedio de absorbancia al 0 NAR% de las seis muestras (este valor permaneció igual incluso cuando incluimos las diez medidas adicionales de blancos de SFN). Usamos este procedimiento para minimizar el error al determinar bajas

cargas de NAR, que depende en gran medida del punto de partida de la curva de calibrado. Los parámetros de ajuste se recogen en la Tabla 5.1.



**Figura 5.4.** (a) Espectros de absorbancia de SFN con cantidades crecientes de NAR; (b) Seis conjuntos de datos de calibración y sus respectivas rectas de calibrado, tres obtenidas en la Universidad de Murcia (UMU) y tres en la Universidad de Estocolmo (SU). (c) Conjunto de datos de calibrado incluyendo todos los puntos.

**Tabla 5.1.** Parámetros de la curva de calibrado. Las dos primeras columnas muestran los parámetros promedio y la desviación estándar para cada conjunto de tres líneas de calibrado obtenidas en la Universidad de Murcia (UMU) y la Universidad de Estocolmo (SU). La tercera columna recoge los parámetros de la recta de calibrado ajustada con todos los puntos de datos bajo la restricción de pasar por el valor promedio en 0 NAR%.

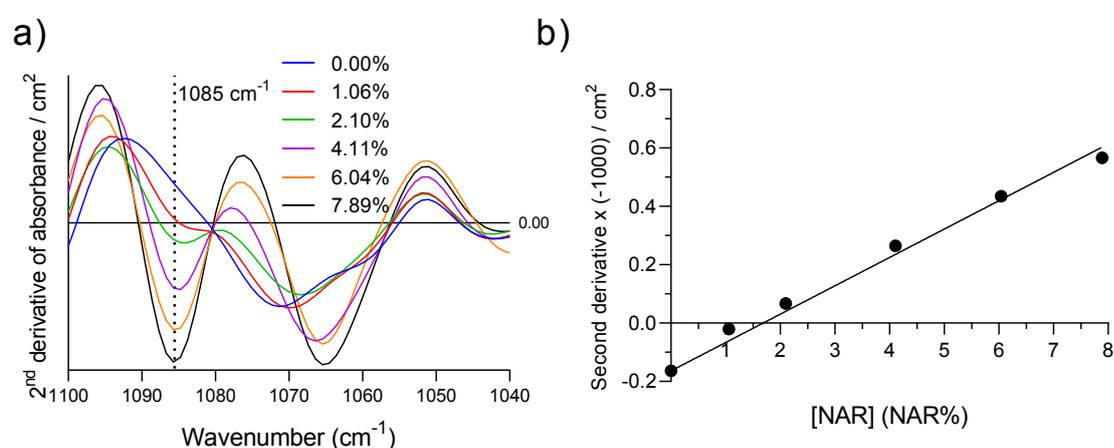
Parámetros de Ajuste	UMU	SU	Todos los datos
	<b>Promedio ± desviación estándar</b>		
Valores de mejor ajuste			
Pendiente <sup>a</sup>	0.030 ± 0.002	0.031 ± 0.001	0.029
Intersección-Y	0.145 ± 0.009	0.146 ± 0.008	0.152
Bondad del ajuste			
R <sup>2</sup> <sup>b</sup>	0.978 ± 0.007	0.982 ± 0.019	0.973

<sup>a</sup> Las unidades de la pendiente son  $NAR\%^{-1}$

<sup>b</sup> R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación

Como prueba de concepto, se realizó el mismo calibrado representando la intensidad negativa de la segunda derivada en 1085  $cm^{-1}$  vs NAR%, como se muestra en la Figura 5.5. Como se puede ver en la Figura 5.5a, el máximo en 1085  $cm^{-1}$  es claramente resuelto por la

segunda derivada y se obtuvo una buena relación lineal (Figura 5.5b,  $R^2 = 0.988$ ). Este procedimiento presenta varias ventajas, ya que no se necesita corregir la línea de base de los espectros y podría usarse para resolver picos superpuestos en casos más difíciles de analizar que los presentados aquí. Sin embargo, un análisis de espectros de segunda derivada requiere espectros con bajo ruido, y aquí, el detector de telururo de mercurio-cadmio del equipo de la Universidad de Estocolmo demostró ser mejor en comparación con el detector de sulfato de triglicina deuterado del equipo de la Universidad de Murcia. Aunque se eligió un tiempo de grabación de espectro más largo para este último.



**Figura 5.5.** (a) Segunda derivada de los espectros de absorbancia de SFN con cantidades crecientes de NAR obtenidas en la Universidad de Estocolmo; (b) Recta de calibrado construida con la segunda derivada de los espectros de absorbancia a 1085 cm<sup>-1</sup> multiplicada por -1. Cada espectro se suavizó con una función Savitsky-Golay de trece puntos antes de la derivación.

### 5.3.4 Parámetros para la validación del método

#### 5.3.4.1. Rango y linealidad de la curva de calibrado

La linealidad de los datos de calibrado fue buena, como lo indican los valores  $R^2$  para las rectas de calibrado individuales y para la calibración única ajustada a todos los datos (Tabla 5.1), que fueron iguales o superiores a 0.973. Además, una inspección visual del gráfico de

residuos (datos no mostrados) demuestra una correlación lineal entre la respuesta analítica y la concentración de fármaco en el rango de 0 a 7.89% de *NAR*%.

#### 5.3.4.2. Robustez del método

La robustez del método analítico ha sido demostrada en base a las fuertes similitudes entre las seis rectas de calibrado que se presentan en la Figura 5.4b medidas en diferentes días, en diferentes laboratorios y con diferentes espectrómetros. Por ejemplo, el espectrómetro de la Universidad de Estocolmo Bruker utilizó un detector de telururo de mercurio-cadmio y se purgó continuamente con aire seco reducido en CO<sub>2</sub>, mientras que el espectrómetro Thermo Fisher Scientific de la Universidad de Murcia utilizó un detector de sulfato de triglicina deuterado y no fue purgado. A pesar de esto, un análisis de covarianza realizado como se describe en la bibliografía [55] no mostró diferencias significativas entre las pendientes o intersecciones con el eje Y de las rectas generadas en las dos instituciones con valores de P de 0.92 y 0.18, respectivamente. La concordancia entre los datos obtenidos en las dos instituciones demuestra, entre otras cosas, que el vapor de agua no interfiere con las medidas porque la banda *NAR* seleccionada está fuera de la región principal de absorción de vapor de agua. Las desviaciones estándar relativas calculadas a partir del promedio y la desviación estándar de todas las pendientes y las intersecciones con el eje Y fueron de 3.8 y 5.2%, respectivamente.

#### 5.3.4.3. Límite de detección, límite de cuantificación y reproducibilidad (precisión) del método

Según la definición del Libro de Oro de la IUPAC [56,57], el límite de detección (*LOD*) y de cuantificación (*LOQ*), expresados como concentración o cantidad, es el valor medido más pequeño (*A*) que puede detectarse o cuantificarse, respectivamente, con certeza razonable para un procedimiento analítico dado. *A<sub>LOD</sub>* y *A<sub>LOQ</sub>* están dados por las ecuaciones (5.4) y (5.5), respectivamente [56,57]:

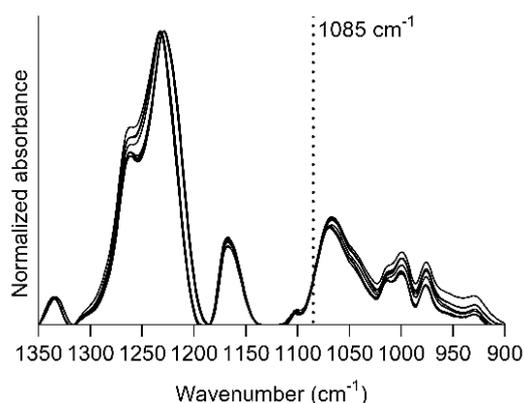
$$A_{LOD} = \bar{A} + 3.3\sigma \quad (5.4)$$

$$A_{LOQ} = \bar{A} + 10\sigma \quad (5.5)$$

donde  $\bar{A}$  y  $\sigma$  son el promedio y la desviación estándar, respectivamente, de las medidas de absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$  para diez muestras independientes de SFN sin carga, cinco de las cuales se realizaron en la Universidad de Murcia y las otras cinco en la Universidad de Estocolmo. La IUPAC recomienda el uso de diez muestras y los factores numéricos de 3.3 y 10 de acuerdo con una distribución normal y un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$  para  $A_{\text{LOD}}$  y  $A_{\text{LOQ}}$ , respectivamente. La reproducibilidad del método viene dada por la desviación estándar relativa de las medidas en blanco calculadas por la ecuación (5.6):

$$\text{Reproducibilidad (\%)} = \frac{\sigma}{\bar{A}} \cdot 100 \quad (5.6)$$

Los diez espectros utilizados y su absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$  se presentan en la Figura 5.6, y nuestra evaluación de los mismos se resume en la Tabla 5.2. Los resultados de  $DLC_{\text{LOD}}$ ,  $DLC_{\text{LOQ}}$  y reproducibilidad también se recogen en la Tabla 5.2. Los dos primeros se calcularon insertando  $A_{\text{LOD}}$  y  $A_{\text{LOQ}}$  en la ecuación de la recta de calibrado final. Este resultado muestra la alta sensibilidad y precisión del método analítico desarrollado aquí.



**Figura 5.6.** Espectros de referencia corregidos por línea de base y normalizados de las 10 muestras de SFN en blanco utilizadas para el cálculo del límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y la reproducibilidad del método.

**Tabla 5.2.** Promedio ( $\bar{A}$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) de la absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$  utilizada para el cálculo de límites de detección ( $A_{\text{LOD}}$  y  $DLC_{\text{LOD}}$ ), límites de cuantificación ( $A_{\text{LOQ}}$  y  $DLC_{\text{LOQ}}$ ) y reproducibilidad del método de acuerdo con las ecuaciones (5.4-5.6).

Cantidad	Valor
Absorbancia promedio a $1085\text{ cm}^{-1}$ ( $\bar{A}$ )	0.151
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0.003
Reproducibilidad (%)	2.0
Absorbancia LOD ( $A_{\text{LOD}}$ )	0.161
Absorbancia LOQ ( $A_{\text{LOQ}}$ )	0.181
$DLC_{\text{LOD}}$ (%)	0.3
$DLC_{\text{LOQ}}$ (%)	1.0

#### 5.3.4.4. Exactitud del método

La exactitud del método propuesto se evaluó mediante el método de adición y recuperación [57,58]. Primero, se preparó una muestra de calibrado con 4.11  $NAR\%$  de masa relativa y se dividió en dos alícuotas de  $200\ \mu\text{L}$ . A una alícuota se le añadió  $5\ \mu\text{L}$  de una solución de NAR de  $15\text{ mg/mL}$  en etanol para lograr una masa relativa final de 6.51  $NAR\%$ , mientras que se añadieron  $5\ \mu\text{L}$  de etanol puro a la otra muestra. Los espectros de infrarrojos de las muestras enriquecidas y no enriquecidas se registraron inmediatamente y las  $DLC$  respectivas se determinaron a partir de la absorbancia a  $1085\text{ cm}^{-1}$  como se describió anteriormente. La exactitud se expresó como el porcentaje (%) de recuperación de la muestra enriquecida, como se indica en la ecuación 5.7. El procedimiento se repitió cuatro veces y los resultados se muestran en la Tabla 5.3. Una variación del 4% en promedio de los valores esperados indicó que el procedimiento analítico fue preciso y que no hubo efectos de matriz. El pequeño error obtenido se encuentra dentro de los errores esperados de pipeteo, pesada y medida de absorbancia.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{DLC_{\text{Enriquecida}} - DLC_{\text{no enriquecida}}}{NAR\%_{\text{añadida}}} \cdot 100 \quad (5.7)$$

**Tabla 5.3.** Evaluación de la exactitud del método para la determinación de NAR en SFN.

Muestra	Recuperación (%)
1	103%
2	104%
3	102%
4	106%
<b>Promedio</b>	104%
<b>Desviación estándar</b>	2%

### 5.3.5 Cuantificación de fármaco en SFN cargadas con NAR

El *DLC* y la *EE* de las muestras de SFN cargadas con NAR medidas con este método se presentan en la Tabla 5.4. Un aumento en la concentración de NAR de la solución de carga condujo a un aumento no lineal en *DLC*, con la mayor parte de la carga teniendo lugar a concentración baja de NAR. Resultados similares han sido publicados anteriormente y han sido atribuidos a la saturación de los sitios de unión al fármaco en la superficie de las nanopartículas [15]. Por el contrario, la *EE* disminuyó linealmente cuando la concentración de NAR aumentó.

Nótese que la naturaleza del fármaco puede identificarse mediante espectroscopía infrarroja, incluso para las nanopartículas con menor carga de fármaco (Figura 5.1, Sección 5.3.1, Especificidad de la espectroscopía ATR-FTIR para identificar fármacos en SFN), aunque el *DLC* determinado se encuentra entre los  $DLC_{LOQ}$  y  $DLC_{LOD}$ .

**Tabla 5.4.** Contenido de fármaco cargado (*DLC*) y la eficiencia de encapsulación (*EE*) de SFN cargadas con NAR expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. n = 3.

Muestra	<i>DLC</i> (%)	<i>EE</i> (%)
<b>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar (RSD)</b>		
<b>SFN<sub>NAR-0.3</sub></b>	0.87 $\pm$ 0.07 (8.7%)	41.0 $\pm$ 3.0 (7.3%)
<b>SFN<sub>NAR-1.2</sub></b>	3.13 $\pm$ 0.08 (2.6%)	38.0 $\pm$ 1.0 (2.6%)
<b>SFN<sub>NAR-4.5</sub></b>	4.06 $\pm$ 0.06 (1.6%)	13.2 $\pm$ 0.2 (1.5%)

\*RSD, desviación estándar relativa

Las desviaciones estándar relativas de los valores de *DLC* medidos fueron sorprendentemente bajas para medidas por encima del  $DLC_{LOQ}$  de 1.0% (Tabla 5.4), especialmente cuando se comparan con las medidas de espectroscopía UV-visible y cromatografía líquida de alta resolución utilizadas por los métodos directos o indirectos mencionados en la Introducción. Según nuestra experiencia, el coeficiente de variación de estos métodos suele ser mucho mayor, desde varias unidades en porcentaje hasta más del 10%, principalmente debido a las grandes diluciones necesarias para medir los sobrenadantes (hasta 1:500) y a una separación de fases mediante centrifugación poco eficiente (datos no mostrados). Estas grandes y a veces inaceptables desviaciones fueron los principales factores de motivación para este trabajo. A continuación, se discutirán algunos de los problemas encontrados con los procedimientos anteriores de cuantificación de fármaco, usando la muestra  $SFN_{NAR-4.5}$  mg/mL como ejemplo. Para calcular su *DLC* por el método indirecto, las partículas deben separarse de la disolución de NAR inicial de 4.5 mg/mL después de la fase de carga. Suponiendo una separación completa y una *EE* del 15% (cercana a la que se obtuvo aquí; ver Tabla 5.4), la concentración de fármaco en el sobrenadante debe estar cerca de 3.8 mg/mL, correspondiente al 85% del fármaco inicialmente cargado. Una concentración tan alta no se puede medir directamente con espectrómetros UV-visible convencionales. En el caso de NAR disuelta en etanol, se alcanza una absorbancia de 1.0 con una concentración de 0.015 mg/mL a 289 nm (cubeta de 10 mm de camino óptico). Esto significa que para llevar la concentración de una muestra de 3.8 mg/mL a un rango de concentración adecuado para la espectroscopía UV-visible, se requiere una dilución 1:250, lo que conlleva un alto grado de error. Suponiendo una dilución de dos pasos, correspondiente a cuatro volúmenes pipeteados, y asumiendo un error de pipeteo del 2%, el error de concentración final fue cercano al 4%. La situación mejora a concentraciones más bajas de la solución de carga, donde la *EE* es mayor. Por ejemplo, la muestra  $SFN_{NAR-0.3}$  con una *EE* cercana al 50% requirió solo una dilución 1:10. Sin embargo, solo se lograron *DLC* bajos con concentraciones de fármaco tan bajas, mientras que los *DLC* altos son el objetivo de los productores de fármacos. Por tanto, el error de dilución del método indirecto es más alto en las condiciones que son más interesantes desde el punto de vista de la

fabricación de medicamentos, mientras que son más bajos para el método directo presentado en este capítulo. Además, la separación de las SFN de la solución de carga de NAR es ineficaz. Muestras de control que contenían 1 mg/mL de SFN dispersadas en etanol al 30% tenían una absorbancia superior a 0.100 a 289 nm después de intentar la separación de las SFN de la fase líquida mediante centrifugación durante 30 min a 13400 rpm. La absorbancia proviene de las nanopartículas y se sumaría a la absorbancia del fármaco en un experimento de cuantificación, haciendo que la absorbancia aparente del fármaco sea mayor de lo que realmente es. Esto genera un error sistemático que es particularmente pronunciado a bajas concentraciones de NAR. Este error existe en todos los casos en los que la señal espectroscópica medida del fármaco se superpuso con la absorción de las nanopartículas. Por lo tanto, el procedimiento indirecto es propenso a errores en todo el rango de concentración del fármaco, ya sea debido a una separación incompleta del fármaco de las nanopartículas a concentraciones bajas del fármaco o debido a errores de dilución en concentraciones altas del fármaco.

#### 5.4. Conclusiones

En este capítulo se ha desarrollado un método sencillo, económico y rápido para la cuantificación de fármacos en nanopartículas utilizando espectroscopía ATR-FTIR de películas secas. El método presenta una excelente linealidad en el rango de 0 a 7.89 NAR%, a pesar de las bajas concentraciones de fármaco. El  $DLC_{LOD}$  y  $DLC_{LOQ}$  fueron de 0.3 y 1.0%, respectivamente, para NAR en SFN. La reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa después de medir 10 muestras en blanco fue del 2.0%. El método demostró ser robusto, ya que las rectas de calibrado obtenidas en dos instituciones distintas no mostraron diferencias estadísticas.

La metodología desarrollada aquí es menos susceptible a la sobreestimación o subestimación del  $DLC$  que puede tener lugar usando procedimientos de cuantificación directos e indirectos convencionales [30,31], y puede utilizarse fácilmente con otras SFN cargadas con diferentes fármacos e incluso con otros nanoportadores poliméricos. Además, puede operar sobre el producto farmacéutico final sin necesidad de acceder a la solución de carga. Este

método, es más rápido que el procedimiento directo porque no requiere extracción de fármacos ni separación de fases.

Con el método nuevo, una simple evaluación de la absorbancia en un número de onda determinada fue suficiente para cuantificar un fármaco en nanopartículas proteicas. No obstante, otros medicamentos y sistemas de transporte pueden presentar casos más complejos y requerir procedimientos de evaluación personalizados. Estos podrían consistir en considerar (i) la señal en varios números de onda para eliminar la contribución de la proteína a la señal medida, (ii) la segunda derivada de la absorbancia para una mejor separación de las bandas de fármaco y proteína, y (iii) el uso de métodos estadísticos multivariantes para identificar regiones espectrales relevantes y para establecer modelos de calibración. Sin embargo, en todos los casos sería beneficioso basar la cuantificación en bandas de fármaco poco afectadas por el entorno, es decir, bandas que son provocadas por vibraciones con pequeñas aportaciones de grupos funcionales que son capaces de interactuar con la matriz polimérica. Por esta razón, en este capítulo se usó la banda correspondiente a una vibración aromática esquelética a  $1085\text{ cm}^{-1}$  y se descartó la banda de OH más fuerte a  $1156\text{ cm}^{-1}$ , que se desplazó cuando el fármaco se incorporó a la matriz proteica. Lo mismo se aplica a las bandas de la matriz proteica que se utilizan para la normalización. No deberían verse afectadas por interacciones con el fármaco.

El uso de la segunda derivada para la cuantificación tiene la ventaja de resolver mejor las bandas superpuestas, como se mencionó anteriormente, pero también presenta desafíos, ya que requiere espectros de alta calidad. Aquí, el detector de telururo de mercurio-cadmio enfriado con nitrógeno líquido funcionó mucho mejor que el detector de sulfato de triglicina deuterado, que opera a temperatura ambiente. Solo un aumento considerable del tiempo de grabación del espectro con este último detector puede mitigar la diferencia de calidad. Por el contrario, cuando se analizan los espectros de absorbancia, la mayoría de los detectores de infrarrojos modernos funcionarán bien en el rango espectral de IR medio y no deberían ser una preocupación para el usuario.

Otro posible problema es el vapor de agua, que podría tener un impacto significativo en las regiones espectrales  $1250\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$  y  $3300\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  cuando se usa un equipo sin purgar. En

el procedimiento presentado aquí, las regiones de vapor de agua no se utilizaron para el análisis y, por lo tanto, no fueron motivo de preocupación. No obstante, los usuarios han de ser conscientes de este problema, ya que la compensación de vapor de agua computacional podría funcionar para algunas aplicaciones, pero no para otras. El problema del vapor de agua será considerablemente más severo cuando se analice la segunda derivada de la absorbancia, ya que esta magnifica las bandas de vapor de agua en relación con las bandas más amplias de analito y proteína.



## Referencias

1. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 2016, 33, 2373–2387.
2. Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* 2015, 5, 442–453.
3. Karimi, M.; Ghasemi, A.; Sahandi Zangabad, P.; Rahighi, R.; Moosavi Basri, S.M.; Mirshekari, H.; Amiri, M.; Shafaei Pishabad, Z.; Aslani, A.; Bozorgomid, M.; *et al.* Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.* 2016, 45, 1457–1501.
4. Montalbán, M.G.; Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.; Coburn, J.M.; Kaplan, D.L.; Villora, G. Biopolymeric Nanoparticle Synthesis in Ionic Liquids. In *Recent Advances in Ionic Liquids*; IntechOpen, 2018; pp. 3–26.
5. Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986, 46, 6387–6392.
6. Fang, J.; Islam, R.; Islam, W.; Yin, H.; Subr, V.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Maeda, H. Augmentation of EPR Effect and Efficacy of Anticancer Nanomedicine by Carbon Monoxide Generating Agents. *Pharmaceutics* 2019, 11, 343.
7. Elzoghby, A.O.; Samy, W.M.; Elgindy, N.A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release* 2012, 157, 168–182.
8. Barenholz, Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* 2012, 160, 117–134.
9. Lim, S.B.; Banerjee, A.; Önyüksel, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *J. Control. Release* 2012, 163, 34–45.
10. Ding, B.; Wahid, M.A.; Wang, Z.; Xie, C.; Thakkar, A.; Prabhu, S.; Wang, J. Triptolide and celastrol loaded silk fibroin nanoparticles show synergistic effect against human pancreatic cancer cells. *Nanoscale* 2017, 9, 11739–11753.
11. Zhao, Z.; Li, Y.; Xie, M. Bin Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 4880–4903.
12. Mottaghitlab, F.; Farokhi, M.; Shokrgozar, M.A.; Atyabi, F.; Hosseinkhani, H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J. Control. Release* 2015, 206, 161–176.
13. Montalbán, M.; Coburn, J.; Lozano-Pérez, A.; Cenis, J.; Villora, G.; Kaplan, D. Production of

- Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* 2018, 8, 126.
14. Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S.L. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 13940–13941.
  15. Lozano-Pérez, A.A.; Rivero, H.C.; Pérez Hernández, M. del C.; Pagán, A.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Cénis, J.L. Silk fibroin nanoparticles: Efficient vehicles for the natural antioxidant quercetin. *Int. J. Pharm.* 2017, 518, 11–19.
  16. Fuster, M.G.; Carissimi, G.; Moltabán, M.G.; Villora, G. Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles. *Nanomaterials* 2020, 10, 718.
  17. Mathur, A.B.; Gupta, V. Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications. 2010, 5, 807–820.
  18. Tian, Y.; Jiang, X.; Chen, X.; Shao, Z.; Yang, W. Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer. *Adv. Mater.* 2014, 26, 7393–7398.
  19. Amgoth, C.; Dharmapuri, G. Synthesis and Characterization of Polymeric Nanoparticles and Capsules as Payload for Anticancer Drugs and Nanomedicines. *Mater. Today Proc.* 2016, 3, 3833–3837.
  20. Bian, X.; Wu, P.; Sha, H.; Qian, H.; Wang, Q.; Cheng, L.; Yang, Y.; Yang, M.; Liu, B. Anti-EGFR-iRGD recombinant protein conjugated silk fibroin nanoparticles for enhanced tumor targeting and antitumor efficiency. *Oncotargets. Ther.* 2016, 9, 3153–3162.
  21. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Pakade, Y.B.; Singh, B.; Yadav, S.C. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010, 80, 184–192.
  22. Trucillo, P.; Campardelli, R.; Reverchon, E. Supercritical CO<sub>2</sub> assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading. *J. CO<sub>2</sub> Util.* 2017, 18, 181–188.
  23. Seib, F.P.; Jones, G.T.; Rnjak-Kovacina, J.; Lin, Y.; Kaplan, D.L.; Philipp Seib, F.; Jones, G.T.; Rnjak-Kovacina, J.; Lin, Y.; Kaplan, D.L. pH-Dependent anticancer drug release from silk nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* 2014, 2, 1–13.
  24. Subia, B.; Kundu, S.C. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers. *Nanotechnology* 2013, 24, 035103.
  25. Wongpinyochit, T.; Uhlmann, P.; Urquhart, A.J.; Seib, F.P. PEGylated Silk Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2015, 16, 3712–3722.
  26. Suktham, K.; Koobkokuad, T.; Wutikhun, T.; Surassmo, S. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2018, 537, 48–

- 56.
27. Pham, D.T.; Saelim, N.; Tiyaaboonchai, W. Paclitaxel loaded EDC-crosslinked fibroin nanoparticles: a potential approach for colon cancer treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2020, 10, 413–424.
  28. Wu, J.; Wang, J.; Zhang, J.; Zheng, Z.; Kaplan, D.L.; Li, G.; Wang, X. Oral Delivery of Curcumin Using Silk Nano- and Microparticles. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4, 3885–3894.
  29. Perteghella; Sottani; Coccè; Negri; Cavicchini; Alessandri; Cottica; Torre; Grignani; Pessina Paclitaxel-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles: Method Validation by UHPLC-MS/MS to Assess an Exogenous Approach to Load Cytotoxic Drugs. *Pharmaceutics* 2019, 11, 285.
  30. Wallace, S.J.; Li, J.; Nation, R.L.; Boyd, B.J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2012, 2, 284–292.
  31. Lv, Y.; He, H.; Qi, J.; Lu, Y.; Zhao, W.; Dong, X.; Wu, W. Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 2018, 547, 395–403.
  32. Khanmohammadi, M.; Mobedi, E.; Garmarudi, A.B.; Mobedi, H.; Kargosha, K. Simultaneous determination of levodopa and carbidopa in levodopa-carbidopa tablets by ATR-FTIR spectrometry. *Pharm. Dev. Technol.* 2007, 12, 573–580.
  33. Koleva, B.B.; Kolev, T.M.; Tsalev, D.L.; Spitteller, M. Determination of phenacetin and salophen analgetics in solid binary mixtures with caffeine by infrared linear dichroic and Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 46, 267–273.
  34. de la Asunción-Nadal, V.; Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Identification and determination of synthetic cannabinoids in herbal products by dry film attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. *Talanta* 2017, 167, 344–351.
  35. Wartewig, S.; Neubert, R.H.H. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1144–1170.
  36. Kalinkova, G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vib. Spectrosc.* 1999, 19, 307–320.
  37. Bunaciu, A.A.; Aboul-Enein, H.Y.; Fleschin, S. Application of fourier transform infrared spectrophotometry in pharmaceutical drugs analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2010, 45, 206–219.
  38. Pandey, R.P.; Gurung, R.B.; Sohng, J.K. Dietary sources, bioavailability and biological activities of naringenin and its derivatives. In *Apigenin and Naringenin Natural Sources, Pharmacology and Role in Cancer Prevention*; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2015; pp. 151–172 ISBN 9781634639958 | 9781634639873.
  39. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Quantitation of flavonoids constituents in Citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3565–3571.

## Capítulo 5

40. Treml, J.; Šmejkal, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 720–738.
41. Bodet, C.; La, V.D.; Epifano, F.; Grenier, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and *ex vivo* human whole-blood models. *J. Periodontal Res.* 2008, 43, 400–407.
42. Liao, A.C.H.; Kuo, C.C.; Huang, Y.C.; Yeh, C.W.; Hseu, Y.C.; Liu, J.Y.; Hsu, L.S. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP-2. *Mol. Med. Rep.* 2014, 10, 1531–1536.
43. Bao, L.; Liu, F.; Guo, H. bin; Li, Y.; Tan, B. bo; Zhang, W. xing; Peng, Y. hui Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumor Biol.* 2016, 37, 11365–11374.
44. Gumushan Aktas, H.; Akgun, T. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 106, 770–775.
45. Rajamani, S.; Radhakrishnan, A.; Sengodan, T.; Thangavelu, S. Augmented anticancer activity of naringenin-loaded TPGS polymeric nanosuspension for drug resistive MCF-7 human breast cancer cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2018, 44, 1752–1761.
46. Lim, W.; Park, S.; Bazer, F.W.; Song, G. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *J. Cell. Biochem.* 2017, 118, 1118–1131.
47. Carissimi, G.; Baronio, C.M.; Montalbán, M.G.; Villora, G.; Barth, A. On the Secondary Structure of Silk Fibroin Nanoparticles Obtained Using Ionic Liquids: An Infrared Spectroscopy Study. *Polymers (Basel).* 2020, 12, 1294.
48. Boulet-Audet, M.; Buffeteau, T.; Boudreault, S.; Daugey, N.; Pézolet, M. Quantitative determination of band distortions in diamond attenuated total reflectance infrared spectra. *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 8255–8261.
49. Goormaghtigh, E.; Raussens, V.; Ruyschaert, J.M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1999, 1422, 105–185.
50. Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 2006, 39, 6161–6170.
51. Kumar, S.; Singh, S.K. Fabrication and characterization of fibroin solution and nanoparticle from silk fibers of *Bombyx mori*. *Part. Sci. Technol.* 2017, 35, 304–313.
52. Carissimi, G.; Lozano-Pérez, A.A.; Montalbán, M.G.; Aznar-Cervantes, S.D.; Cenis, J.L.; Villora, G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel).* 2019, 11, 2045.

53. Baranović, G.; Šegota, S. Infrared spectroscopy of flavones and flavonols. Reexamination of the hydroxyl and carbonyl vibrations in relation to the interactions of flavonoids with membrane lipids. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018, 192, 473–486.
54. Machado, N.F.L.; Carvalho, L.A.E.B. De; Otero, J.C.; Marques, M.P.M. A conformational study of hydroxyflavones by vibrational spectroscopy coupled to DFT calculations. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013, 109, 116–124.
55. Zar, J.H. *Biostatistical analysis*, 2nd ed. In; Prentice-Hall: Englewood-Cliffs, NJ, USA, 1984 ISBN 0130779253.
56. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A., Eds.; IUPAC: Research Triangle Park, NC, USA, 2009; ISBN 0-9678550-9-8.
57. Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 835–855.
58. Pandey, S.; Pandey, P.; Tiwari, G.; Tiwari, R.; Rai, A.K. FTIR spectroscopy: A tool for quantitative analysis of ciprofloxacin in tablets. *Indian J. Pharm. Sci.* 2012, 74, 86–90.



## Capítulo 6

### Conclusiones generales y perspectivas futuras

#### 6.1. Conclusiones Generales

Esta Tesis Doctoral se centra en la síntesis y caracterización de SFN para el transporte de fármacos. Se ha hecho uso de ILs para la disolución de la SF y otros biopolímeros para la producción de nanopartículas. Se estudia la influencia del proceso de desgomado de la seda sobre las propiedades de las SFN. Mediante el ajuste simultáneo de la banda amida I y su segunda derivada se ha conseguido un ajuste robusto para dilucidar la estructura secundaria de la SF en diferentes etapas del proceso de producción de nanopartículas empleando ILs. Finalmente, se desarrolla un método simple y robusto para la cuantificación directa del contenido de fármaco cargado en nanopartículas. Aquí se resumen los principales resultados y se presentan las perspectivas de futuras investigaciones.

Con respecto a la revisión bibliográfica realizada sobre la síntesis de nanopartículas biopoliméricas utilizando ILs, las principales conclusiones obtenidas han sido las siguientes:

1. Los ILs muestran una gran capacidad para disolver una amplia variedad de biopolímeros, entre ellos: celulosa, xilano, almidón, quitosano, queratina y SF.
2. La utilización de ILs y ultrasonidos para la disolución de SF permite:
  - (i) Reducir el tiempo de disolución de horas a minutos en comparación con los métodos tradicionales.
  - (ii) Aumentar significativamente la concentración máxima de la disolución. Se pueden alcanzar concentraciones de hasta 23% en peso de SF utilizando cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio como disolvente.
  - (iii) Aumentar la estabilidad de las disoluciones de pocos días a varios meses.
  - (iv) Las disoluciones de biopolímero/IL pueden ser utilizadas directamente sin mayor purificación para producir nanopartículas mediante procesos de antisolvatación, lo que supone un gran avance hacia la escalabilidad de la producción de nanopartículas biopoliméricas.
  - (v) Los IL son altamente reciclables, lo que implica que la escalabilidad puede realizarse a través de un proceso respetable con el medio ambiente.

## Capítulo 6

3. Las SFN pueden ser cargadas con curcumina mediante los métodos de adsorción y coprecipitación. Las nanopartículas cargadas presentaron una distribución de tamaño estrecha, con un diámetro hidrodinámico  $<175$  nm, y un elevado potencial-Z en valor absoluto.

Con respecto a la influencia que tiene el proceso de purificación de la SF sobre las características de las nanopartículas producidas, los principales logros obtenidos han sido los siguientes:

1. La eficiencia para la eliminación de las SS de los distintos métodos sigue la serie: ultrasonidos  $<$  autoclave  $<$  ebullición alcalina corta  $<$  ebullición alcalina intensiva.
2. El único método que produjo una SF libre de SS fue el procesado por ebullición alcalina intensiva.
3. Mediante el análisis de la electroforesis en gel, se concluye que la degradación producida por los distintos métodos de desgomado sigue la serie: autoclave  $<$  ultrasonidos  $<$  ebullición alcalina corta  $<$  ebullición alcalina intensiva.
4. Se encontró una correlación positiva entre la degradación de la SF y la reducción en el tamaño de las partículas y la distribución de tamaños de estas.

Con respecto al estudio de la estructura secundaria de la SF, los principales logros obtenidos han sido los siguientes:

1. Las fibras de SF consisten en un 58% de láminas  $\beta$ , un 33% de estructuras irregulares y/o giros y un 9% de estructuras en forma de giros.
2. Las tres bandas a 1626, 1619 y 1609  $\text{cm}^{-1}$  utilizadas para ajustar la región de láminas  $\beta$  se asignaron a láminas distorsionadas y a las dos estructuras de láminas  $\beta$  apiladas B y A, respectivamente.
3. La asignación de banda fue respaldada por espectros de amida I simulados y la abundancia relativa de cada estructura se encuentra en concordancia con estudios previos realizados con RMN.
4. Las SFN regeneradas mostraron una banda amida I y una composición de estructura secundaria similares a las de las fibras nativas, pero con una disminución del 7% en el contenido de las láminas  $\beta$  y un aumento de igual magnitud en las estructuras en forma de giro.

Con respecto al método desarrollado para la cuantificación directa de fármacos cargados en nanopartículas poliméricas, los principales logros obtenidos han sido los siguientes:

1. Se obtuvo una recta de calibrado con buena linealidad entre 0 y 7.89 % de la masa relativa de NAR de la nanoformulación con un  $R^2$  de 0.973.
2. El límite de detección y el límite de cuantificación calculados siguiendo las recomendaciones de la IUPAC se establecieron en 0.3 y 1.0% de la masa relativa de NAR, respectivamente, con una reproducibilidad del 2%.
3. La precisión del método fue determinada mediante el procedimiento de adición y recuperación obteniendo una recuperación promedio del 104%. Además, la robustez del método analítico fue confirmada por la notable concordancia entre las calibraciones realizadas en dos instituciones diferentes.
4. Como prueba de concepto, se realizó la misma calibración utilizando la intensidad negativa de la segunda derivada en función de la masa relativa de NAR. Este procedimiento para la construcción de la recta de calibrado es de utilidad en el caso de tener que resolver picos superpuestos para la cuantificación de fármacos en otros nanosistemas.

## 6.2. Perspectivas futuras

### *Estructura de la seda*

La estructura secundaria de la SF es responsable de las interesantes propiedades mecánicas del biopolímero. En el **Capítulo IV**, se ha observado que las estructuras de lámina  $\beta$  apiladas del tipo B de la SF no se forman en igual medida que las del tipo A en el particular proceso de síntesis de nanopartículas utilizado. La formación de seda cristalina, *silk II*, a partir de una estructura secundaria parcialmente desordenada y soluble en agua, *silk I*, es de gran interés científico y comercial para la producción de seda artificial. Las estructuras de láminas  $\beta$  apiladas se forman estadísticamente en una distribución 2A:1B en el proceso natural de biohilado. Sería interesante estudiar como parámetros tales como la temperatura del metanol (antidisolvente) o de la disolución de SF/IL en la síntesis de las nanopartículas podrían tener efectos de control termodinámico en la formación de estas estructuras.

En caso de poder conseguir un control sobre las estructuras formadas, estas podrían ser correlacionadas con distintas propiedades mecánicas y bioquímicas como la biocompatibilidad o degradabilidad de la SF.

### *Cuantificación de fármacos en diferentes sistemas*

En el **Capítulo V** se ha presentado un método para cuantificar NAR en SFN. *A priori*, el método debería ser aplicable a diferentes sistemas, es decir, poder cuantificar otros fármacos en diferentes matrices poliméricas. Aquí se ha expuesto la cuantificación de un fármaco con estructura aromática en una matriz proteica. El primero suele presentar picos de absorción intensos en la zona de número de onda bajas ( $<1500\text{ cm}^{-1}$ ) mientras que las proteínas tienen una absorbancia relativamente baja por debajo de  $1250\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, los carbohidratos, presentan absorbancias más intensas en las zonas de número de onda bajas, lo que podría representar casos más desafiantes. Por otro lado, también sería interesante ensayar el método con diferentes nanosistemas, como por ejemplo en liposomas, especialmente debido a que son los nanosistemas más abundantes en el mercado.

### *Carga de fármaco*

Como se mencionó en el **Capítulo I** de antecedentes, los fármacos pueden ser cargados en la superficie de las partículas mediante la incubación de estas en una disolución del fármaco. Diferentes parámetros como la concentración del fármaco, la concentración de nanopartículas

o la relación másica entre ambos pueden tener efectos sobre la carga total. La bibliografía no es clara en cuanto a cuál de estos parámetros tiene mayor influencia en el resultado final de la carga. Por estos motivos y haciendo uso del nuevo método más preciso para la cuantificación de fármaco cargado en nanopartículas presentado en el **Capítulo V**, se propone diseñar un experimento factorial que ponga a prueba todos los parámetros de carga que puedan estar influenciando la misma.

### *Liberación de fármaco*

En esta tesis presentamos la capacidad de las SFN para cargar fármacos como la Curcumina (**Capítulo II**) y la Naringenina (**Capítulo V**). Sin embargo, para obtener un sistema de administración de fármacos es necesario que este último sea liberado del nanosistema. Uno de los métodos más utilizados para medir la cinética de liberación se basa: (i) en incubar las partículas cargadas en un medio de liberación durante un periodo de tiempo, (ii) separar las fases, (iii) medir el fármaco liberado en el medio, (iv) redispersar el nanosistema en medio nuevo y repetir los pasos (i) a (iv). Sin embargo, el paso (ii) presenta los mismos problemas de separación de fase que se discutieron en el **Capítulo V**, pudiendo afectar a la medida de la liberación de fármaco.

Aquí, se propone para trabajos futuros utilizar un dispositivo en el que el nanosistema cargado se colocaría en un accesorio de diálisis para la unidad ATR del espectrómetro de infrarrojo y el fármaco liberado es cuantificado en función del tiempo. Utilizando un modelo matemático apropiado en combinación con una medición continua de la liberación de fármaco, sería posible estudiar los perfiles de liberación.







## Introduction

The academy and industry have made extraordinary advances in a wide variety of areas due to the development of nanotechnology and the control of structures at the nanoscopic levels. Particularly in the field of medicine, nanotechnology has the potential to generate a significant impact on human health, being able to improve the diagnosis, prevention and treatment of diseases. In this field, nanotechnology seeks to encapsulate drugs and/or tracer compounds in nanoparticles to increase their efficiency by allowing direct delivery to target tissues; while they reduce their toxicity avoiding accumulation and the consequent side effects in healthy tissues. The encapsulation of drugs also allows their controlled release, thus avoiding maximum levels of highly harmful or subtherapeutic concentrations. Moreover, nanoparticles are of great value in the transport of drugs with low solubility in water; which turns out to be the major problem when introducing new drugs to the market because it limits their bioavailability in the body.

The European Commission defines nanomaterials as those of natural, incidental or manufactured origin that contain particles in an abundant state, as aggregates or agglomerates in which, at least 50% of the particles, according to their size distribution by number have one or more external dimensions between 1 and 100 nm [1], although there is no universally accepted definition. Because an operational definition is required for the purposes of this study, the term nanomedicine is defined based on the proposal by Etheridge et al. [2] as “the use of nanoscale or nanostructured materials in medicine, engineered to have unique medical effects based on their structures, including structures with at least one characteristic dimension up to 300 nm”. Materials on this scale have unique properties from their macroscopic counterparts, both in terms of their physicochemical properties and physiological interactions.

A wide variety of materials can be used for the preparation of nanoparticles depending on the intended function of the system. Inorganic nanoparticles based on metals have high stability and small size, which gives them high cell penetrability. However, its prolonged use is usually toxic if the body unable to eliminate it correctly. Biodegradable synthetic polymers such as polyvinyl alcohol or polylactic acid are usually attractive alternatives since they can be decomposed in the body and their high purity makes the nanoparticle preparation highly reproducible. Despite this, many of the degradation products of these polymers are usually toxic and their synthesis is associated with the use of a large number of solvents and aggressive chemicals. Furthermore, these polymers are expensive. In

## Introduction

contrast, natural polymers are biocompatible, biodegradable, inexpensive, and their processing often requires mild operating conditions and reagents that are safe to handle.

The silk fibroin of the *Bombyx mori* species silkworm is a natural, protein polymer that presents an interesting combination of mechanical properties, such as flexibility and resistance which are still difficult to achieve with synthetic polymers. Furthermore, fibroin is biodegradable and biocompatible, which makes it an excellent material for the production of nanoparticles for drug delivery. Silk fibroin nanoparticles are capable of loading a wide variety of therapeutic compounds and various macromolecules, penetrate biological membranes and be chemically modified to extend their functionality.

Although the remarkable mechanical resistance of fibroin is one of the attractive properties of the biomaterial, the nanoparticle synthesis process is hampered by its high stability, due to the high number of hydrogen bonds in its secondary structure, mostly in the form of an antiparallel  $\beta$ -sheet. A recent method, developed by the Research Group in which this doctoral thesis has been carried out, based on the use of ionic liquids to dissolve native fibroin, has allowed the production of nanoparticles in an easy and scalable process for industry. Ionic liquids are organic salts that are in a liquid state at temperatures below 100 °C and are usually made up of an organic cation (frequently dialkyl imidazolium and tetraalkylammonium salts) and an inorganic or organic anion (for example,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Ionic liquids have emerged as promising solvents for a wide variety of chemical and biochemical processes because of their extraordinary properties, including negligible vapor pressure, high thermal and chemical stability, lower toxicity than many conventional organic solvents, and the potential for modulating its physicochemical properties based on the appropriate choice of the constituting cation and anion. Furthermore, ionic liquids can be separated from other solvents by simple distillation because of their high boiling point, which makes them easily recyclable.

The silk fibroin nanoparticle synthesis process comprises several stages. First, the fibroin is purified by removing the sericin (a method known as degumming). Second, fibroin must be dissolved in its monomeric units and, subsequently, regenerated into nanoparticles. Each of these steps can have significant effects on the secondary structure of the protein and given the implications, it has on the resistance, degradability and biocompatibility of the final product, their study is essential.

On the other hand, for the correct administration of therapeutic doses, the drugs loaded in the nanoparticles must be precisely quantified. To date, two approaches are mainly

used for this task. They are based on a direct and indirect measurement of the drug loading content in the nanoparticle. However, both suffer from inefficiencies in drug extraction and solid-liquid separation process, as well as dilution errors.

Given the above considerations, this **Doctoral Thesis** focuses on the study of silk fibroin nanoparticles as drug nanocarriers, their synthesis process using ionic liquids, the characterization of the secondary structure of the protein during the entire synthesis process and the quantification of the amount of drug in the nanoparticles.

## References

1. European Union Law 32011H0696. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32011H0696> (accessed on Aug 30, 2020).
2. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2013, 9, 1–14.



## Objectives

This **Doctoral Thesis** presents four global objectives: The study of (i) the synthesis process of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids, (ii) the influence of the silk fibroin purification process in the synthesis process, (iii) the characterization of the secondary structure of the protein throughout the synthesis process and (iv) the quantification of the amount of drug loaded in the nanoparticles. These global objectives have been broken down into specific objectives as indicated below:

5. Carry out a bibliographic review on the synthesis of biopolymeric nanoparticles using ionic liquids.
  - a. To study the capacity of ionic liquids to dissolve biopolymers that are interesting for the synthesis of nanoparticles in the administration of drugs. Among them: cellulose, xylan, starch, chitosan, keratin and silk fibroin.
  - b. To evaluate the process of synthesis of silk fibroin nanoparticles by dissolving them in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate accelerated by high-power ultrasound.
  - c. Examine the loading processes of curcumin on silk fibroin nanoparticles by coprecipitation and adsorption.
  
6. To study the influence of the silk degumming process on the structural characteristics of nanoparticles.
  - a. Purify silk fibroin using four of the most representative degumming methods in the literature, namely: autoclaving, short and intensive alkaline boiling (30 and 120 min, respectively) and high-power ultrasound.
  - b. Evaluate the efficiency of sericin removal from the methods used.
  - c. Evaluate fibroin degradation after degumming treatments using gel electrophoresis.
  - d. To study the morphology, mean size, size distribution, Z potential and surface charge density of the particles resulting from the fibroins treated with the different degumming methods and correlate these parameters with the integrity of the fibroin and the amount of sericin in the fibers.
  
7. To develop a method based on infrared spectroscopy that allows analyzing the secondary structure of silk in all stages of nanoparticle synthesis.

## Objectives

- a. To study the secondary structure of silk fibroin in its native fiber states, dissolved in ionic liquid and regenerated in nanoparticle form.
  - b. Compare Experimental Results with Computational Models for Banding to Stacked  $\beta$ -Sheet Structures.
  - c. Compare the secondary structure of native fibroin fiber with regenerated fibroin nanoparticles.
8. To develop a method for the direct quantification of drugs loaded in polymeric nanoparticles.
- a. Identify a signal in the infrared absorbance spectrum characteristic of the loaded drug and construct a calibration curve.
  - b. Validate the quantification method according to the IUPAC guidelines. Define the parameters of limit of detection, limit of quantification, reproducibility, linear range and precision.
  - c. Construct a calibration curve using the second derivative of the absorbance spectrum as an alternative to resolve overlapping peaks in order to extend the applicability of the method to other systems.

## Work Structure

Under the specific objectives, this work has been divided into the following chapters:

In **Chapter 1**, background information is presented along with a bibliographic review of the nanoparticles' state-of-the-art designs that have been proposed for drug transport. It will begin with a brief historical review of nanotechnology including the mechanism of increased penetration and retention proposed by Matsumura and Maeda in 1986, considered the beginning of nanomedicine. Next, key concepts such as the advantages provided by nanocarriers, as well as design principles will be discussed. Different routes of administration and elimination of nanoparticles will be analyzed. Subsequently, the characteristics of silk fibroin and its applications as a biomaterial, its structure, biocompatibility and degradability will be reviewed. Finally, silk fibroin nanoparticle synthesis methods and drug loading methods will be considered.

In **Chapter 2**, the synthesis of nanoparticles using ionic liquids and different biopolymers will be addressed, dedicating special importance to those produced from silk fibroin. The group's recent studies describing how high-power ultrasound can accelerate the process of dissolution of silk proteins in ionic liquids and how fibroin nanoparticles can be obtained directly from the fibroin-ionic liquid solution will be presented. rapid desolvation in polar organic solvents. As an example, the possible biomedical application of curcumin-loaded silk fibroin nanoparticles for cancer treatment is presented.

In **Chapter 3**, the study of the influence that the silk fibroin purification method -known as degumming- has on the nanoparticle production process will be carried out. Four methods were used based on (i) the use of an autoclave, (ii) short alkaline boiling ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), (iii) long alkaline boiling ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) and (iv) ultrasound. The resulting fibers were dissolved in the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, and used for the synthesis of nanoparticles by rapid desolvation in methanol. The relative efficiency of the degumming processes and the integrity of the resulting fibroin fibers were analyzed by mass loss, light microscopy, thermogravimetric analysis, infrared spectroscopy, and electrophoresis. Particle sizes and morphology were analyzed by dynamic light scattering and field emission scanning electron microscopy.

In **Chapter 4** the secondary structure of the resulting fibroin nanoparticles is studied since this will allow guaranteeing their mechanical properties and biocompatibility. In this section,

## Work Structure

a new method based on infrared spectroscopy will be presented to study the secondary structure of silk fibroin in different stages of the production process: in its native fiber state, dissolved in ionic liquid and after regeneration in the form of nanoparticles. The experimental analysis is based on the simultaneous adjustment of the absorption band of amide I and its second derivative. Unlike the usual adjustment made exclusively to the absorption spectrum, this new approach exploits all the spectral information contained in the spectrum and provides more robust results.

In **Chapter 5**, we develop a simple and robust method for the direct quantification of drugs in polymeric nanoparticles based on total attenuated reflection Fourier transform infrared spectroscopy that can be adapted to a wide variety of drug delivery systems.

Finally, in **Chapter 6** the overall conclusions drawn from the previous chapters are collected and proposals are made of future perspectives in the line of this Doctoral Thesis research.

Finally, it should be noted that each of the chapters presents the bibliography corresponding to each of the subjects under study at the end.

## General conclusions and future perspectives

### General Conclusions

In this Doctoral Thesis, the synthesis and characterization of silk fibroin nanoparticles for drug transport was investigated. Ionic liquids have been used for the dissolution of silk fibroin and other biopolymers for the production of nanoparticles. The influence of the silk degumming process on the properties of fibroin nanoparticles is studied. Through the simultaneous adjustment of the amide I band and its second derivative, a robust adjustment has been achieved to elucidate the secondary structure of silk fibroin at different stages of the nanoparticle production process involving ionic liquids. Finally, a simple and reliable method is developed for the direct quantification of loaded drug content in nanoparticles. The main results are summarized here and the prospects for future research are presented.

Regarding the bibliographic review carried out on the synthesis of biopolymeric nanoparticles using ionic liquids, the main conclusions obtained have been the following:

4. Ionic liquids show great power to dissolve a wide variety of biopolymers, including cellulose, xylan, starch, chitosan, keratin and silk fibroin.
5. The use of ionic liquids and ultrasound for the dissolution of silk fibroin allows:
  - (vi) Reduce dissolution time from hours to minutes compared to traditional methods.
  - (vii) Significantly increase the maximum concentration in the solution. Concentrations of up to 23% by weight of silk fibroin can be achieved using 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride as solvent.
  - (viii) Increase the stability of solutions from a few days to several months.
  - (ix) Biopolymer/ionic liquid solutions can be used directly without further purification to produce nanoparticles through the antisolvent process, this represents a great advance towards scalability of biopolymeric nanoparticle production.
  - (x) Ionic liquids are highly recyclable, which means that scalability can be done in an environmentally friendly process.
6. Silk fibroin nanoparticles can be loaded with curcumin by adsorption and coprecipitation methods. The charged nanoparticles had a narrow size distribution, with a hydrodynamic diameter <175 nm, and high zeta potential in absolute value.

## General conclusions

Regarding the influence that the silk fibroin purification process has on the characteristics of the nanoparticles produced, the main achievements obtained have been the following:

5. The efficiency for the removal of sericins of the different methods follows the series: ultrasound <autoclave <short alkaline boiling <intensive alkaline boiling.
6. The only method that produced sericin-free fibroin was intensive alkaline boiling.
7. Through the analysis of gel electrophoresis, it is concluded that the degradation produced by the different degumming methods follows the series: autoclave <ultrasound <short alkaline boiling <intensive alkaline boiling.
8. A positive correlation was found between the degradation of fibroin and the reduction in the size of the particles and their size distribution.

Regarding the study of the secondary structure of silk fibroin, the main achievements obtained have been the following:

5. Fibroin fibers consist of 58%  $\beta$ -sheets, 33% irregular structures and/or turn-like structures and 9% turn-like structures.
6. The three bands at 1626, 1619, and 1609  $\text{cm}^{-1}$  used to adjust the  $\beta$ -sheet region were tentatively assigned to distorted sheets and the two stacked  $\beta$ -sheet structures B and A, respectively.
7. The band assignment was supported by simulated amide I spectra and the relative abundance of each structure is in agreement with previous studies performed with nuclear magnetic resonance.
8. The regenerated silk fibroin nanoparticles showed an amide I band and secondary structure composition similar to that of native fibers, but with a 7% decrease in  $\beta$ -sheet content and an equal magnitude increase in turn-like structures.

Regarding the method developed for the direct quantification of drugs loaded in polymeric nanoparticles, the main achievements obtained have been the following:

5. A calibration curve with good linearity was obtained between 0.00 and 7.89 % of the relative mass of naringenin in the nanoformulation with an  $R^2$  of 0.973.
6. The limit of detection and the limit of quantification calculated following IUPAC recommendations were established at 0.3 and 1.0% of the relative mass of naringenin, respectively, with reproducibility of 2%.
7. The precision of the method was determined by the spike and recovery approach obtaining an average recovery of 104%. Furthermore, the robustness of the analytical method is

illustrated by the remarkable agreement between the calibrations performed at two different institutions.

8. As proof of concept, the same calibration was performed using the negative intensity of the second derivative as a function of the relative mass of naringenin. This approach for the construction of the calibration curve is beneficial in the case of having to resolve overlapping peaks for drug quantification in other nanosystems.

## Future Perspectives

### *Silk structure*

The secondary structure of silk fibroin is responsible for the impressive mechanical properties of the biopolymer. In **Chapter IV**, it has been observed that fibroin type B stacked  $\beta$ -sheet structures do not form to the same extent as type A in the particular nanoparticle synthesis process used. The formation of crystalline silk, *silk II* from a partially disordered and water-soluble secondary structure, *silk I*, is of great scientific and commercial interest for the production of artificial silk. Stacked  $\beta$ -sheet structures are statistically formed in a 2A:1B distribution in the natural bio-spinning process. It would be interesting to study how parameters such as the temperature of methanol (antisolvent) or the fibroin/ionic liquid solution in the synthesis of nanoparticles could have thermodynamic control effects on the formation of these structures.

In case of being able to achieve control over the structures formed, these could be correlated with different mechanical and biochemical properties such as the biocompatibility or degradability of fibroin.

### *Quantification of drugs in different systems*

In **Chapter V** a method for quantifying naringenin in silk fibroin nanoparticles has been presented. A priori, the method should be applicable to different systems, that is, to be able to quantify other drugs in different polymeric matrices. Here the quantification of a drug with an aromatic structure in a protein matrix has been exposed. The former usually have strong absorption peaks in the low wavenumber range ( $<1500\text{ cm}^{-1}$ ) while proteins have a relatively low absorbance below  $1250\text{ cm}^{-1}$ . However, carbohydrates have more intense absorbances in the low wavenumber areas, which could represent more challenging cases. On the other hand, it would also be interesting to test the method with different nanosystems, such as liposomes, especially since they are the most abundant nanosystems on the market.

### *Drug loading*

As mentioned in the Background **Chapter II**, drugs can be loaded onto the surface of the particles by incubating the particles in a drug solution. Different parameters such as drug concentration, nanoparticle concentration, or the mass ratio between the two can have effects on the total charge. The literature is not clear as to which of these parameters has the greatest influence on the final result of loading. For these reasons and making use of the new, more

## Future perspectives

precise method for the quantification of drug loading in nanoparticles presented in **Chapter V**, it is proposed to design a factorial experiment that tests all the loading parameters that may be influencing it.

## *Drug release*

In this **Thesis**, we present the capacity of fibroin nanoparticles to load drugs such as Curcumin (**Chapter II**) and Naringenin (**Chapter V**). However, to obtain a drug delivery system the latter must be released from the nanosystem. One of the most used methods to measure release kinetics is based on: (i) incubating the loaded particles in a release medium for a determined time, (ii) separating the phases, (iii) measuring the drug released in the medium, (iv) redisperse the nanosystem in fresh medium and repeat steps (i) to (iv). However, step (ii) suffers from the same phase separation problems that were discussed in **Chapter V** and can affect the measurement of drug release.

Here, it is proposed for future work to use a device in which the loaded nanosystem would be placed in a dialysis accessory for the ATR unit of the infrared spectrometer and the released drug is quantified as a function of time. Using an appropriate mathematical model in combination with continuous measurement of drug release, it would be possible to study the release profiles.