



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Caracterización de Nanoestructuras
de Quitosano, Fibroína de Seda y Oro
como Liberadores de Fármacos**

D^a María del Mar Collado González

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María Gloria Vállora Cano, Catedrática de Universidad del Área de Química en el Departamento de Ingeniería Química, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de nanoestructuras de quitosano, fibroína de seda y oro como liberadores de fármacos", realizada por D^a. María del Mar Collado González, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 06 de Septiembre de 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a long horizontal stroke.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Guillermo Díaz Baños, Catedrático de Universidad del Área de Química en el Departamento de Química física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de nanoestructuras de quitosano, fibroína de seda y oro como liberadores de fármacos", realizada por D^a. María del Mar Collado González, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 06 de Septiembre de 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia

San Luis, September 11, 2017

Professor F.G. Díaz Baños
Department of Physical Chemistry,
University of Murcia, Campus de Espinardo,
30071 Murcia, Spain

Dear Professor Díaz Baños,

Mar Collado González presents a Thesis entitled “Characterization of nanostructures of chitosan, silk fibroin, and gold for drug deliver” to obtain her PhD degree.

The thesis is organized very eloquently and well developed. A brief and consequent introduction where the objectives are adequately explained. In each of the chapters each of the objectives set is developed, all possible determinations regarding the particles and possible interactions are clearly studied. Finally, the manuscript is reasonably free of typographical and other errors. Therefore, it is recommended to approve the thesis.

I greet you attentively. Thank you very much.

Dr. Martin A. Masuelli

Coordinador Área de Química Física, Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Laboratorio de Membranas y Biomateriales-Instituto de Física Aplicada-CONICET. Laboratorio de Investigación y Servicios de Química Física (LISEQF-UNSL). Chacabuco 917, CP5700, San Luis, Argentina. Editor in Chief of Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry

15th September 2017

Professor F.G. Díaz Baños
Department of Physical Chemistry
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Díaz Baños,

Mar Collado González presents a Thesis entitled “*Characterization of nanostructures of chitosan, silk fibroin, and gold for drug deliver*” to obtain her PhD degree.

The manuscript presents an extensive work organized in chapters and describes original scientific research, part of which has been published in well-regarded peer-review journals. The main results are focused on the physico-chemical characterization of different nanostructures, and some cytotoxic assays. Each chapter is very well presented with a short and concise introduction providing the reader with a clear state of the art and objectives. The experimental work has been carried out with evident care and competence and the results are presented in a very accurate and rigorous manner.

The thesis is organized logically and acknowledge relevant previous work published by others and is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.

Finally, the manuscript is reasonably free of typographical and other errors.

On balance, I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely

Nuno Ricardo Esteves Ferreira

11th September 2017

Professor F.G. Díaz Baños
Department of Physical Chemistry
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Díaz Baños,

Mar Collado González presents a Thesis entitled “*Characterization of nanostructures of chitosan, silk fibroin, and gold for drug deliver*” to obtain her PhD degree.

The manuscript presents an extensive work organized in chapters and describes original scientific research, part of which has been published in well-regarded peer-review journals. The main results are focused on the physico-chemical characterization of different nanostructures, and some citotoxic assays. Each chapter is very well presented with a short and concise introduction providing the reader with a clear state of the art and objectives. The experimental work has been carried out with evident care and competence and the results are presented in a very accurate and rigorous manner.

The thesis is organized logically and acknowledge relevant previous work published by others and is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.

Finally, the manuscript is reasonably free of typographical and other errors.

On balance, I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely



Francisco Veiga
Full Professor



Professor F.G. DíazBaños
Department of Physical Chemistry
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Díaz Baños,

Mar Collado González presents a Thesis entitled “*Characterization of nanostructures of chitosan, silk fibroin, and gold for drug deliver*” to obtain her PhD degree.

The manuscript presents an extensive work organized in chapters and describes original scientific research, part of which has been published in well-regarded peer-review journals. The main results are focused on the physico-chemical characterization of different nanostructures, and some cytotoxic assays. Each chapter is very well presented with a short and concise introduction providing the reader with a clear state of the art and objectives. The experimental work has been carried out with evident care and competence and the results are presented in a very accurate and rigorous manner.

The thesis is organized logically and acknowledge relevant previous work published by others and is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.

Finally, the manuscript is reasonably free of typographical and other errors.

I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely

Professor Alessandro Gandini

São Carlos, September 11, 2017

11th September 2017

Dr. F.G. Díaz Baños
Department of Physical Chemistry
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Dr. Díaz Baños,

This is to testify that the thesis entitled: “**Characterization of nanostructures of chitosan, silk fibroin, and gold for drug delivery**” presented by Ms. Mar Collado González to get a PhD degree, meets the requirements for awarding the International Doctorate mention.

The research has been carried out in a proper scientific way, the data support the conclusions and the thesis is well-written.

Yours sincerely,



Dr Ngesa Ezekiel Mushi
Lecturer, University of Dar es Salaam, and
Visiting Researcher at KTH Royal Institute of Technology

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
CAPÍTULO I : INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	7
1. Contextualización	9
2. Antecedentes	12
- Nanopartículas de oro.....	12
- Nanopartículas de fibroína de seda.....	14
- Quitosano.....	16
- Nanoestructuras de quitosano.....	20
- Nanocomposites de oro y quitosano.....	22
- Nanocomposites no metálicos con quitosano.....	23
3. Objetivos.....	24
CAPÍTULO II : MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	25
1. Materiales.....	27
2. Métodos	30
2.1. Preparación de disoluciones y suspensiones.....	30
2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	31
2.3. Potencial Z.	45
2.4. Espectrofotometría.....	48
2.5. Microscopía	50
- Microscopía electrónica.....	50
- Microscopía de barrido láser confocal	53
2.6. Fotocentrifugación analítica.	54
2.7. Cromatografía líquida de alta resolución.....	59
2.8. Sonicación.....	61
2.9. Cultivos celulares.....	62

- Líneas celulares.....	62
- Subcultivo celular	62
- Ensayos de citotoxicidad.....	63
CAPÍTULO III : CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO DE PESO MOLECULAR MEDIO EN DISOLUCIÓN.....	65
1. Introducción.	67
2. Materiales y Métodos	67
3. Resultados y discusión.	68
3.1. Efecto de la concentración de quitosano en la distribución de agregados.	68
3.1. Efecto del pH en el quitosano.	69
3.1. Efecto de la fuerza iónica en el quitosano.....	72
3.2. Aspecto de los agregados de quitosano.....	74
4. Conclusiones.	77
Anexo al capítulo III	79
CAPÍTULO IV : ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN PRESENCIA DE QUITOSANO.....	83
1. Introduction.	85
2. Materiales y Métodos	85
3. Resultados y discusión.	86
3.1. Influencia del pH y de la fuerza iónica en la suspensión de AuNP.	87
3.2. Influencia del pH y de la fuerza iónica en los nanocomposites de AuNP y CS..	92
4. Conclusiones.	99
CAPÍTULO V : CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPOSITES DE TAMAÑO NANOMÉTRICO COMPUESTOS DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO.	101
1. Introducción.	103
2. Materiales y métodos	103
3. Resultados y discusión.	105

3.1.	Síntesis de nanocomposites de nanopartículas de oro y quitosano.....	105
3.2.	Estabilidad de los nanocomposites en función del tiempo.	108
3.3.	Estabilidad de los nanocomposites en función de la temperatura.	112
3.4.	Efecto de la sonicación sobre los nanocomposites de AuNP y CS.	114
3.5.	Efecto de la liofilización sobre los nanocomposites de AuNP y CS.	116
4.	Conclusiones.....	118
	Anexo al capítulo V.....	119
CAPÍTULO VI : QUITOSANO COMO AGENTE ESTABILIZADOR DE NANOPARTÍCULAS CON POTENCIAL Z NEGATIVO: NANOPARTÍCULAS DE ORO Y NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA.....		121
1.	Introducción.....	123
2.	Materiales y métodos.....	124
3.	Resultados y discusión.....	126
3.1.	Nanocomposites de CS y AuNP	126
3.2.	Nanocomposites de CS y SFN.....	130
3.3.	Nanocomposites de glicol-CS y SFN.	136
4.	Conclusiones.....	141
CAPÍTULO VII : PAPEL CLAVE DEL QUITOSANO EN EL TAMAÑO FINAL DE NANOCOMPOSITES POLISACARÍDICOS COMPLEJOS.....		143
1.	Introducción.....	145
2.	Materiales y métodos.....	146
3.	Resultados y discusión.....	150
4.	Conclusiones.....	160
CAPÍTULO VIII : ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....		161
1.	Introducción.....	163
2.	Materiales y métodos.....	165
3.	Resultados y discusión.....	167
3.1.	Estudio previo a los ensayos de citotoxicidad	167

3.2. Citotoxicidad de líquidos iónicos	170
3.3. Ensayos de citotoxicidad de nanoestructuras	172
- Estudio de osmolalidad de las nanoestructuras.....	172
- Citotoxicidad del CS MMW.....	172
- Estudio de agregación de SFN en condiciones de cultivo celular	173
- Citotoxicidad de SFN.....	176
- Internalización de SFN	176
- Citotoxicidad de nanocomposites de CS:SFN	177
- Citotoxicidad de AuNP	179
- Citotoxicidad de nanocomposites de AuNP:CS	181
4. Conclusiones.	182
CAPÍTULO X : CONCLUSIONES GENERALES	185
CAPÍTULO XI : BIBLIOGRAFÍA.....	191

A los que comenzaron mi historia:

A mi padre.

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Gratitud del latín *gratitūdo*: Sentimiento que nos obliga a estimar el beneficio o favor que se nos ha hecho o querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera (DRAE, 23ª Edición).

Siendo este un punto de inflexión en mi historia, me gustaría echar la vista atrás por un momento y agradecer aquellos beneficios o favores que me han sido prestados.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Guillermo Díaz Baños y la Dra. María Gloria VÍllora Cano. Es muy difícil resumir en pocas palabras las razones de mi gratitud, posiblemente el mejor resumen sea “por TODO”. Aunque la melancolía intenta adueñarse de mi escritura, creo que resistiré y simplemente agradeceré la calidad humana, si largo ha sido el camino, más duro ha sido el recorrido. También agradezco, ¿cómo no hacerlo?, la calidad científica y el aprendizaje que he realizado durante estos años.

Agradezco también a mis compañeras de laboratorio, Mercedes y Rocío, y a los profesores del departamento de Ingeniería Química su aportación a esta tesis y el buen ambiente de trabajo. Al grupo de computación de alto rendimiento, Horacio Pérez y Jorge Peña, por los estudios de *blind docking* que han permitido enriquecer la discusión de los resultados experimentales. A Jaime Colchero y Lisa Almonte por su amabilidad y paciencia. A Antonio Guirao por las discusiones sobre dispersión de luz y por su buen humor ante las eternas medidas de las disoluciones homeopáticas. Al profesor António José Ribeiro por aceptarme en su laboratorio en Coimbra. Al servicio de Microscopía, a Maruja, Manoli, Paco y María, por el apoyo ofrecido. Gracias al servicio de cultivo de tejidos y células por su ayuda y por las discusiones: Toñi, Pepe, Juana, Dori, Pilar, Azucena y Laura.

A los compañeros y amigos que encontré en mi estancia en Coimbra, por la ayuda recibida y las risas que compartimos. Especialmente a Alessandra Ribeiro, Aná Claudia, N Ricardo Ferreira, Donna Ginna and Prof. Veiga

A mi madre y a mis hermanos, Jacin, Ruth y Antonio, por su apoyo, por respetar e intentar comprender mis ansias de libertad. A Antonia Ramón, por la ayuda que me ha brindado a lo largo de estos años.

A los amigos del grupo de macromoléculas: a Ana y a Vanesa por los recuerdos que forjamos durante mi primer año de tesis. A Ramón Pamies, a quien siempre me encuentro a lo largo del camino en forma de alguien que tenemos en común. Siempre recordaré las conversaciones que tuvimos durante mi primer año de doctorado y los mensajes siempre positivos. A José Ginés, Ricardo, Cerón, Encarni y José María Pastor por los eventos sociales que permiten que todos sigamos cuerdos, a Guzmán en especial por su inestimable ayuda y colaboración, a Antonio, Javi Cerezo, a José María y a José Manuel en especial por las “discusiones” de las comidas y las científicas que tan bien me han caído. A Enrique Millán, por compartir su experiencia, transmitir siempre optimismo y calma. Quiero agradecer en especial a Eduardo Laborda su ayuda tanto dentro como fuera del terreno científico.

A la familia Coronado-Parra por por acogerme siempre, porque nunca se deja de aprender. Por todo el cariño que desprenden. A Ángeles por su optimismo y por su energía.

A MD y José Antonio por contribuir a que el tiempo de preparación de la tesis haya sido más ameno. A Juan y a Antonio J. por los buenos momentos, los tapeos veraniegos o no y los intentos de recolección de setas. A Francisco Rodríguez Lozano por contribuir a que pudiera realizar esta tesis. A María José porque es muy difícil encontrar *microondas* tan positivas, por compartirlas. A los *afterworkers* por los momentos de aireamiento cerebral, las jornadas *gastro-astronómicas*, las discusiones científicas o no y la ayuda siempre desinteresada. A Mariola por la amistad que nos une a pesar del tiempo y de la distancia. A Pedro Chacón por compartir su aprendizaje.

A los *Goonies* por los momentos de risa y las discusiones interminables, pero sobre todo por la heterogeneidad y por los momentos planeados o espontáneos. A Fernando Segues, por acogerme y ayudarme siempre que lo necesito. A los *caronianos* JF y Molera, por su ayuda a mantener los pies en la tierra, por su amistad y todos los momentos que hemos pasado. Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento al *triumvirato+1*, Tere, Luis y Cristóbal, por acompañarme en las diversas etapas que he transitado, por crecer conmigo o estar presentes mientras yo lo hacía.

Por último, incluyo una mención a aquellos que no aparecen en esta lista por olvido o descuido pero que merecen mi más sincera gratitud.

Gracias

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS USADAS

$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda a la que se registra la absorbancia máxima
AcUr	Acetato de uranilo
ALG	alginato
AuNP	Nanopartículas de oro recubiertas de citrato
c*	Concentración crítica
CS	Quitosano
DAPI	Dihidrocloruro de 2-(4-amidinofenil)-6-indolcarbamidina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Sulfato de dextrano
ECACC	Colección europea de cultivo de líneas celulares autenticadas
FBS	Suero fetal bovino
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GA	Grado de acetilación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Fuerza iónica
IL	Líquidos iónicos
LDV	Efecto láser doppler
LMW	Peso molecular bajo
MEM	Medio de cultivo de Eagle
MMW	Peso molecular medio
MTT	Bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazolio
NC	Nanocomposite
PEG 4000	Poli(etilenglicol) 4000
pI	Punto isoeléctrico
PVP K90	Poli(vinilpirrolidona) K90
SFN	Nanopartículas de fibroína de seda
Teoría DLVO	Teoría de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek.

SÍMBOLOS USADOS

ω	Frecuencia de una onda
c	Velocidad de la luz en el vacío (DLS) concentración
λ	Longitud de onda de la radiación incidente (DLS)
v	Velocidad de propagación de una onda en el medio (DLS) Velocidad del electrón (microscopía) Velocidad de migración de la partícula (fotocentrifugación)
t	tiempo
E_0	Amplitud máxima de la radiación incidente
μ	Dipolo inducido (DLS) Índice de refracción (microscopía)
α	Polarizabilidad de una molécula
E'	Amplitud máxima de la radiación emitida (DLS)
ϕ	Ángulo formado entre la línea que une el vector polarización de una partícula y el vector posición
I_0	Intensidad de la radiación incidente
I	Intensidad de la radiación emitida
R	Razón de Rayleigh
θ	Ángulo formado entre la línea que forma el haz incidente que continúa después de atravesar la molécula y la línea formada entre el punto de observación y el centro emisor
$\frac{\partial n}{\partial c}$	Variación del índice de refracción con la concentración
\mathcal{N}_A	Número de Avogadro
n_1	Índice de refracción del disolvente
M	Masa molar de la materia
$\Delta\mu_1$	Variación del potencial químico
V_1	Volumen molar del disolvente
k_b	Constante de Boltzmann
T	Temperatura en grados Kelvin
π	Presión osmótica
A_2	Segundo coeficiente del virial
K y k'	Constantes ópticas
w_i	Fracción en peso total de un polímero
M_w	Peso molecular promedio en peso de un polímero
τ	Tiempo de relajación de la función de correlación

A	Constante de la función de correlación (DLS) Absorbancia (espectrofotometría)
B	Constante de la función de correlación
D	Coefficiente de difusión traslacional
r_h	Radio hidrodinámico
η	Viscosidad de la disolución
I_p e I_g	Intensidad emitida por una partícula pequeña y una grande, respectivamente
r_p y r_g	Radio de una partícula pequeña y una grande, respectivamente
U_E	Movilidad electroforética
ϵ	Constante dieléctrica
ζ	Potencial Z
$f(ka)$	Función de Henry
δ	Poder de resolución
h	Constante de Planck
p	Momento lineal de la partícula
V	Diferencia de potencial (microscopía) Volumen de la partícula (fotocentrifugación)
m	Masa del electrón (microscopía) Masa de la partícula (fotocentrifugación)
r_ϕ	Distancia al eje de giro
m_0	Masa del líquido
f	Coefficiente de fricción
V_0	Volumen del líquido desalojado por una partícula
ρ_p y ρ_0	Densidad de una partícula y del disolvente, respectivamente
t_r	Tiempo de retención

Capítulo I : Introducción y objetivos

1. Contextualización

La nanomedicina ha experimentado un progreso significativo en cuanto al diseño y finalidad de las aplicaciones en las décadas pasadas (Cho et al., 2013; Pelaz et al., 2017). Los nuevos diseños están orientados a mejorar la eficacia terapéutica y a preservar las propiedades de las moléculas bioactivas (Mottaghitalab, Farokhi, Shokrgozar, Atyabi, & Hosseinkhani, 2015; Zhao, Li, & Xie, 2015). En este sentido, el uso de sistemas de liberación controlada ofrece ventajas tales como la mejora de la biodisponibilidad de los fármacos, gracias a la reducción de la tasa de degradación de los mismos o la mejora de la captación celular, permitiendo una terapia dirigida, y reduciendo así los efectos secundarios de los tratamientos (Mottaghitalab et al., 2015; Zhao et al., 2015).

La derivatización de nanodispositivos para desarrollar tratamientos dirigidos ha ganado especial atención en el tratamiento del cáncer, en el que el direccionamiento se consigue gracias a la sobreexpresión de determinados factores en las células tumorales y de condiciones ambientales específicas tales como la acidificación del medio o la elevada angiogénesis en las zonas próximas a los tumores. (Ruoslahti, Bhatia, & Sailor, 2010; Shi, Kantoff, Wooster, & Farokhzad, 2016).

Otro ejemplo es el desarrollo de tratamientos antimicrobianos. La aplicación de antibióticos está produciendo un aumento en la aparición de cepas multirresistentes y como alternativa al tratamiento con dichas moléculas, se ha planteado el uso de péptidos antimicrobianos. El principal inconveniente en el uso de los mismos es su tendencia a agregar. Por lo que el desarrollo de un sistema que consiga estabilizarlos, manteniendo sus propiedades antimicrobianas es altamente deseable (Ruoslahti et al., 2010; Shi et al., 2016).

Los sistemas de liberación de fármacos se pueden preparar usando varios tipos de materiales como liposomas, carbón, metales, polímeros, micelas y dendrímeros. Entre ellos, las nanoestructuras de polímeros biodegradables presentan una biocompatibilidad excelente, y buenas tasas de encapsulación y liberación controlada (Zhao et al., 2015). Se pueden sintetizar mediante métodos como el autoensamblaje, la gelificación iónica de los polielectrolitos, interacción electrostática de los polímeros, emulsión y desolvatación (Yang et al., 2015). Las estructuras poliméricas obtenidas constituyen una matriz excelente para la carga de fármacos ya que éstos pueden quedar adsorbidos en la superficie de las nanoestructuras o atrapadas en su interior (Yang, Han, Zheng, Dong, & Liu, 2015). Ejemplos de polímeros naturales son tanto polisacáridos como la celulosa, el quitosano, el ácido hialurónico, el alginato, el dextrano y el almidón como proteínas como colágeno, la gelatina, la elastina, la albúmina y la fibroína de la seda (Zhao et al., 2015). Los polisacáridos muestran un tiempo de circulación en sangre relativamente largo y baja captación por el sistema del retículo endotelial debido a su pequeño tamaño. Presentan alta permeabilidad tisular, por lo que en ocasiones se define a este

proceso como direccionamiento pasivo (Yang et al., 2015). Entre las dificultades encontramos que los polímeros naturales tienen una pureza variable, baja estabilidad y requieren modificaciones antes de su utilización (Mottaghitalab et al., 2015)

Para diseñar sistemas de liberación de fármacos, es necesario tener en cuenta que sus efectos fisiológicos dependen de características intrínsecas y extrínsecas del propio nanosistema. Entre las primeras, encontramos el tamaño, en función del cual, los nanosistemas se podrán internalizar en las células o no (Wang, Lee, Chiou, & Wei, 2010). La forma también afecta a la internalización, ya que los sistemas esféricos lo harán mejor que los que presentan cualquier otra forma (Alkilany & Murphy, 2010; Chithrani, 2010). La carga superficial o los grupos expuestos en la superficie afectan a la capacidad de interacción con la membrana celular y a la citotoxicidad de los nanosistemas de forma directa. Por ejemplo, nanopartículas de oro modificadas con polímeros aniónicos presentaron un valor de citotoxicidad cinco veces inferior a las modificadas con polímeros catiónicos (Hühn, Kantner, Geidel, Brandholt, De Cock, Soenen, Rivera-Gil, et al., 2013). No obstante, cuando se introducen las nanoestructuras en condiciones fisiológicas, las proteínas del sistema, entre otros elementos del medio van a interactuar con el nanodispositivo, disponiéndose en la superficie y conformando lo que recibe el nombre de proteínas de corona. Esta corona determina, en parte, las interacciones con las membranas celulares y la internalización de las mismas (Alkilany & Murphy, 2010). Entre las características extrínsecas a considerar encontramos factores como la forma en que estos sistemas serán eliminados del organismo (la mayoría de los biomateriales se pueden eliminar por absorción en el hígado, los riñones o los pulmones), la tasa de biodegradación (la degradación del sistema en un medio biológico) y la liberación no deseada de fármacos (la desorción de las moléculas adsorbidas a la superficie antes de llegar a la diana de liberación, la difusión de los fármacos a través de las matrices poliméricas y la erosión de la matriz nanoparticulada) (Mottaghitalab et al., 2015).

Para usar sistemas de liberación, es importante tener en cuenta que el diámetro mínimo de los capilares en el cuerpo humano es de 4 μm , lo que implica que la agregación de los nanodispositivos puede tener un efecto nefasto si los agregados alcanzan un tamaño micrométrico y quedan retenidos en los vasos. Por ello es muy importante evitar la aglomeración de las nanopartículas en el medio biológico (Wang, Xu, Yang, & Shao, 2015).

La agregación de las nanopartículas ha sido caracterizada y explicada en el contexto de la teoría de Derjagin, Landau, Verwey y Overbeek, conocida como teoría DLVO. Esta, predice la importancia de las fuerzas atractivas tipo Van der Waals y la necesidad de mantener suficientemente separadas las partículas. Una forma de conseguir esta separación es mediante repulsiones electrostáticas entre los coloides (Zakaria et al., 2013). Como ejemplo, la superficie de las nanopartículas de oro recubiertas con citrato (AuNP) en agua a pH igual o mayor a 3, presenta carga negativa, por lo que aparecen las fuerzas electrostáticas repulsivas en la superficie de las nanopartículas responsables

de que estas no agreguen (He, Zhang, & Yu, 2015). El mecanismo de estabilización de estas nanopartículas usando polímeros se consigue por dos vías. Una de ellas es la ya mencionada estabilización electrostática. La segunda vía consiste en la estabilización estérica de las partículas coloidales conseguida por adsorción física de las macromoléculas (Baygazieva et al., 2014).

Cuando se exponen las nanopartículas a un medio biológico o a alguno de los modelos utilizados en el laboratorio, como el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o el tampón fosfato salino (PBS), las propiedades intrínsecas de las mismas tales como cargas superficiales, estado de agregación, etc, cambian significativamente como respuesta a las propiedades del entorno: fuerza iónica (I), pH, temperatura y componentes de la disolución. En concreto, la elevada fuerza iónica del medio biológico, aproximadamente 150 mmol/L, da lugar al apantallamiento, al menos en cierto grado, de las fuerzas electrostáticas presentes en la superficie de las nanopartículas, que evitan su agregación. Como resultado, el campo de acción de dichas fuerzas queda reducido a pocos nm desde la superficie de la estructura y el acercamiento de los nanodispositivos no se verá impedido con lo que podrá producirse la agregación.

El desarrollo de sistemas de liberación de fármacos conlleva una serie de etapas más o menos bien establecidas (Figura I.1). En primer lugar es necesario sintetizar o desarrollar las nanoestructuras de interés. Es necesario llevar a cabo la caracterización físico-química de los nanodispositivos. Esta caracterización implica, entre otros aspectos, el estudio del tamaño y la carga superficial de las nanoestructuras y la variación de las propiedades de los sistemas al ser expuestos a diversas condiciones. Por otra parte, la caracterización citotóxica de los nanosistemas es esencial. Los nanodispositivos que presentan citotoxicidad se descartan y no se continúa con su desarrollo aunque sus propiedades físico-químicas sean ideales.

De forma simultánea o previa a lo ya descrito, es necesario el desarrollo de fármacos de interés, bien de síntesis química, bien por modificación de sustancias naturales. La siguiente etapa en el desarrollo de vehículos de liberación es la evaluación de la carga y la descarga de los fármacos de interés en los nanosistemas desarrollados. Una vez se comprueba que el sistema es capaz de cargar un fármaco y de descargarlo en las condiciones deseadas, se continúa la evaluación con estudios de los efectos sobre cultivos celulares y sobre animales de experimentación como ratas, ratones, o cerdos, entre otros. Si los resultados en modelos animales rinden resultados positivos, se autoriza la realización de los ensayos preclínicos conducentes a la obtención, finalmente, de la autorización para usar los nanosistemas desarrollados en clínica.

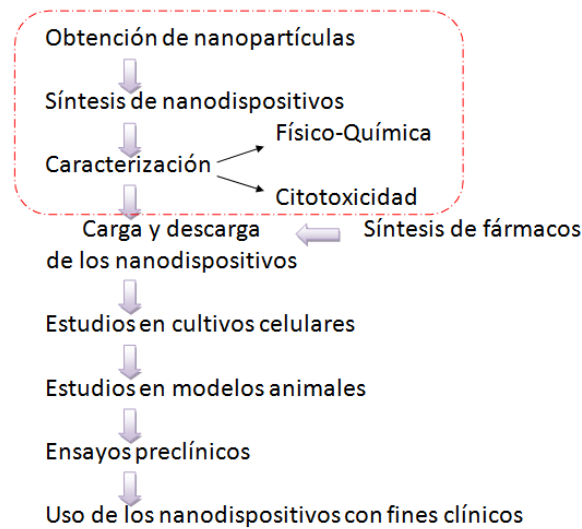


Figura I.1. Etapas del desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Las etapas abordadas en este trabajo aparecen encuadradas en rojo.

Las etapas abordadas en este trabajo conciernen a la síntesis y caracterización de nanodispositivos para liberación de fármacos.

En el contexto de la síntesis de vehículos de liberación de fármacos, en este trabajo tratamos de estabilizar nanopartículas de oro recubiertas de citrato (AuNP) y nanopartículas de fibroína de seda (SFN). Estudios previos en ambos sistemas muestran buena biocompatibilidad y capacidad de carga y descarga de moléculas. Sin embargo, presentan rápida agregación al ser expuestas a condiciones fisiológicas. En este trabajo utilizamos el quitosano (CS) como estabilizador de diferentes nanodispositivos polianiónicos. Usamos AuNP como modelo de nanopartículas metálicas, SFN como modelo de nanoestructuras no metálicas y otros polisacáridos como alginato o sulfato de dextrano para evaluar la capacidad del CS como estabilizador en sistemas complejos.

2. Antecedentes

- Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas muestran propiedades físicas, químicas y biológicas únicas respecto a las partículas más grandes compuestas de los mismos metales. Por ello, han ganado tanto interés recientemente (Basu, Pande, Jana, Bolisetty, & Pal, 2008; Baygazieva et al., 2014; Moharram, Khalil, Sherif, & Khalil, 2014).

Existen diversos métodos de obtención de nanopartículas metálicas a partir de sales inorgánicas como adsorción, impregnación, precipitación, co-precipitación, etc. (Baygazieva et al., 2014; Jin et al., 2013; Miyama & Yonezawa, 2004; Regiel-Futyra et al., 2015; Shih, Shieh, & Twu, 2009). Las características de las nanoestructuras finales como tamaño, forma o propiedades de la superficie, se pueden controlar mediante el uso

de polímeros (Di Carlo et al., 2012; Emam & Ahmed, 2016; Leiva et al., 2015; Rescignano et al., 2015; Shih et al., 2009).

En concreto, las nanopartículas de oro presentan propiedades ópticas, eléctricas, y catalíticas que tienen potenciales aplicaciones en el campo de la física, química, óptica, biología, electrónica, ciencia de los materiales (Daniel & Astruc, 2004; Guo, Xu, Ferhan, Chen, & Kim, 2013; He et al., 2015; Hu et al., 2015; Vo, Guillon, Dupont, Kowandy, & Coqueret, 2014), bioquímica (Kumar, Seth, & Kumar, 2014), ciencias ambientales (Louie, Spielman-Sun, Small, Tilton, & Lowry, 2015) y ecotoxicología (Park, Woodhall, Ma, Veinot, & Boxall, 2015). Además, estas nanoestructuras se han propuesto como biosensores o sistemas de liberación de fármacos (Jia, Guo, Zhu, & Ma, 2014; Pissuwan, Valenzuela, & Cortie, 2006).

Se pueden obtener nanopartículas de oro mediante la reducción de sales aúricas en presencia de un agente reductor que previene la agregación (Vo et al., 2014; Zhou, Ralston, Sedev, & Beattie, 2009). El hecho de que dichos agentes reductores sean, a menudo, tóxicos o peligrosos, hace que el uso de agentes estabilizantes “verdes” presente alto interés (Di Carlo et al., 2012; Moharram et al., 2014). Entre estos encontramos el citrato, que ha sido ampliamente utilizado, y polímeros como el quitosano, en este caso, el tamaño y forma de las nanopartículas de oro dependen de la masa molecular y de la proporción de polímero usado y la cantidad de oro empleada en el proceso, de la naturaleza del disolvente empleado, del pH, la temperatura, etc. (Baygazieva et al., 2014).

Las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (AuNP) se han estudiado debido a su alta estabilidad coloidal en agua, buena biocompatibilidad, facilidad de modificación de su superficie, usando el citrato como enlazante (Liu, Zhang, & Chaudhuri, 2014; Madhusudhan et al., 2014), la actividad antimicrobiana de las nanoestructuras resultantes (Regiel-Futyra et al., 2015), baja toxicidad (Bhirde, Hassan, Harr, & Chen, 2014) y porque presentan un largo período de circulación (Madhusudhan et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la alta estabilidad en agua, previamente mencionada, las AuNP agregan en condiciones fisiológicas (Zakaria et al., 2013), produciendo un viraje de color de la suspensión en la que están las nanoestructuras. La suspensión de AuNP libres es roja con $\lambda_{m\acute{a}x} = 520 \text{ nm}$ y se vuelve azul con $\lambda_{m\acute{a}x} = 670 \text{ nm}$ tras la agregación (Basu et al., 2008; He et al., 2015; Kumar et al., 2014). Dicha agregación produce la pérdida de las propiedades físicas, químicas y biomédicas de interés. Por lo que se han realizado esfuerzos para mejorar la estabilidad coloidal de estas nanoestructuras en condiciones fisiológicas (Alkilany et al., 2014). Con dicho fin, se han utilizado típicamente materiales biodegradables y polielectrolitos debido a que combinan propiedades que les permiten la estabilización por vía estérica y electrostática (Baygazieva et al., 2014; Leiva et al., 2015).

Se han descrito casi 120 proteínas del plasma humano capaces de unirse a nanopartículas de oro y previenen la rápida agregación de las nanoestructuras pero no

evitan la alta captación por el sistema reticuloendotelial. Como consecuencia se produce la agregación de las mismas en el interior de los endosomas y la toxicidad resultante se incrementa significativamente (Bogdanov et al., 2015; Jain et al., 2014).

- Nanopartículas de fibroína de seda

Las fibroínas son proteínas fibrosas producidas por una gran variedad de insectos y arañas. La fibroína de seda más estudiada es la procedente del gusano de la seda, *Bombyx mori*, y de las arañas *Nephila clavipes* y *Araneus diadematus* (Jastrzebska et al., 2015).

La fibroína de seda es un material biodegradable y biocompatible. Debido a sus propiedades mecánicas y físicas, como la formación de fibras con una elevada fuerza tensil (0.5 GPa a una elongación del 15 %) (Kundu et al., 2014), baja elasticidad y extensibilidad, su resistencia al ataque por químicos y microorganismos (Mottaghitalab et al., 2015; Vepari & Kaplan, 2007) y la capacidad de procesar la fibroína de la seda para obtener una amplia variedad de estructuras, esta proteína es un biomaterial prometedor para la investigación biomédica y la terapia (Bhardwaj & Kundu, 2011; Jastrzebska et al., 2015; Kundu et al., 2014; Mottaghitalab et al., 2015).

En el capullo del gusano de la seda se encuentran dos proteínas de fibroína, ambas monocatenarias: una ligera de unos 26 KDa y una pesada de unos 390 KDa. Se encuentra, además, una glicoproteína llamada P25, y un conjunto de proteínas que reciben el nombre de sericinas. Las cadenas ligera y pesada de la fibroína se unen por un puente disulfuro y forman una fibra de fibroína a la que se une la proteína P25, a través de interacciones hidrofóbicas, y las sericinas. Las fibroínas presentan una estructura interna que contiene grandes secuencias repetidas a lo largo de la cadena que están flanqueadas por dominios terminales cortos, tanto en el extremo amino como en el carboxilo. La estructura repetida está compuesta por una secuencia de seis aminoácidos (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n.

La fibroína que obtenemos tras el desgomado, proceso de eliminación de las sericinas, presenta regiones ricas en alanina, responsables del auto-ensamblado de las estructuras obtenidas y de las propiedades mecánicas y de la estabilidad de la fibroína de la seda (Jastrzebska et al., 2015; Kundu et al., 2014; Mottaghitalab et al., 2015; Vepari & Kaplan, 2007; Zhao et al., 2015).

La mayoría de las características físicas y químicas de la fibroína se derivan de su estructura cristalina, que consiste en una lámina β asimétrica. Los grupos hidrógeno de la glicina se disponen en un lado de la cadena, mientras que en el otro lado de la cadena se disponen los grupos metilo de las cadenas laterales de la alanina. De esta forma aparecen dominios hidrofóbicos. Se establecen enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals entre los hidrógenos de una región de la cadena y el grupo metilo de otra región de la cadena (Mottaghitalab et al., 2015).

La fibroína de la seda presenta grupos amino libres de diferentes aminoácidos y residuos de tirosina en su estructura. Tanto los primeros como los segundos se pueden utilizar para conjugar fármacos, moléculas de interés para diagnóstico o ligandos para direccionamiento específico de los sistemas con aplicaciones biomédicas (Zhao et al., 2015). Con esta finalidad, se han preparado películas, hidrogeles, sistemas de recubrimiento, cápsulas y micro y nanopartículas (Jastrzebska et al., 2015; Niamsa, Srisuwan, Baimark, Phinyocheep, & Kittipoom, 2009). La compatibilidad de la fibroína de seda (Kundu et al., 2014), los cambios intrínsecos de la proteína debidos al cambio de pH y el punto isoeléctrico de la proteína que se encuentra en torno a 3.8 a 3.9 (Mottaghitlab et al., 2015), hacen que las nanopartículas de esta proteína se pueden usar como sistemas de liberación de fármacos.

La capacidad de la fibroína de interactuar con otras moléculas de carga opuesta depende de parámetros como la concentración de proteínas, la temperatura y el pH. Un aumento en los dos primeros produce una combinación más rápida, mientras que un descenso en el valor de pH tiene el efecto opuesto (Kundu et al., 2014; Vepari & Kaplan, 2007)

La fibroína de seda se utilizó por primera vez en el ambiente biomédico para hacer suturas en el tratamiento de heridas. Su excelente biocompatibilidad, el hecho de no producir reacciones inmunotóxicas, el hecho de que presente una limitada adhesión bacteriana y biodegradabilidad controlada, hacen de la fibroína de la seda un material ideal para las aplicaciones biomédicas (Kundu et al., 2014). Se ha utilizado para el desarrollo de nanoestructuras como vehículos de liberación de moléculas bioactivas, factores de crecimiento y estructuras más grandes como andamio sobre el que se consigue la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular, de modo que se consigue la regeneración tisular o de órganos. (Bhardwaj & Kundu, 2011; Kundu et al., 2014).

El grupo de investigación en el que se realiza este trabajo ha realizado una innovación importante en la preparación de las SFN. Tradicionalmente, se preparaban mediante diferentes técnicas como la desolvatación, el electrospray o bajo condiciones supercríticas. No obstante, el elevado valor del peso molecular y la naturaleza de la proteína hacían que la preparación de nanopartículas de fibroína de seda fuera difícil de controlar. Además, la elevada temperatura, la fuerza iónica, el cambio de pH y el estrés de cizalla aplicados en los procedimientos de obtención de las nanopartículas conducían a la autoagregación de la proteína (Zhao et al., 2015). Para conservar las SFN obtenidas, se liofilizaban y posteriormente se redisolvían en disolventes orgánicos, que presentan toxicidad y son extemadamente corrosivos (Lozano-Pérez et al., 2014). La innovación que aportó el grupo de investigación implicó la aplicación de ultrasonidos de alta potencia a una mezcla de fibroína de seda con líquidos iónicos para obtener nanopartículas de dicha proteína. Tras la sonicación, las SFN se recuperaban mediante desolvatación y los líquidos iónicos se recuperaban en condiciones de baja presión (Lozano-Pérez et al., 2014). Como resultado, se desarrolló una metodología “verde”

para la obtención de nanopartículas de fibroína de seda más simple que la tradicional y que permite obtener nanopartículas que no autoagregan en las condiciones de síntesis durante, al menos, un par de meses.

En cuanto al uso de SFN como sistemas de liberación de fármacos, un aspecto esencial es el estudio de la modificación de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas ocasionados por los cambios en el microambiente en el que se encuentran. El resultado más claro de estos cambios es la tendencia a agregar que presentan la fibroína de la seda en condiciones fisiológicas de fuerza iónica, pH, aumento de temperatura, etc. (Mottaghitlab et al., 2015; Wang et al., 2015). Esta tendencia puede deberse tanto a una variación en la conformación de la proteína como a un apantallamiento de las fuerzas electrostáticas repulsivas que se encuentran en la superficie de la misma (Wang et al., 2015). Para evitarlo, la fibroína puede ser modificada para evitar la rápida degradación que sufre en el organismo, controlar su degradación y conseguir un aumento de la liberación del fármaco que porta (Kundu et al., 2014).

La fibroína de la seda puede interactuar con otras biomoléculas a través de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas (Guziewicz, Massetti, Perez-Ramirez, & Kaplan, 2013; Wenk, Merkle, & Meinel, 2011). De modo que para intentar solventar el problema de la autoagregación de la seda se han desarrollado NC compuestos de fibroína y otros polímeros policatiónicos por medio de técnicas como la copolimerización, el ensamblaje o el electrospinning. Entre los policationes usados encontramos ejemplos como las polilisinas (Germershaus, Werner, Kutscher, & Meinel, 2014) o el CS. En este último caso encontramos diferentes nanoestructuras de fibroína de seda y el biopolímero (Jastrzebska et al., 2015; Kundu et al., 2014; Wang et al., 2015).

- Quitosano

La quitina es el segundo polisacárido natural más abundante tras la celulosa. Presenta amplia distribución, Algunos reservorios son el exoesqueleto de artrópodos, como cangrejos o langostas o el micelio de los hongos (Rinaudo, 2006; Silva, Mano, & Reis, 2017). Se estima que la producción anual del homopolisacárido en la naturaleza es del orden de 10 a 100 trillones de toneladas (Mushi, Kochumalayil, Cervin, Zhou, & Berglund, 2016).

La quitina es un polímero lineal en el que los monómeros de N-acetil-D-glucosamina están unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura I.2) (Kadokawa, 2016).

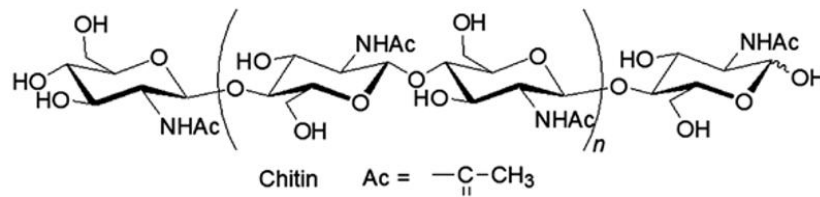


Figura I.2. Estructura de la quitina. Tomado de Kadokawa (2016).

La quitina es biocompatible, presenta actividad supresora de células tumorales y promueve la cicatrización (Silva et al., 2017). Presenta gran fuerza tensil, es la principal responsable de la dureza de los caparazones de los crustáceos en los que se encuentra en forma de nanofibrillas (Mushi, Butchosa, Salajkova, Zhou, & Berglund, 2014). Se pueden producir nanomateriales de quitina funcionalizados como por ejemplo matrices poliméricas o hidrogeles (Mushi et al., 2014), mediante simple enredamiento físico de las cadenas (Mushi et al., 2016). Sin embargo, el uso de la quitina para el desarrollo de sistemas es difícil debido a su baja solubilidad (Silva et al., 2017) en los disolventes tradicionalmente utilizados en los procedimientos industriales. Este hecho derivó en la necesidad de encontrar derivados que mantuvieran las propiedades “verdes” de la quitina y que simplificaran la manipulación y el procesamiento del polímero. En este contexto apareció el quitosano (CS), que se obtiene mediante la desacetilación de la quitina por medio de la hidrólisis (Leiva et al., 2015; Thakur & Thakur, 2014).

Quitosano es el nombre genérico que recibe una familia de polímeros policatiónicos en disolución acuosa derivados de la desacetilación de la quitina (Silva et al., 2017). Su estructura química consiste en la unión de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina mediante enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Figura I.3) (Chattopadhyay & Inamdar, 2010).

La desacetilación indicada puede ser total o parcial. Este parámetro, que se define como grado de acetilación (GA), es una de las principales características a tener en cuenta en la descripción del CS. Si la desacetilación es total (GA=0), el polímero obtenido recibe el nombre de quitano. En el caso en que la desacetilación no sea completa ($0 < \text{GA} < 1$), además de definir el grado de acetilación del polímero resultante, es importante el patrón de acetilación que presentan las cadenas, ya que si la desacetilación ocurre de forma homogénea a lo largo de la cadena de quitosano, su comportamiento será diferente a aquel caso en el que la desacetilación se concentre en una región de la cadena del polímero. En este último caso, tendremos cadenas de quitosano con regiones tipo quitano y regiones tipo quitina.

En función del grado de polimerización, el CS presenta un amplio rango de pesos moleculares (50-2000 KDa) y como consecuencia de viscosidades (Lee, Powers, & Baney, 2004). El grado y patrón de acetilación y el peso molecular del polímero resultante influye significativamente en las propiedades del mismo, por ejemplo en la solubilidad.

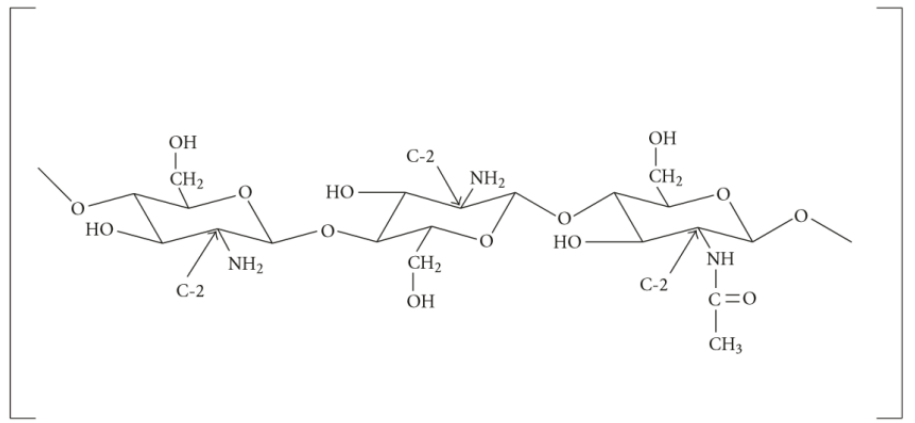


Figura I.3. Estructura del quitosano. Tomado de Chattopadhyay & Inamdar (2010).

El CS es soluble en medio acuoso ácido debido a la protonación de los grupos amino libres. Dicha protonación confiere al biopolímero su carácter de polielectrolito policationico (Leiva et al., 2015; Thakur & Thakur, 2014). En la literatura se ha referido extensamente el uso de disoluciones diluidas de ácido acético para conseguir la disolución del mismo (Delmar & Bianco-Peled, 2015; Lee et al., 2004).

La cadena de CS se ha descrito como un modelo de collar de perlas. Según el cual, la cadena estaría formada por unas unidades de longitud determinada. Teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico (pI) del CS se encuentra alrededor de 6.3 unidades de pH (Boucard et al., 2007; Paños, Acosta, & Heras, 2008). El polímero en disolución en un disolvente acuoso con un valor de $\text{pH} < \text{pI}$ tendría una conformación globular debido a que las unidades quedarían muy cerca unas de otras. Sin embargo, al descender el valor del pH de la disolución en la que estuviera inmerso, los grupos amino del polímero se protonarían y en las unidades de la cadena, descritas previamente como cuentas de un collar, aparecerían cargas electrostáticas que forzarían a las “cuentas” a separarse, como consecuencia, la cadena polimérica se estiraría y adquiriría conformación de cadena rígida (Boucard et al., 2007; Cölfen, Berth, & Dautzenberg, 2001; Kasaai, 2007) o semiflexible (Gartner & Lopez, 2010; Morris, Castile, Smith, Adams, & Harding, 2009).

Cuando el CS se encuentra disuelto en disolución acuosa a una concentración superior a la que se conoce como concentración crítica (c^*), las cadenas del polímero sufren un enredamiento físico, en el que no intervienen fuerzas internas de atracción entre cadenas, mediante el cual se forman geles (Chattopadhyay & Inamdar, 2010; Hwang & Shin, 2000). La disolución del biopolímero que presenta una $c > c^*$, se conoce como disolución diluida. En dichas condiciones, las moléculas de CS no están en contacto entre sí. La c^* varía en función de las características del medio, como fuerza iónica o pH y en función de las características del polímero, como grado de desacetilación o el de polimerización. De forma que el valor de c^* disminuye cuando aumenta el grado de polimerización de la cadena, disminuye el grado de desacetilación, aumenta el valor de pH o aumenta la fuerza iónica de la disolución (Boucard et al., 2007; Hwang & Shin,

2000). El comportamiento previamente descrito para el CS, también ha sido descrito para la quitina (Mushi et al., 2016).

El CS es un material muy versátil. Como tal presenta aplicaciones en la agricultura, en el sector de la tecnología de los alimentos, la nanobioingeniería, la biocatálisis, la limpieza de contaminantes en aguas y la medicina.

En el sector de la nanobioingeniería, el polielectrolito se utiliza para el desarrollo de nuevos materiales. Por ejemplo, la derivatización del biopolímero para obtener polímeros que muestren una mayor solubilidad en disolventes acuosos en condiciones en las que el polímero no es soluble (Fernández-Quiroz et al., 2015). Para ello, se derivatiza el CS por ejemplo con furanos (Montiel-Herrera et al., 2015) o con celulosa (Fernandes et al., 2009) para posteriormente, mediante la utilización de otras moléculas enlazantes, conseguir películas, andamios, nano o micropartículas o hidrogeles que pueden usarse en cosmética, oftalmología, medicina (Bhardwaj & Kundu, 2011; Molnár, Barbu, Lien, Górecki, & Tsibouklis, 2010) o para desarrollar nanosistemas portadores de moléculas odorosas o saborizantes (Xiao, Tian, Hu, Wang, & Zhou, 2014).

Los metales pesados pueden ser perjudiciales para el ser humano en concentraciones de ppb (Schwarz, Steinbach, Schwarz, Mende, & Boldt, 2016). Para eliminarlos del medio acuoso existen varias opciones, entre ellas la floculación y la coagulación de polielectrolitos ocasionada por la adsorción de los iones del medio (Lee et al., 2004; Raftery, Tierney, Curtin, Cryan, & O'Brien, 2015; Yang, Li, Huang, Yang, & Li, 2016). El carácter policationico del quitosano se puede utilizar para la captación de metales pesados, oxianiones, colorantes, ácidos orgánicos y pesticidas (Gérente, Andrés, McKay, & Le Cloirec, 2010; K.-S. Huang, Grumezescu, Chang, Yang, & Wang, 2014; Panos et al., 2008; Schwarz et al., 2016) uno de los problemas de usar el biopolímero en este sector es la insolubilidad del mismo en medio neutro o alcalino, por ello, se han preparado derivados de CS obtenidos mediante esterificación o aminación para conseguir mayor solubilidad a pH neutro (Yang et al., 2016).

El CS se puede utilizar para inmovilizar metales en su superficie, como el cobalto o el cobre y desarrollar así catalizadores (da Silva et al., 2008; Feng Jiao et al., 2011).

En la agricultura, el polielectrolito se usa para conseguir la protección de los cultivos frente a diferentes tipos de estrés biótico, o abiótico (Górnik, Grzesik, & Romanowska-Duda, 2008; Leiva et al., 2015; Plascencia-Jatomea, Viniegra, Olayo, Castillo-Ortega, & Shirai, 2003) como el estrés hídrico.

El *quorum-sensing* es el proceso de comunicación bacteriana basado en la síntesis de moléculas pequeñas que actúan induciendo el comportamiento colectivo, como la síntesis de factores de virulencia o de biofilms (Gupta et al., 2013). La resistencia a antibióticos que muestran algunas cepas bacterianas hace necesario el desarrollo de terapias alternativas para evitar el desarrollo de infecciones. Para evitar dichas

infecciones, se preparan nanocapsulas con base de CS para su uso como inhibidores del quorum-sensing bacteriano (Qin, Engwer, Desai, Vila-Sanjurjo, & Goycoolea, 2017). Además, se ha demostrado recientemente que el recubrimiento de nanodispositivos con CS permite que estos atraviesen mejor los biofilms bacterianos, y permite la liberación de las moléculas de interés en zonas próximas a las bacterias que causan las infecciones (d'Angelo et al., 2015). Dicha liberación es rápida en las horas iniciales del tratamiento. Sin embargo, la liberación se mantiene en el tiempo, por lo que la selección de cepas resistentes es poco probable (Piras et al., 2015).

Debido al tamaño de sus cadenas, el CS de bajo peso molecular se usa en el campo de la nanomedicina como sistema liberador de fármacos por ejemplo en el tratamiento de enfermedades pulmonares (Andrade et al., 2011) o en el tratamiento de diferentes tipos de tumores (Sanyakamdhorn, Agudelo, & Tajmir-Riahi, 2013). Como sistema liberador de ácidos nucleicos, el biopolímero ha mostrado éxito en la liberación de ADN, de ARN silenciador y también de microARN (Chatterjee, Sarkar, Jagajjani Rao, & Paria, 2014). Se ha postulado el uso del CS de bajo peso molecular (LMW) en el diseño de sistemas portadores de fármaco nanoparticulados capaces de penetrar la barrera hematoencefálica (Molnár et al., 2010). No obstante, no se ha documentado en la literatura la utilización del CS LMW como estabilizador de otros sistemas nanoparticulados de liberación.

La mayoría de las aplicaciones de nanoestructuras de CS que aparecen recogidas en la literatura han sido desarrolladas para la administración oral o nasal de moléculas terapéuticas y como sistemas de liberación de fármacos (Lee et al., 2004). El interés del uso del biopolímero en la liberación oral se basa en la capacidad del polielectrolito a resistir el ataque de la pepsina y las enzimas pancreáticas (Zhang, Zhai, Zhao, Ren, & Leng, 2015).

También se ha postulado en la literatura el uso de nanopartículas de CS como sistemas de detoxificación de drogas en el tratamiento de urgencias (Lee et al., 2004).

El CS está reconocido como un polímero generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés, Generally Recognized as Safe) por la administración federal de fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drugs Administration) (Jana, Maji, Nayak, Sen, & Basu, 2013) y se incluyó en el 2002 en la Farmacopea Europea (Paños et al., 2008). Este hecho junto con sus propiedades antifúngicas y antibacterianas (Raftery et al., 2015) hacen que este biopolímero presente un elevado interés en el desarrollo de nanoestructuras de liberación de fármacos.

- Nanoestructuras de quitosano

Los polisacáridos naturales, como el CS, alginato, dextrano, etc., se han utilizado para cubrir nanopartículas magnéticas y nanotubos de carbono. Los composites obtenidos han mostrado estabilidad coloidal en agua en un amplio rango de pH, así como en medios biológicos comúnmente usados (Wang et al., 2015).

Al igual que en el caso de otros sistemas nanoparticulados, el CS presenta diferente tasa de endocitosis en función del tamaño, la forma y la carga superficial (Mukhopadhyay, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu, 2015; Raftery et al., 2015).

El tamaño de la estructura, por otra parte, también afecta a la capacidad de carga de las partículas, la estabilidad de las mismas y la liberación del fármaco que portan. El carácter hidrofílico, en mayor o menor grado, determina el nivel de adsorción de los componentes de la sangre, tales como opsoninas. En estudios *in vitro* se ha visto que existe una relación entre la carga de las partículas y la opsonización. De forma que partículas neutras sufren menos opsonización que aquellas con carga superficial (Mottaghitlab et al., 2015).

El peso molecular del CS es un parámetro crítico. No solo afecta a la bioactividad y a la captación del CS, también a la morfología, la capacidad de encapsulación, la estabilidad y la toxicidad de las nanopartículas cubiertas del polisacárido (Zhang et al., 2015). El peso molecular del biopolímero presenta una relación directa con la capacidad de obtener nanodispositivos de liberación estables, y una relación inversa con la liberación de las moléculas que porta (Raftery et al., 2015).

Aunque se han depositado muchas expectativas en el uso del CS como liberador de fármacos, este polímero tiene una capacidad limitada para controlar la liberación de las moléculas suministrados por vía oral, debido a la rápida disolución del polímero en el estómago al ser expuesto a pH muy bajo (Jana et al., 2013). Para superar esas desventajas, el CS se mezcla con otros polímeros (Bhardwaj & Kundu, 2011) o se modifica químicamente (Jana et al., 2013). La modificación química del biopolímero, mediante enlaces covalentes entrecruzados entre cadenas poliméricas, es la práctica más directa para fabricar partículas esféricas. Sin embargo, la citotoxicidad de algunos compuestos usados en la modificación química del biopolímero como el glutaraldehído, ha limitado el uso del CS en aplicaciones biológicas (Huang et al., 2014). Es importante que los polímeros usados para modificar el CS no sean fácilmente degradados. Pero este último aspecto reduce las propiedades “verdes” del biopolímero y requieren más modificaciones químicas con otros polímeros biodegradables para retener las propiedades físico-químicas y las propiedades ambientales (Leiva et al., 2015).

El glicol-CS es un derivado del CS obtenido mediante la adición de moléculas de etilenglicol en la estructura del polímero. De esta forma, las cadenas de glicol-CS presentan en su superficie grupos amino y glicol, que al protonarse, en condiciones de disolución acuosa, aumentan el carácter liófilo del polímero, y como resultado se obtiene una mayor solubilidad del mismo. Dicho aumento de solubilidad, facilita el trabajo con el mismo y mejora las capacidades de estabilización del polímero. Por ello, se ha postulado como una buena alternativa para conseguir la estabilidad coloidal de nanopartículas inestables (Wang et al., 2015)

- Nanocomposites de oro y quitosano

Debido a su estructura, el CS es una alternativa para estabilizar oro (Vo et al., 2014). Existen dos alternativas para sintetizar nanocomposites de oro y quitosano. La primera consiste en la reducción del Au (III) de sales aúricas a Au (0) (Leiva et al., 2015). La segunda consiste en el empleo de nanopartículas del metal previamente estabilizado con citrato, por ejemplo (Madhusudhan et al., 2014). El mecanismo por el cual se obtienen las diversas estructuras entre el metal y el quitosano es complicado debido a que la naturaleza del polímero, el grado de polimerización y el GA, no permite la formación de estructuras a través de una estequiometría conocida (Leiva et al., 2015; Vo et al., 2014). La presencia de ácidos orgánicos, necesarios para incrementar la solubilidad del biopolímero, afecta al número de grupos amino libres en el polisacárido. Por tanto, afectará, de forma indirecta a la estabilización de las nanopartículas metálicas. La efectividad del ácido acético en la síntesis de nanoestructuras compuestas de CS y oro es mayor que el uso de otros ácidos orgánicos como el malónico o el oxálico (Di Carlo et al., 2012).

Factores como la concentración y el peso molecular del CS, la concentración de iones Au(III) (Pestov, Nazirov, Modin, Mironenko, & Bratskaya, 2015) y la sal en la que se hallan dichos iones, el pH (Vo et al., 2014), el número de grupos carboxílicos y el grado de disociación del ácido orgánico en el que se disuelve el CS (Di Carlo et al., 2012) permiten obtener nanopartículas de oro de diversas formas y tamaños.

Varios estudios han demostrado que la síntesis “verde”, poco contaminante, de nanopartículas de oro en solución con CS lleva aparejada la degradación de las cadenas del biopolímero (Pestov et al., 2015). Dicha degradación, que aumenta al incrementar la proporción de Au (III) en la suspensión, reduce la eficacia estabilizadora del CS. Como resultado, las nanopartículas de oro formadas por una ratio molar Au(III):CS por encima de 1:40 da como resultado estructuras más grandes, de forma irregular y la suspensión resultante muestra alta polidispersidad (Pestov et al., 2015).

Respecto a la estabilidad, mientras que los nanodispositivos obtenidos como resultado de la interacción del CS y las nanopartículas de oro precipitan en pocas semanas, las nanoestructuras obtenidas con el uso de un copolímero modificado, como el CS derivatizado con poli- ϵ -caprolactona y poli N-vinil-2-pirrolidona, permanecen estables durante al menos dos meses a temperatura ambiente (Leiva et al., 2015).

El CS y sus derivados se han utilizado para recubrir nanopartículas de oro y obtener nanocomposites (NC) de aplicación biomédica (Madhusudhan et al., 2014; N. Yang & Li, 2015). Prado-Gotor y su grupo publicaron en 2014 (Prado-Gotor, López-Pérez, Martín, Cabrera-Escribano, & Franconetti, 2014) el primer intento de analizar la encapsulación directa de nanopartículas de oro recubiertas con citrato (AuNP) con cadenas de CS de bajo peso molecular. Este grupo obtuvo nanocomposites en los que las AuNP se situaban en el interior de las nanoestructuras y el polisacárido se localizaba

en la superficie de las mismas. Así, la interacción entre ambos componentes era resultado de la interacción electrostática directa entre los iones citrato de las AuNP y los grupos amino del biopolímero. Aunque no es posible descartar que interacciones hidrofóbicas o por enlace de hidrógeno faciliten el proceso de interacción.

- Nanocomposites no metálicos con quitosano

Como se ha indicado previamente, el CS se utiliza para la estabilización de nanosistemas no metálicos de diversa naturaleza. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto del peso molecular del CS en la estabilización de nanopartículas de Se. De nuevo, la variación en el potencial Z de las estructuras condujo a la agregación de las mismas (Zhang et al., 2015).

Los complejos de polielectrolitos formados por CS y otros polianiones da lugar a estructuras versátiles, en el sentido de que las propiedades de los complejos se pueden modificar en función de la densidad de carga de los polímeros y del balance hidrofílico e hidrofóbico (Dragan, Mihai, & Schwarz, 2009).

En la literatura pueden encontrarse trabajos en los que se estudia el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos compuestos de CS y otros polianiones, tales como CS-ALG (Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008; Mukhopadhyay et al., 2015; Zhang, Wei, Lv, Wang, & Ma, 2011), CS-DS (Chaiyasan et al., 2013; Chen et al., 2003; Sarmiento et al., 2007; Schatz, Domard, et al., 2004) or CS-Poloxamer (Calvo, Remuñán-López, Vila-Jato, & Alonso, 1997). De forma general, esos sistemas mostraron un tamaño nanométrico, sin embargo, el potencial Z de las nanoestructuras obtenidas estaba en el rango desde -20 mV hasta +20 mV, considerado como rango de inestabilidad. Definiendo estabilidad como la capacidad de los nanocomposites de no auto-agregar. En agua, los nanocomposites compuestos de polielectrolitos con un potencial Z mayor de +20 mV o menor de -20 mV tienden a evitar la autoagregación de las estructuras debido a las fuerzas electrostáticas repulsivas que evitan el acercamiento de las nanoestructuras.

Un caso más complejo es el de las nanopartículas lipídicas sólidas recubiertas de CS. Estas se han preparado para la síntesis de NC para la liberación oral de insulina. Como resultado se obtuvieron nanodispositivos que presentaban propiedades mucoadhesivas y aumentaban el tiempo de retención de la insulina (Fonte, Nogueira, Gehm, Ferreira, & Sarmiento, 2011). Posteriormente, se demostró que si el CS se utilizaba para recubrir NC, la agregación de estos disminuía y la morfología mantenía una forma esférica con dimensiones homogéneas durante la incubación de estos en fluido gástrico simulado. Por tanto, las nanoestructuras formuladas se postulaban como sistemas de liberación de fármacos hidrofóbicos y de nutrientes por vía oral mejores que otras alternativas (Luo, Teng, Li, & Wang, 2015).

3. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es caracterizar los nanodispositivos de liberación de fármacos, en los que se emplee el CS de peso molecular medio como agente estabilizador, de forma que la presencia del biopolímero evite la agregación propia de las nanoestructuras estudiadas. Este objetivo se desarrolla y concreta en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar las propiedades del quitosano de peso molecular medio en disolución en función de la concentración del polímero, la fuerza iónica y el valor de pH de la disolución.
2. Diseñar y sintetizar nanocomposites compuestos de quitosano de peso molecular medio y nanopartículas de oro recubiertas con citrato. Estudiar la estabilidad de las nanoestructuras obtenidas a lo largo del tiempo. Comprobar el efecto de un incremento de fuerza iónica del medio en la estabilidad de las mismas. Encontrar una proporción óptima entre quitosano de peso molecular medio y nanopartículas de oro recubiertas de citrato para conseguir las nanoestructuras más pequeñas con el menor contenido en quitosano posible.
3. Diseñar y sintetizar nanocomposites compuestos de quitosano de peso molecular medio y fibroína de la seda del gusano de seda. Estudiar la estabilidad de las nanoestructuras obtenidas a lo largo del tiempo así como la estabilidad de las mismas en condiciones de elevada fuerza iónica del medio. Encontrar la proporción óptima entre quitosano de peso molecular medio y fibroína de la seda para obtener las nanoestructuras más pequeñas que presenten estabilidad en condiciones de elevada fuerza iónica. Diseñar y sintetizar nanocomposites compuestos de glicol quitosano y fibroína de seda que muestren no agregación en condiciones de elevada fuerza iónica del medio.
4. Diseñar y sintetizar nanoestructuras poliméricas complejas en las que el quitosano de peso molecular medio actúe como modulador del tamaño. Obtener nanoestructuras que no agreguen en disolución acuosa y analizar la efectividad de las mismas como liberadores de fármacos en condiciones *in vitro* utilizando la insulina como modelo de fármaco.
5. Estudiar la citotoxicidad del CS de peso molecular medio, de nanopartículas de oro recubiertas de citrato y de nanopartículas de fibroína de la seda usando cultivos celulares de células HeLa. Estudiar la citotoxicidad de las nanoestructuras desarrolladas con quitosano de peso molecular medio y nanopartículas de oro o nanopartículas de fibroína de seda sobre cultivos celulares de células HeLa.

Capítulo II : Materiales y métodos generales

Los materiales y métodos utilizados aparecen indicados y descritos en este capítulo. No obstante, para facilitar la lectura, la elaboración de las disoluciones y suspensiones de NC aparecen indicadas en cada capítulo. De forma que los detalles generales de los procesos aparecen indicados más abajo y los detalles más específicos aparecen en el capítulo en el que se aplican.

1. Materiales

El **ácido acético glacial** (capítulos II al VIII) fue adquirido de Panreac.

El **ácido láctico 90%** (capítulo VII) fue adquirido de VWR BDH Prolabo (Francia).

El **ácido hidroclicóric 37%** (capítulo VII) fue adquirido de Merck KGaA (Alemania).

La **albúmina de suero bovino** (BSA, por sus siglas del inglés, Bovine Serum Albumin) (A1933-25G) (capítulo VII) fue adquirida de Sigma Aldrich Chemie (Francia).

El **alginato de sodio** (ALG) (capítulo VII) procedente de algas pardas, presenta un ratio ácido manurónico/ácido gulorónico igual a 1.56 (Díaz Baños et al., 2014) (A2158). Dicho polisacárido presenta una viscosidad de 100-300 cP en disolución al 2% a 25 °C (datos del fabricante) se adquirió de Sigma-Aldrich.

El **cloruro de calcio** (capítulo VII) fue adquirido de Riedel-de-Haën (Alemania).

El **hidróxido de sodio** (capítulos II al VII) fue adquirido de Merck KGaA (Alemania).

La **insulina** humana recombinante 100IU/mL Actrapid[®] (capítulo VII) fue adquirida de Novo Nordisk A/S (Dinamarca).

Las **membranas de diálisis SnakeSkin[®]** de 10000 MWCO (de sus siglas en inglés Molecular Weight Cut off, límite de peso molecular filtrado) (membranas de celulosa regenerada) (capítulo VII) se adquirió de Thermo Fisher Scientific Inc., USA.

Las **membranas de diálisis Spectra/Por[®]** de 100000 MWCO para los ensayos de liberación (capítulo VII) fueron adquiridas de Biotech CE Tubing.

Los tubos con **membrana Vivaspin 20** de 100000 MWCO PES para la ultracentrifugación (capítulo VII) se adquirieron de Sartorius.

El **nitrate potásico** (KNO₃) (capítulos II al VIII) fue adquirido de Probus S.A.

La **poli(vinilpirrolidona) K 90** (PVP K90) (capítulo VII) se adquirió de Fluka (Suiza). PVP K90 es un polímero lineal aniónico que presenta estabilidad frente al pH. Es soluble en agua y en disolventes orgánicos. Su M_w es 360 KDa y su viscosidad 150 cP en disolución al 5% en agua a 25 °C.

El **poloxamer[®] 188** (Kolliphor 188) (capítulo VII) se adquirió de BASF (Alemania). Su estructura consiste en una región central hidrofóbica en la que se encuentra el óxido de propileno que está rodeado por dos partes hidrofílicas, constituídas por óxido de polietileno (PEO). El poloxamer[®] 188 presenta un M_w igual a 102 KDa.

El **Poli(etilenglicol) 4000** (PEG 4000) (capítulo VII) fue adquirido de Fischer Scientific (Reino Unido). Su viscosidad está en el rango de 114 a 142 cP en disolución al 50% en agua a 20°C. La riqueza de grupos hidroxilo es 25-32 mg KOH/g, su temperatura de fusión es 58-61 °C.

Los **sistemas de filtración** consistieron en el uso de papel de filtro Millipore #2 (capítulo VII), cuyo diámetro de poro es 0.7 μm , la filtración se hizo en vacío. Y en el uso de filtros acoplados a jeringa de diámetro de poro igual a 0.22 μm o 0.45 μm de diámetro (capítulos II al VII) que fueron adquiridos de Filter-lab[®].

El sal de **sulfato de dextrano** (DS, de sus siglas en inglés, Dextran sulfate) de *Leuconostoc* spp. de peso molecular igual a 5000 Da (capítulo VII) se adquirió de Fluka (Suiza). El DS es un polianión polisacárido que consiste en residuos de glucosa unidas por enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ en la cadena principal con ramificaciones mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$. El DS tiene 2.3 cargas negativas por monómero (Chen et al., 2003) e interactúa con el CS mediante interacciones electrostáticas (Chaiyasan et al., 2013; Schatz, Domard, et al., 2004)

Los medios de cultivo “mínimo de Eagle”, **MEM** (por sus siglas en inglés, Minimum Eagle’s Medium) (M4144) y “medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco”, **DMEM** (por sus siglas en inglés, Dulbecco’s modified Eagle’s medium) con un contenido alto en glucosa, 4500 mg/L, sin rojo fenol (D1145), la disolución de **glutamina** 200 mM (G7513-100ML), la disolución de **penicilina y estreptomicina** (P4333), la disolución de **aminoácidos no esenciales**, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, **MTT** (M5655), el **dimetil sulfóxido** (DMSO) (W387520), el isotiocianato de fluoresceína, **FITC** (F7250-50MG) y el dihidrocloruro de 2-(4-amidinofenil)-6-indolcarbamidina, **DAPI** (D4592) fueron adquiridos de Sigma-aldrich. El **suero fetal bovino** (FBS, por sus siglas en inglés, fetal bovine serum) (10500064) fue adquirido de Gibco (todos estos materiales se usaron en el capítulo VIII).

Las **células HeLa** (capítulo VIII), procedente de un carcinoma epitelial de cérvix humano (Figura II.1) se adquirieron de la Colección de Cultivos Tipo Europea (ECACC, por sus siglas en inglés: European Collection of Authenticated Cell Cultures; No. De catálogo: 93021013). Las **células MCF7** (capítulo VIII), procedentes de un adenocarcinoma de mama (Figura II.2) se adquirieron también de la ECACC (No. de catálogo: 86012803). Las células fueron manipuladas de acuerdo a la guía de buenas prácticas en cultivos celulares (Coecke et al., 2005).

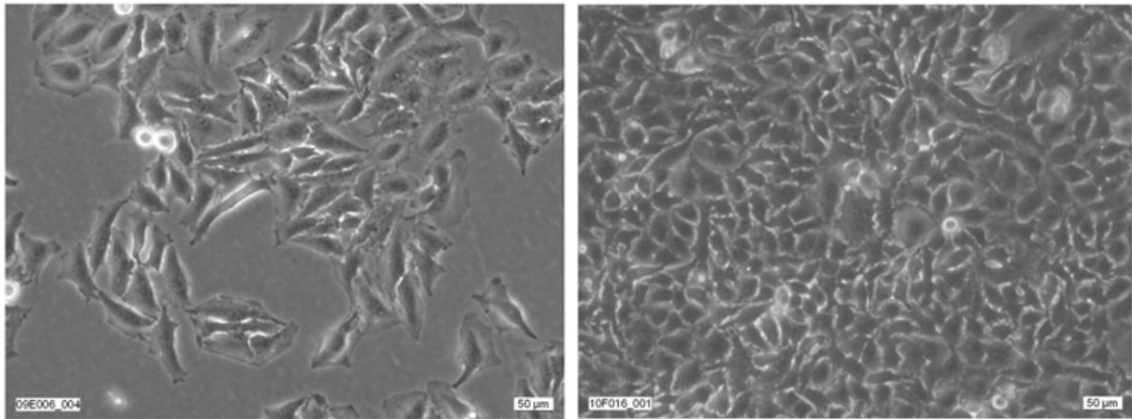


Figura II.1. Células HeLa, de la colección europea de cultivo de líneas celulares autenticadas (ECACC). La imagen de la izquierda corresponde a una situación tras un subcultivo. La imagen de la derecha corresponde al cultivo en estado confluyente.¹

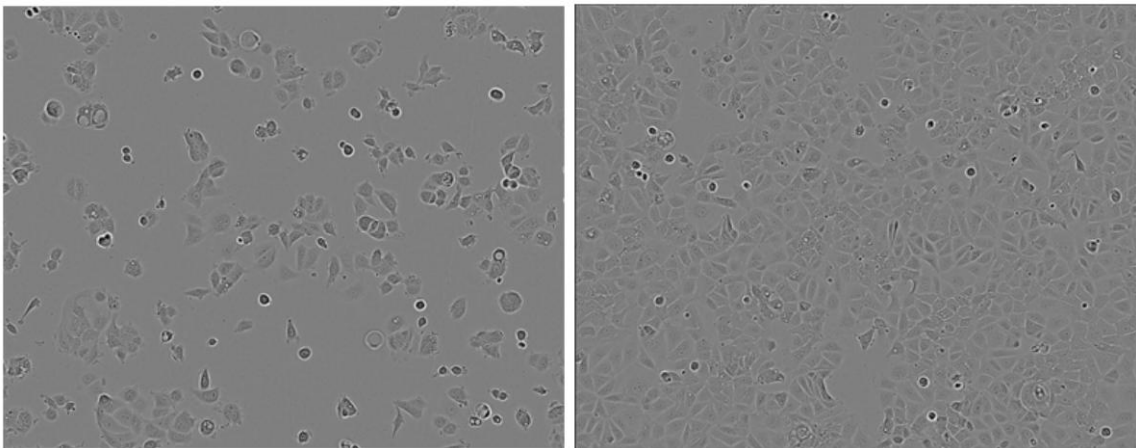


Figura II.2. Células MCF7 de la colección europea de cultivo de líneas celulares autenticadas (ECACC). La imagen de la izquierda corresponde a una situación tras un subcultivo. La imagen de la derecha corresponde al cultivo en estado confluyente.²

La **fibroína de la seda** (capítulos VI y VIII) fue cedida por el IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario).

Las **nanopartículas de oro** recubiertas con citrato (capítulos IV al VIII) se adquirieron de Ted Pella, Inc. (Redding, CA). La suspensión tenía una concentración de nanopartículas igual a 5.7×10^{12} partículas/mL (datos del fabricante). El diámetro hidrodinámico de las mismas era igual a 13 nm según las medidas realizadas en nuestro DLS y 10 nm según el fabricante.

¹<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/52178/93021013-hela-images.pdf>. Fecha de consulta: 22 Junio de 2017

²https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=ecacc_gc#medImg. Fecha de consulta: 22 Junio de 2017

El **quitosano de peso molecular medio** (448877-250G) (capítulos III al VIII) presentaba, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, un rango de peso molecular entre 190000 y 310000 Da, su viscosidad estaba en el rango entre 300 y 800 cP en disolución al 1% en ácido acético al 1% y 25 °C y su grado de desacetilación estaba en torno al 75% - 85%. El **quitosano de bajo peso molecular** (CS LMW) (448869-250G) (capítulo VII) con peso molecular en el rango entre 50000 a 190000 Da, tenía una viscosidad entre 20 y 300 cP en disolución al 1% en ácido acético al 1% y 25 °C y su grado de desacetilación estaba en torno al 80 % (según las especificaciones del fabricante). El **glicol quitosano** (G7753-1G) (capítulo VIII). Los tres fueron adquiridos de Sigma-Adrich Chemie (Francia).

2. Métodos

2.1. Preparación de disoluciones y suspensiones.

2.1.1. Disoluciones de quitosano.

Debido a las características del quitosano (ver capítulo I), obtener una disolución homogénea del polisacárido depende mucho de las características del disolvente. Dicho disolvente fue en todo caso agua mili Q acidificada con ácido acético, en un rango de pH 3-4. Tras adicionar el biopolímero, se registraba un incremento en el valor de pH que hacía necesaria la adición de ácido acético glacial para lograr la disolución del CS.

Se preparó una disolución inicial a concentración igual a 10^{-3} g/mL en medio acuoso ácido que se mantuvo en agitación durante 24 horas. Posteriormente, se filtró utilizando filtros de diámetro de poro igual a 0.45 μm y 0.22 μm y posteriormente se diluyó. Todas las disoluciones de quitosano se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización. La concentración final de cada disolución se indica en cada capítulo.

2.1.2. Suspensiones de nanopartículas de fibroína de seda.

La fibroína de la seda previamente liofilizada se disolvió en líquidos iónicos. Las nanopartículas de fibroína se obtuvieron tras la aplicación de ultrasonidos de alta potencia según el procedimiento descrito en Lozano-Pérez et al., 2015. La concentración de la suspensión inicial de fibroína fue igual a 10^{-4} g/mL. La sonicación consistió en la aplicación de ciclos de 15 segundos de sonicación y 15 segundos de descanso. La amplitud fue del 30% y el tiempo de sonicación total fue de 3 minutos. El sonicador empleado fue el modelo Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation. Dansbury, USA). Tras la sonicación, el tamaño de las nanopartículas de fibroína obtenidas se comprobó mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS). Estas mostraban un diámetro hidrodinámico estable durante aproximadamente 3 meses.

Pasado ese período de tiempo, se observaba agregación de las partículas de la suspensión.

2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS).

2.2.1. Principio físico

De acuerdo con los fundamentos de la física (Atkins, 1991; Bertrán Rusca & Núñez Delgado, 2002; Katime, 1994; Levine, 2004; Van Holde, 1979), la dispersión de luz es una técnica muy utilizada para llevar a cabo la caracterización de moléculas. Se basa en el estudio de las radiaciones originadas en las partículas de acuerdo con las leyes del electromagnetismo, según las cuales, un dipolo eléctrico oscilante induce la generación de una radiación electromagnética que se emite en todas las direcciones del espacio. La técnica de dispersión de luz se aplica para el estudio de gran variedad de sistemas, desde los más sencillos como partículas puntuales aisladas hasta los más complejos como macromoléculas.

Se denomina dispersión de Rayleigh a la producida por partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente, de manera que podemos considerar a la partícula como un emisor puntual. Así, como consecuencia de la interacción del componente eléctrico de un haz de radiación electromagnética con una molécula aislada, se forma un dipolo inducido oscilante. Dicho dipolo depende de la amplitud del campo eléctrico incidente y de la polarizabilidad de la molécula y genera la emisión de una radiación electromagnética en todas las direcciones del espacio de la misma frecuencia que el haz incidente, por lo que recibe el nombre de radiación elástica.

El valor del campo eléctrico que experimenta una partícula situada a una distancia x del emisor, se puede determinar mediante la ecuación

$$E_0 = E_A \operatorname{sen} \left[\frac{2\pi}{\lambda} (x - vt) \right] \quad (\text{II.1})$$

En esta ecuación v es la velocidad de propagación en el medio, t es el tiempo y E_A es la amplitud máxima de la radiación incidente. El dipolo inducido que se genera en la molécula será, por tanto,

$$\mu = \alpha E_0 = \alpha E_A \operatorname{sen} \left[\frac{2\pi}{\lambda} (x - vt) \right] \quad (\text{II.2})$$

De acuerdo con la Ecuación II.2, α es la polarizabilidad de la molécula e indica la facilidad con que se forma un dipolo en una molécula por la acción de un campo eléctrico.

El campo eléctrico emitido, E , a una distancia r del punto de emisión es inversamente proporcional a dicha distancia y al cuadrado de la velocidad de propagación. También

depende de la aceleración del dipolo creado, $\frac{\partial^2 \mu}{\partial t^2}$, y de la orientación del punto de medición respecto del punto de emisión, $\text{sen } \phi$, siendo ϕ el ángulo formado entre la línea que une el vector polarización de la partícula y el vector posición (Figura II.3).

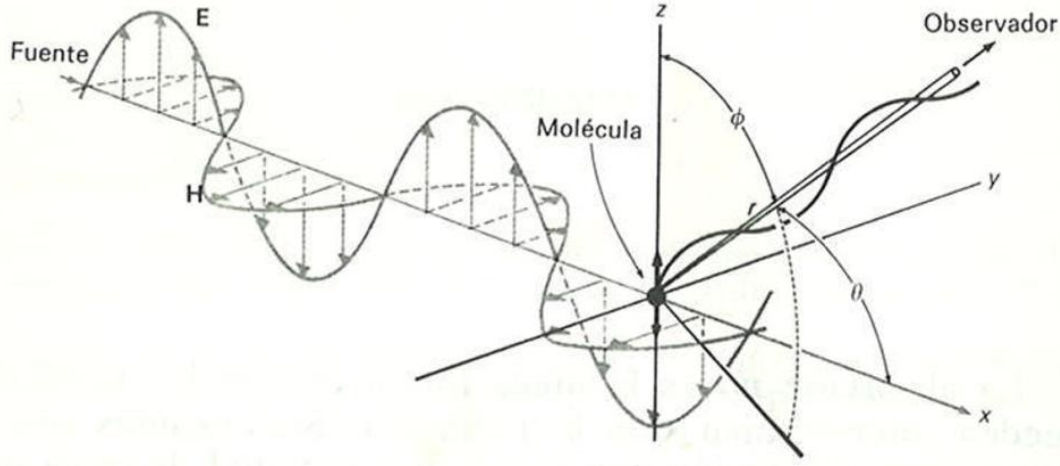


Figura II.3. Dispersión de luz por una molécula puntual. Se representa únicamente el componente eléctrico de la luz. Tomado de Van Holde (1979).

De esta forma, E se define según la ley de Hertz como

$$E = \frac{1}{v^2 r} \frac{\partial^2 \mu}{\partial t^2} \text{sen } \phi \quad (\text{II.3})$$

Haciendo las sustituciones adecuadas, la aceleración del dipolo queda definida como

$$\frac{\partial^2 \mu}{\partial t^2} = \alpha E_0 \left[\frac{2\pi v}{\lambda} \right]^2 \quad (\text{II.4})$$

y la amplitud del vector eléctrico emitido será entonces,

$$E = \frac{\alpha E_0}{v^2 r} \left(\frac{2\pi v}{\lambda} \right)^2 \text{sen } \phi \quad (\text{II.5})$$

Teniendo en cuenta que las intensidades de las radiaciones incidentes (I_0) y emitidas (I) están relacionadas con sus correspondientes campos eléctricos según

$$I_0 = Cte E_0^2 \quad (\text{II.6})$$

$$I = Cte E^2 \quad (\text{II.7})$$

Conseguimos llegar a una expresión que nos permite determinar la intensidad del rayo de luz difundido por una partícula puntual a una distancia r y a un ángulo ϕ .

$$I = \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \frac{I_0}{r^2} \alpha^2 \text{sen}^2 \phi \quad (\text{II.8})$$

Para expresar la intensidad de la luz difundida de forma que sea independiente de las condiciones experimentales tales como la longitud de onda de la luz incidente o la distancia al emisor, se define la razón o la relación de Rayleigh, R , mediante la siguiente ecuación

$$R = \frac{Ir^2}{I_0} \quad (\text{II.9})$$

Por tanto

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 \sin^2 \phi \quad (\text{II.10})$$

Es decir, R depende de la longitud de onda de la luz, de las características de la molécula a través de su polarizabilidad y del ángulo de observación.

El ángulo de observación considerado hasta ahora es el formado entre los vectores polarización y posición. Sin embargo, en los dispositivos experimentales y para simplificar los cálculos, el ángulo de observación se define como el ángulo formado entre la línea que forma el haz incidente que continúa después de atravesar la molécula y la línea formada entre el punto de observación y el centro emisor (Figura II.3). Este ángulo se denomina θ .

Si la luz incidente está polarizada verticalmente, es decir es perpendicular al plano formado entre el haz incidente y el haz esparcido. El ángulo ϕ que corresponde a cualquier valor del ángulo θ es $\phi = \pi/2$ y, por tanto, el $\sin \phi = 1$. La intensidad difundida, I , debe ser máxima en los puntos situados en el plano xy y nula en la dirección del eje z , perpendicular a dicho plano.

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 \quad (\text{II.11})$$

Por el contrario, si la luz incidente está polarizada horizontalmente, estará incluida en el plano formado entre el haz incidente y el haz esparcido, los ángulos ϕ y θ son complementarios, por lo que el $\sin \phi = \cos \theta$.

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 \cos^2 \theta \quad (\text{II.12})$$

Por último, en el caso de que la luz no esté polarizada, la contribución debida al efecto del ángulo formado entre el punto de observación y el punto emisor es la media entre los dos posibles polarizaciones independientes, de modo que la relación de Rayleigh queda de la siguiente forma

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \quad (\text{II.13})$$

Según la Ecuación II.13, la intensidad de la dispersión por una partícula puntual aislada varía con la dirección de observación y es simétrica respecto del ángulo $\theta = 90^\circ$, siendo mínima en la dirección perpendicular ($\theta = 90^\circ$) y máxima en la dirección del rayo incidente, tanto hacia adelante ($\theta = 0^\circ$) como hacia atrás ($\theta = 180^\circ$).

La relación de Rayleigh así definida explica la dispersión de la luz debida a una única partícula aislada. Ahora bien, si la partícula emisora no está aislada o pertenece a un medio material, habrá que estudiar las interacciones entre las distintas intensidades emitidas por cada centro emisor. En el caso de que el sistema sea un gas ideal o una disolución diluida ideal, las partículas se comportan como centros emisores independientes ya que se puede asumir que la distancia que las separa es suficientemente grande comparada con la longitud de onda de la luz dando lugar a una adición incoherente de sus intensidades de dispersión individuales, y por tanto la R total es igual a la suma de las R independientes.

$$R_{total} = \sum_i R_i \quad (\text{II.14})$$

En estas condiciones, si todas las N partículas del soluto de una disolución son de la misma naturaleza, el incremento de la dispersión de Rayleigh, ΔR , de dicha disolución diluida ideal sobre la del disolvente puro se puede escribir

$$\Delta R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 N \alpha^2 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \quad (\text{II.15})$$

En esta ecuación N es el número de moléculas de soluto que se puede expresar en términos de la concentración, c (por ejemplo, en g/unidad de volumen), el peso molecular de estas moléculas, M , y el número de Avogadro, \mathcal{N}_A , (el número de moléculas de soluto que pesan M g)

$$N = \frac{c \mathcal{N}_A}{M} \quad (\text{II.16})$$

En la ecuación II.15, la polarizabilidad, α , por unidad de volumen, se puede expresar como

$$\alpha = \frac{n^2 - n_0^2}{4\pi N} = \frac{2n_0 c}{4\pi N} \frac{\partial n}{\partial c} = \frac{2n_0 M}{4\pi \mathcal{N}_A} \frac{\partial n}{\partial c} \quad (\text{II.17})$$

En esta ecuación n y n_0 son, respectivamente, los índices de refracción de la disolución y el disolvente. Para encontrar el incremento de susceptibilidad eléctrica $\Delta \epsilon (= N\alpha)$ se ha utilizado la relación

$$4\pi\varepsilon = n^2 - 1 \quad (\text{II.18})$$

Y se ha expandido n al primer orden en la concentración

$$n = n_0 + c \frac{\partial n}{\partial c} \quad (\text{II.19})$$

Con todo ello, podemos escribir la Ecuación II.15 en su forma más habitual

$$\frac{Kc}{\Delta R} (1 + \cos^2 \theta) = \frac{1}{M} \quad (\text{II.20})$$

En esta expresión K es una constante dependiente del sistema de medida dada por

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (\text{II.21})$$

Esta forma de obtener la Ecuación II.20 tiene la ventaja de que es sencilla de entender, pero tiene como limitación que no se puede aplicar a sistemas complejos, y los sistemas reales suelen serlo. Un tratamiento más completo y satisfactorio se debe basar en la teoría termodinámica de fluctuaciones de *Smoluchowski, Einstein, Raman* y *Ramanathan y Debye*, desarrollada en la primera mitad del siglo XX, y cuyos resultados coinciden con los anteriores en el límite de disoluciones diluidas. La descripción resumida del procedimiento se puede encontrar en el capítulo 2.4.1 del libro “*Scattering*” (Pike & Sabatier, 2002) y, de forma detallada, en las referencias que este contiene. Aquí solamente mencionaremos los resultados más significativos que permitan seguir de forma coherente el desarrollo de este tratamiento.

En una mezcla binaria simple hay tres variables termodinámicas independientes que describen, respectivamente, fluctuaciones de densidad isoentrópicas e isobáricas y fluctuaciones de concentración. Para describir el sistema completo, por supuesto, son necesarias otras variables que describan la orientación de las fluctuaciones y otros grados de libertad, pero no serán relevantes para nuestro desarrollo.

Se puede estudiar la fluctuación general de la susceptibilidad dieléctrica local como un problema de dispersión en termodinámica estadística. Así, se encontró que la fluctuación cuadrática media de la susceptibilidad eléctrica, por unidad de volumen, $\langle(\Delta\varepsilon)^2\rangle$ debido a una variable termodinámica independiente, A , viene dada por

$$\langle(\Delta\varepsilon)^2\rangle = \left(\frac{\partial^2 \varepsilon}{\partial A^2} \right)_{B,C,\dots} \langle(\Delta A)^2\rangle \quad (\text{II.22})$$

En esta ecuación B, C, \dots son el resto de variables independientes y

$$\langle(\Delta A)^2\rangle = \frac{-k}{\left(\frac{\partial^2 S}{\partial A^2}\right)_{B,C,\dots}} \quad (\text{II.23})$$

Con todo ello, como resultado se llega a que la dispersión de Rayleigh, R , para una disolución se puede expresar como

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left[\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial c}\right)_{S,P}^2 \langle(\Delta c)^2\rangle + \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial P}\right)_{c,S}^2 \langle(\Delta P)^2\rangle + \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial S}\right)_{c,P}^2 \langle(\Delta S)^2\rangle \right] \quad (\text{II.24})$$

Las fluctuaciones termodinámicas de la presión y de la entropía de la disolución dispersarán luz. En las disoluciones diluidas estas fluctuaciones se podrán considerar como independientes de aquellas del soluto y se pueden sustraer de la dispersión total. Así, se puede considerar sólo el primer término, que da el incremento de dispersión de Rayleigh debido a las fluctuaciones de concentración del soluto. Si además tenemos en cuenta que utilizamos luz no polarizada, podemos escribir

$$R = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left[\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial c}\right)_{S,P}^2 \langle(\Delta c)^2\rangle \right] \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \quad (\text{II.25})$$

Para desarrollar esta ecuación debemos desarrollar los dos factores que aparecen dentro del corchete. La variación de la susceptibilidad eléctrica con la concentración (primer factor) se puede obtener sabiendo que la variación de la susceptibilidad eléctrica es igual a $N\alpha$, por lo que podemos escribir

$$\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial c}\right)_{S,P}^2 = N^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial c}\right)_{S,P}^2 \quad (\text{II.26})$$

Haciendo ahora uso de la ecuación II.17 para definir la polarizabilidad α por unidad de volumen

$$\left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial c}\right)_{S,P}^2 = \left(\frac{2n_0}{4\pi}\right)^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (\text{II.27})$$

Por otro lado, el promedio cuadrático de la fluctuación de la concentración de soluto (el segundo factor del corchete de la Ecuación II.25) de acuerdo con la Ecuación II.23 se puede escribir como

$$\langle(\Delta c)^2\rangle = \frac{-k}{\left(\frac{\partial^2 S}{\partial c^2}\right)} \quad (\text{II.28})$$

Para obtener el valor de $\langle(\Delta c)^2\rangle$ podemos decir que la fluctuación en la concentración se debe a la fluctuación en el volumen y

$$\frac{\langle(\Delta c)^2\rangle}{c^2} = \frac{\langle(\Delta V)^2\rangle}{V^2} \quad (\text{II.29})$$

Por lo tanto

$$\langle(\Delta c)^2\rangle = \left(\frac{c}{V}\right)^2 \langle(\Delta V)^2\rangle \quad (\text{II.30})$$

Teniendo en cuenta la Ecuación II.23, podemos escribir

$$\langle(\Delta V)^2\rangle = \frac{-k}{\left(\frac{\partial^2 S}{\partial V^2}\right)_T} = \frac{-k}{\frac{\partial}{\partial V} \left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T} = \frac{-k}{\frac{\partial}{\partial V} \left(\frac{P}{T}\right)_T} = \frac{-k}{\frac{1}{T} \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_T} \quad (\text{II.31})$$

La presión que aparece en el denominador vendría dada por la ecuación de *Clapeyron* de los gases ideales ($PV = \mathcal{N}kT$) si éste fuese el sistema que estamos tratando. Como estamos tratando con disoluciones diluidas podemos sustituir P por la presión osmótica, π , y utilizar la ley de *Vant'Hoff*, $\pi V = \mathcal{N}kT$. Aquí V se refiere al volumen de disolución, y \mathcal{N} al número de moléculas del soluto.

Así, si sustituimos en las Ecuaciones 30 y 31 tenemos

$$\langle(\Delta c)^2\rangle = \frac{kc^2}{V^2 \left(\frac{\partial^2 S}{\partial V^2}\right)_T} = \frac{kTc^2}{V^2 \left(\frac{\partial \pi}{\partial V}\right)_T} \quad (\text{II.32})$$

Esta ecuación nos llevaría a que en una disolución ideal

$$\langle(\Delta c)^2\rangle = \frac{-c^2}{N} = \frac{Mc}{\mathcal{N}_A} \quad (\text{II.33})$$

Y por tanto

$$\frac{Kc}{\Delta R} (1 + \cos^2 \theta) = \frac{1}{M} \quad (\text{II.34})$$

Que es idéntica a la Ecuación II.20

Para disoluciones de concentración más alta, hay que introducir correcciones a la compresibilidad osmótica similares a la expansión virial para los gases no ideales, por lo que en la ecuación anterior se debe utilizar

$$\pi V = \mathcal{N}kT \left(1 + A_2 \frac{\mathcal{N}}{V} + A_3 \left(\frac{\mathcal{N}}{V}\right)^2 + \dots \right) \quad (\text{II.35})$$

Utilizando las ecuaciones anteriores podemos escribir

$$\langle(\Delta c)^2\rangle = \langle(\Delta c)^2\rangle_{ideal} \left(1 + 2A_2 \frac{N}{V} + \dots\right)^{-1} = \frac{Mc}{\mathcal{N}_A} (1 + 2A_2 c + \dots)^{-1} \quad (\text{II.36})$$

Si utilizamos las Ecuaciones II.27 y II.36, podemos reescribir la Ecuación II.25 como

$$\Delta R = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \frac{Mc}{\mathcal{N}_A} (1 + 2A_2 c + \dots)^{-1} c \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \quad (\text{II.37})$$

O utilizando la Ecuación II.21

$$\frac{Kc}{\Delta R} (1 + \cos^2 \theta) = \frac{1}{M} (1 + 2A_2 c + \dots) \quad (\text{II.38})$$

Si las disoluciones reales son suficientemente diluidas, sólo es necesario utilizar el segundo coeficiente del virial en la Ecuación II.38. En este caso describiría un comportamiento lineal entre el término de la izquierda y la c , lo que permitiría obtener el valor del peso molecular y de A_2 de forma sencilla.

En el caso de que la disolución esté formada por un soluto polidisperso, cada componente i del sistema contribuye con sus correspondientes c_i y M_i . De modo que la relación Rayleigh total será

$$\Delta R = K(1 + \cos^2 \theta) \sum_i \frac{c_i M_i}{1 + 2A_{2i} M_i c_i + \dots} \quad (\text{II.39})$$

Escribiéndola de otra forma

$$\frac{Kc(1 + \cos^2 \theta)}{\Delta R} = \left[\sum \frac{\left(\frac{c_i}{c}\right) M_i}{1 + 2A_{2i} M_i c_i + \dots} \right]^{-1} \quad (\text{II.40})$$

Teniendo en cuenta que $\frac{c_i}{c} = w_i$, siendo w_i la fracción en peso total del polímero cuyas cadenas tienen el peso molecular M_i y de acuerdo con la definición de peso molecular promedio en peso

$$M_w = \sum_i w_i M_i \quad (\text{II.41})$$

De modo que para disoluciones de concentración finita de un soluto polidisperso debemos incluir el peso molecular promedio en peso y la ecuación quedaría de la siguiente forma. Hemos sustituido A_{2i}, M_i, c_i por A_2, M_w, c

$$\frac{Kc}{\Delta R} (1 + \cos^2 \theta) = \frac{1}{M_w} (1 + 2A_2 M_w c + \dots) \quad (\text{II.42})$$

Todo lo visto hasta ahora corresponde a moléculas de un tamaño molecular pequeño en comparación de la longitud de onda de la radiación incidente.

El estudio de macromoléculas en las que el tamaño es comparable a la longitud de onda de la luz incidente se complica debido a la aparición de interferencias de los rayos emitidos desde distintos eslabones de una misma cadena macromolecular. Para estudiar la dispersión emitida por macromoléculas en disolución, se recurre a la *teoría de dispersión de luz de Rayleigh-Debye*.

Las interferencias que aparecen pueden ser constructivas o destructivas. Y dependen del ángulo de observación θ , en concreto a través de $(1 + \cos^2 \theta)$, como consecuencia de la contribución horizontal de la luz incidente. Considerando una cadena macromolecular y un haz de luz que incida en dos puntos alejados en la cadena, 1 y 2 (Figura II.4), se producirá la emisión de luz desde ambos puntos en todas las direcciones del espacio. Si consideramos la emisión en la dirección y sentido en que continúa el rayo incidente, no habrá diferencias en el camino recorrido por la luz, por lo que la interferencia será nula. No obstante, debido a la imposibilidad de colocar el receptor en esa posición, estudiaremos la colocación de dicho receptor en dos ángulos distintos, siendo estos ángulos suplementarios, θ y $(180 - \theta)$. El camino óptico que siguen los rayos dispersados hasta el receptor en posición θ (R_1, R_2) y los rayos dispersados hasta el receptor en posición $(180 - \theta)$ (R'_1, R'_2) es distinto. El hecho de que $R_1 + R'_1 > R_2 + R'_2$ indica que existe un desfase en las radiaciones y por tanto, la existencia de interferencias destructivas. El desfase y por tanto, las interferencias serán mayores cuanto mayor sea el ángulo de observación.

En el caso de que no existan interferencias en los rayos emitidos la molécula actuaría como un emisor puntual, y se cumple en el límite en que la concentración tiende a 0

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left[\frac{Kc(1 + \cos^2 \theta)}{\Delta R} \right] = \frac{1}{M_w} \quad (\text{II.43})$$

Es necesario tener en cuenta que en el análisis de dispersión dinámica de luz, trabajamos con una disolución diluida de partículas que se mueven siguiendo un movimiento aleatorio, característico del movimiento browniano. El láser incide en un pequeño volumen de la disolución y suponemos que no modifica el movimiento de las partículas. Podemos delimitar un cubículo imaginario en el que las moléculas entrarán y saldrán con mayor o menor rapidez en función de sus propias características como el tamaño o la forma y también en función de las características del sistema como por ejemplo la temperatura. El haz incide en el cubículo imaginario e induce la dispersión de luz llevado a cabo por las moléculas que se encuentran en el interior del mismo. Tal como se ha explicado previamente, dicha dispersión tendrá las características propias de la dispersión de Rayleigh. Si las medidas fueran puntuales, obtendríamos un espectro de Rayleigh. Sin embargo, debido a que se realiza la medida de la intensidad recibida por el receptor de forma continua en el tiempo, el resultado es una concatenación de

espectros de Rayleigh producidos por una partícula del sistema. Además, la intensidad recibida por el receptor variará en función de las interferencias entre distintos centros difusores presentes en la disolución, del número y del movimiento de los mismos, resultado del movimiento browniano. Como resultado, de la medida de la intensidad a lo largo del tiempo obtenemos una intensidad fluctuante (Figura II.5).

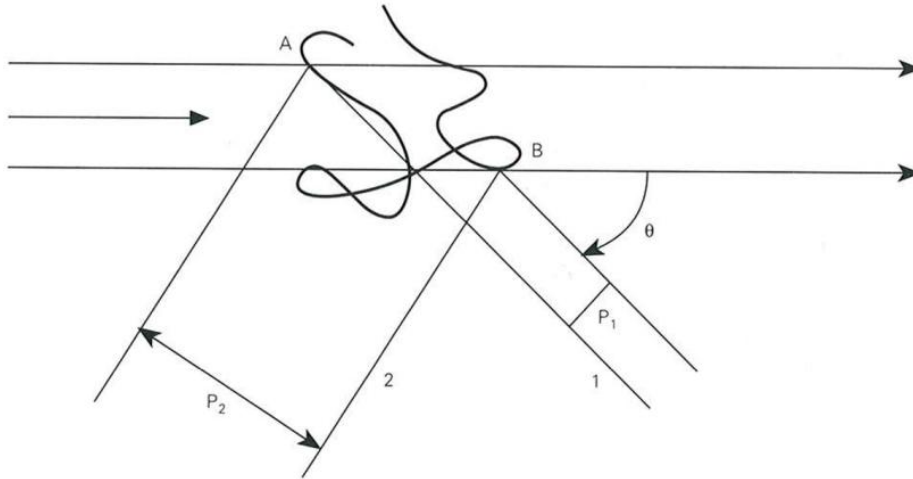


Figura II.4. Difusión producida por dos puntos de la cadena polimérica. Tomado de Issa Katime (1994).

La ecuación que describe la intensidad recibida en el receptor en un instante t es la siguiente

$$G_2(t) = 1 + b|C(t)|^2 \quad (\text{II.44})$$

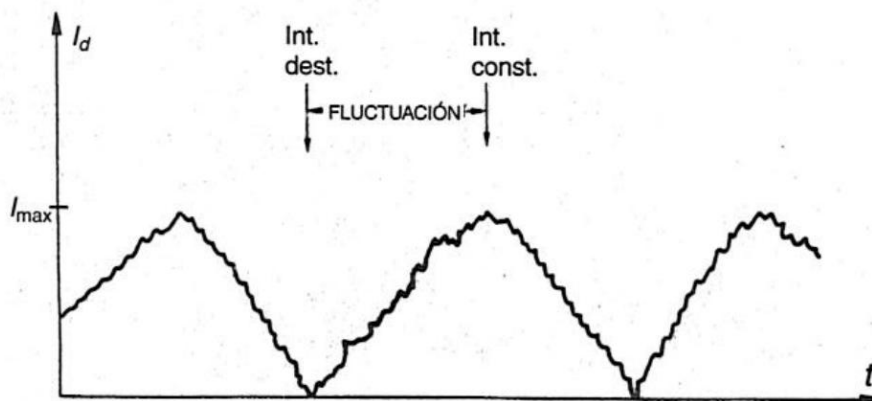


Figura II.5. Intensidad detectada por el detector en la dispersión dinámica de luz. Se señalan las interacciones destructivas (Int. dest.) y las constructivas (Int. const.). Tomado de Berrán Rusca y Nuñez Delgado (2002).

Si la función sigue una distribución monodispersa, la Ecuación II.44 puede reescribirse mediante la función de correlación siguiente

$$G_2(t) = C(t) = Ae^{-t/\tau} + B \quad (\text{II.45})$$

Mientras que si sigue una distribución polidispersa, la Ecuación II.44, la función de correlación se puede reescribir de la siguiente forma

$$G_2(t) = \sum A_i e^{-t/\tau_i} + B \quad (\text{II.46})$$

En el que los posibles valores que toma τ_i se obtienen mediante el ajuste Contin-Provencher.

Los parámetros A y B , que aparecen en las funciones de correlación expresadas en las Ecuaciones II.45 y II.46, se pueden expresar como

$$A = \langle I_s^2(t) \rangle - \langle I_s(t) \rangle^2 \quad (\text{II.47})$$

$$B = \langle I_s(t) \rangle^2 \quad (\text{II.48})$$

En las Ecuaciones II.45 y II.46 aparece τ , que se define como el tiempo de relajación, esto es el tiempo necesario para que la función de correlación tenga resultado nulo. Este parámetro es de gran importancia, ya que se puede establecer una relación entre τ y el coeficiente de difusión traslacional (D) a través de la expresión

$$D = \frac{1}{K'^2 \tau} \quad (\text{II.49})$$

En la esta ecuación, K' es la constante óptica del sistema. No obstante, las partículas o moléculas se describen a través de su tamaño en vez de por su coeficiente de difusión. Para ello, se asume que la partícula es esférica y a través de la relación *Stokes-Einstein* (II.50), será posible determinar el radio hidrodinámico, r_h , de las partículas presentes en el sistema.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{II.50})$$

Donde η es la viscosidad de la disolución.

2.2.2. Análisis experimental de la dispersión de luz.

Las medidas de dispersión dinámica de luz se realizaron en el dispositivo Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Ltd, UK). Dicho equipo está dotado de un láser He/Ne de 4 mW que emite a 633 nm, y permite la medida del diámetro hidrodinámico en un amplio rango de temperaturas, hasta los 120 °C. Las medidas de tamaño se realizaron mediante el análisis de la retrodispersión de luz, ya que el detector está situado a un ángulo de 173° respecto al rayo incidente. El software de Malvern calcula la distribución de tamaños a partir de la función de autocorrelación. El dispositivo Zetasizer Nano ZSP de Malvern mide la intensidad dispersada por las moléculas en una muestra a lo largo del tiempo. Asume la esfericidad de las partículas y

que las mismas presentan *movimiento browniano*, esto es que las partículas se mueven debido a la fuerza termodinámica del propio disolvente y que no existen procesos que puedan causar el movimiento de las partículas, como precipitación, coagulación, etc., relaciona la intensidad registrada por el detector a lo largo del tiempo con el tamaño de la partícula en movimiento.

Si consideramos que tenemos N_A moléculas en el seno de la muestra, al colocar un fotorreceptor capaz de detectar las radiaciones emitidas por las partículas de la muestra presentes en un volumen determinado, obtendremos un mapa de píxeles claros y oscuros (Figura II.6). El color de los píxeles del mapa se debe a la interferencia de las ondas emitidas desde distintos centros emisores. Así, si la interacción entre las ondas emitidas es de tipo destructivo, la señal recogida en el fotorreceptor será un píxel negro. En caso de que la interacción sea constructiva, la señal recogida será clara.

El mapa de píxeles claros y oscuros cambiará a lo largo del tiempo debido al movimiento de las partículas. El movimiento de las más pequeñas será más rápido porque presentan un mayor D y por la energía cinética que puedan poseer. En general, a igualdad de energía cinética, el movimiento será mayor cuanto menor sea la masa de la partícula, por lo que el patrón de píxeles cambiará más rápidamente (Figura II.7).

El equipo Zetasizer Nano registra medidas del mapa de píxeles claros y oscuros a lo largo del tiempo, de modo que se puede apreciar una fluctuación en el patrón del color de los píxeles. El equipo está dotado de un correlacionador digital que mide el grado de similitud entre dos mapas de píxeles registrados a lo largo del tiempo. La escala de tiempo del equipo Zetasizer Nano es pequeña, de modo que registra un patrón de píxeles a partir de los cuales hacer la correlación en el orden de nanosegundos (ns) a microsegundos (μ s). Y el tiempo máximo en el que la función de correlación alcanza un valor de 0 está en el rango de decenas de milisegundos.

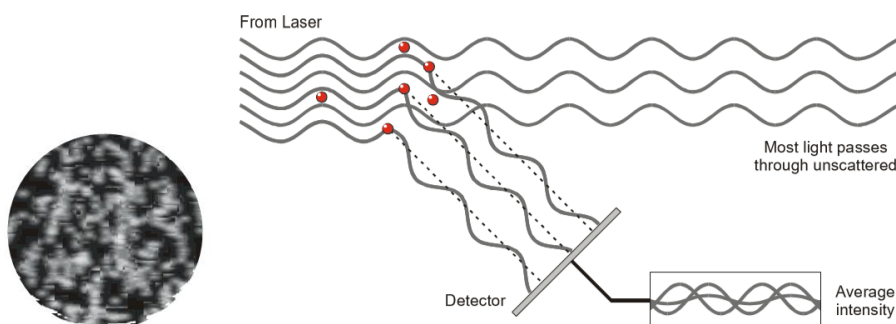


Figura II.6. Izquierda: Mapa de píxeles claros y oscuros detectados por el fotorreceptor del equipo Zetasizer Nano. Derecha: Esquema que representa las interacciones entre las radiaciones emitidas desde distintos centros emisores. Tomadas del Manual del usuario de Malvern.

El software de Zetasizer Nano utiliza la información de la función de correlación para determinar la distribución de radio hidrodinámico en función de la intensidad registrada por el detector. Adicionalmente y asumiendo que las partículas de la suspensión son esféricas, que presentan el mismo tamaño y densidad y que están homogéneamente

distribuidas, se puede determinar la distribución de radios hidrodinámicos en función del volumen de las partículas y en función del número de las mismas, a través de la Teoría de Mie. Es de suma importancia, tener en cuenta que esta teoría también asume que no existe error en la función de intensidad. No obstante, debido a la existencia de un error inherente a la medida del 10% al 15%, los resultados en volumen y en número solo pueden ser usados para estimar las poblaciones de partículas de forma orientativa y sólo las distribuciones en intensidad pueden ser consideradas para caracterizar las poblaciones en estudio.

Es habitual que haya una interpretación errónea de los resultados de DLS cuando tenemos muestras que no son perfectamente monodispersas. Para comprender la diferencia en las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas en el análisis, consideremos que tenemos el mismo número de partículas puntuales de diámetro hidrodinámico 5 nm y 50 nm. La distribución en intensidad, como ha sido expuesto previamente, se obtiene a través de la dispersión de Rayleigh. Según esta teoría la intensidad dispersada por un centro emisor es proporcional al cuadrado de su α (Ecuación II.18) y ésta, de acuerdo a la Ecuación II.19, depende de la masa, que, a su vez, depende de la potencia cúbica del radio de la partícula, por lo que finalmente, la intensidad dispersada por una partícula es proporcional a la potencia sexta de su radio (Ecuación (II.51)).

$$I \propto (r^3)^2 \quad (\text{II.51})$$

De modo que, definiendo I_p e I_g como las intensidades emitidas por la partícula pequeña y la grande, respectivamente y r_p y r_g sus radios respectivos, la relación de las intensidades se puede escribir como

$$\frac{I_p}{I_g} = \frac{r_p^6}{r_g^6} \quad (\text{II.52})$$

Y, sustituyendo los valores de radio hidrodinámico indicados más arriba en la Ecuación II.53, comprobamos que en la distribución en intensidad, el área bajo el pico de una partícula diez veces mayor que otra es 10^6 de veces mayor (Figura II.8). De otra forma, Si tenemos en la muestra partículas que presenten una diferencia de tamaño en un factor de 10, necesitaremos 10^6 de partículas de tamaño pequeño para que la señal de las dos poblaciones, en términos de intensidad, sea igual.

$$I_g = I_p 10^6 \quad (\text{II.53})$$

La distribución en volumen relaciona la I detectada con la potencia cúbica del radio de la partícula emisora, de modo que podemos expresar la relación entre intensidades como sigue

$$\frac{I_p}{I_g} = \frac{r_p^3}{r_g^3} \quad (\text{II.54})$$

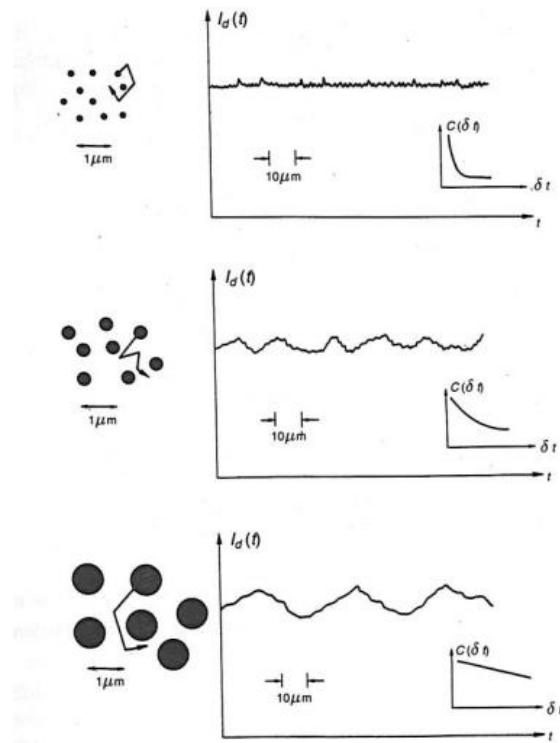


Figura II.7. Intensidad registrada por el detector del DLS en función del tiempo y del tamaño de la partícula. En el eje de ordenadas se representa la intensidad. En cada gráfico se incluye su correlograma. Tomado de Bertrán Rusca y Nuñez Delgado (2002).

Y, sustituyendo los valores indicados obtenemos la Ecuación II.55. La interpretación de la misma indica que el área bajo el pico de las partículas grandes es 1000 veces mayor que el área bajo el pico de las partículas pequeñas (Figura II.8). Dicho de otro modo, una partícula con radio diez veces más grande que otra, dispersa 1000 veces más que la segunda

$$I_g = I_p 10^3 \quad (\text{II.55})$$

Por último, la distribución en número indicará la presencia de dos picos correspondientes a cada uno de los tamaños de partícula indicados. De forma que el área bajo ambos picos es igual (Figura II.8).

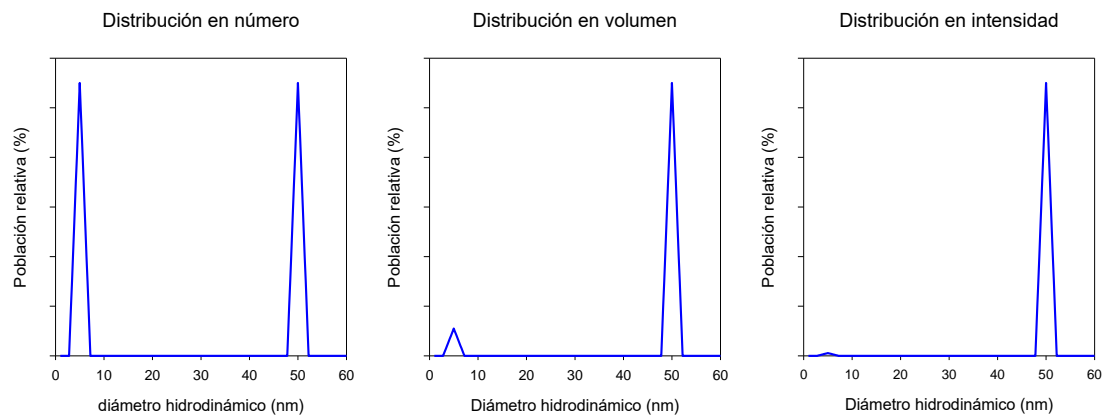


Figura II.8. Distribución de tamaño de partícula en función del número, volumen o la intensidad registrada en el detector.

2.3. Potencial Z.

El equipo, Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Ltd, UK), permite medir el potencial Z de las partículas en la suspensión.

La presencia de carga superficial en una partícula da como resultado el hecho de que los iones de carga opuesta presentes en el disolvente se dispongan formando una capa sobre la superficie de la partícula cargada (Figura II.9). Dicha capa recibe el nombre de *capa de stern* (*Stern layer*). A continuación de ella, aún quedan iones de carga opuesta a la carga superficial de la partícula que se ven atraídos por fuerzas electrostáticas y que forman una segunda capa alrededor de la partícula. Esta segunda capa está formada por iones unidos más débilmente a la partícula y recibe el nombre de *capa difusa* (*Diffuse layer*). Las dos capas descritas previamente componen la *doble capa eléctrica* (*Electrical double layer*) (Atkins, 1991).

Durante el movimiento, no todos los iones presentes en la doble capa eléctrica se mueven con la partícula. Existe una distancia descrita desde la superficie cargada de la partícula a partir de la cual los iones no son arrastrados con la partícula en movimiento, dicha distancia se denomina *plano de deslizamiento* (*Slipping plane*). La carga de ese plano, en mV, es lo que se conoce como *potencial Z* (*Zeta potential*) (Figura II.9).

La magnitud del potencial Z da una idea de la estabilidad de la partícula en un sistema coloidal. Si el potencial Z tiene un valor absoluto mayor de 20-30 mV, el sistema es estable en términos de no floculación o coagulación de las partículas de la suspensión, de acuerdo con la teoría DLVO. (Capítulo I). En caso de que el potencial Z presente un valor inferior a 20 mV en valor absoluto, las fuerzas electrostáticas de repulsión tienen un carácter más débil y, con frecuencia, no evitan el acercamiento de las partículas, debido a las fuerzas atractivas de Van der Waals, y su posterior agregación.

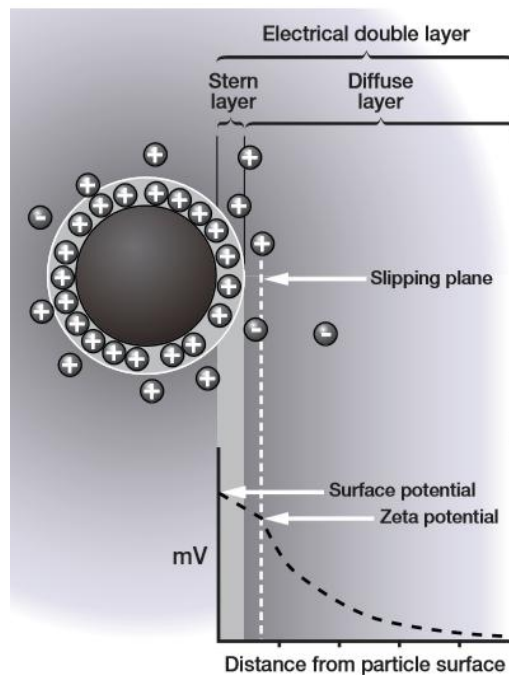


Figura II.9. Representación de la doble capa eléctrica y del potencial Z. Tomado del Manual de Usuario de Zetasizer Nano Series de Malvern.

Si imaginamos una partícula cargada positivamente (mostrará un potencial Z positivo), un aumento de cargas negativas en el medio dará lugar a un aumento de concentración y reorganización de las mismas en el entorno de la nanopartícula. De modo que el potencial Z de la nanoestructura disminuirá. Este proceso se puede producir por una variación del pH aunque es más notorio debido a la variación en la fuerza iónica, ya que la cantidad de iones es mayor y el tamaño y posiblemente la carga de los mismos, también. La medida del potencial Z permite determinar el apantallamiento, el punto isoeléctrico de las partículas que corresponde al valor de pH en el cual el potencial Z tiene un valor de 0 mV (Figura II.10) y la agregación de las partículas en la suspensión.

Para medir experimentalmente el potencial Z, una estrategia habitual es utilizar los efectos electrocinéticos que aparecen como consecuencia de la existencia de cargas superficiales en las partículas en suspensión. Entre ellos, la *electroforésis* se define como el movimiento de las partículas cargadas hacia el electrodo de carga opuesta respecto al fluido dispersante como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico.

En ese momento, aparecen fuerzas viscosas que se oponen al avance de las partículas. Cuando se alcanza el equilibrio entre ambos procesos, se alcanza una velocidad constante. Dicha velocidad se conoce como *movilidad electroforética* (U_E) y depende de la fuerza del campo eléctrico o del gradiente de potencial, de la constante dieléctrica del medio (ϵ), de la viscosidad del medio (η) y del potencial Z de la propia partícula (ζ). De modo que, conociendo la movilidad electroforética de las partículas de una suspensión, podemos determinar el potencial Z a través de la ley de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{II.56})$$

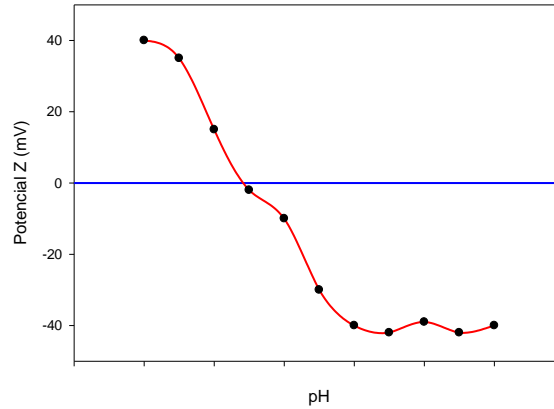


Figura II.10. Variación del potencial Z en función del cambio de pH del medio. El valor de pH al cual se obtiene un potencial Z igual a 0 mV se define como punto isoeléctrico.

En esta ecuación $f(ka)$ es la función de Henry. Esta función se aproxima a dos posibles valores. La aproximación de *Smoluchowski* aproxima a un valor de 1.5 y se aplica para el estudio del potencial Z de partículas en medio acuoso y/o con una concentración de electrolitos moderada, mayor de 10^{-3} M. La aproximación de Huckel aproxima $f(ka)$ a un valor de 1.0, y se usa en el caso del estudio de partículas dispersas en un medio no acuoso.

En este trabajo hemos utilizado el dispositivo Zetasizer Nano ZSP que para medir la movilidad electroforética de las partículas, utiliza la velocimetría mediante el efecto láser Doppler (LDV, del inglés Laser Doppler Velocimetry). Por el efecto doppler, una onda electromagnética de una frecuencia determinada, al incidir sobre un objeto o una partícula que se está moviendo a una determinada velocidad, es desviada con una frecuencia diferente a la frecuencia de la onda de partida (Durst, Melling, & Whitelaw, 1981). De modo que se puede relacionar el cambio en la frecuencia de la onda con la velocidad de la partícula. Para ello, el dispositivo combina la luz dispersada a un ángulo de 17° con la onda de referencia (Figura II.11). El dispositivo cuenta con un modulador óptico que permite obtener medidas muy precisas de la velocidad de partículas en movimiento.

Como resultado de la aplicación de un campo eléctrico, en la superficie de las celdas de medida aparece una carga superficial que altera el movimiento de las partículas bajo la acción de dicho campo eléctrico. Como resultado de la electroósmosis, las partículas de carga opuesta a la que aparece en las paredes de la celda, quedan inmóviles a pesar de la aplicación del campo eléctrico. De esta forma, la medida de la velocidad se realiza en la zona interna de la celda en la que el efecto electroforético es máximo y el efecto electroosmótico, es nulo. De modo que la velocidad electroforética es verdadera.

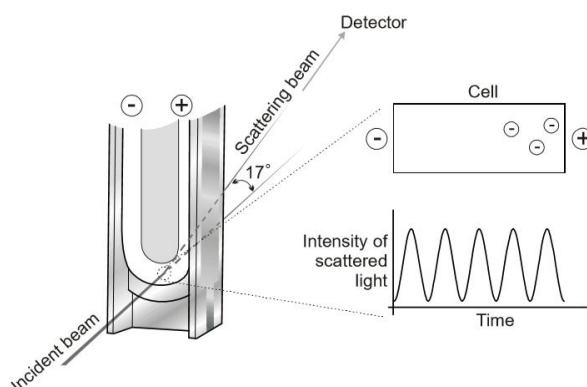


Figura II.11. Análisis de velocimetría mediante efecto láser Doppler en el dispositivo Zetasizer Nano ZSP. Tomado del manual de usuario de Malvern.

2.4. Espectrofotometría.

A menudo la energía absorbida por un electrón se emplea en favorecer una transición a un estado excitado. Sin embargo, la energía absorbida por un electrón puede destinarse a otros fines, ya que dentro de cada estado electrónico existen transiciones energéticas rotacionales, vibracionales, electrónicas de capa externa y electrónicas de capa interna. Cada átomo tiene un espectro de absorción característico que puede ser modificado por su entorno. Dicho espectro es muy útil en la identificación de átomos moléculas y procesos químicos y físicos que están teniendo lugar en el sistema. La Figura II.12 representa un diagrama del espectro electromagnético y los intervalos energéticos entre los que se producen los principales tipos de transiciones (Van Holde, 1979).

Desde un punto de vista experimental, la espectrofotometría tiene gran interés debido a la existencia de los *cromóforos*, moléculas capaces de absorber energía procedente de radiaciones de la zona visible o ultravioleta del espectro electromagnético. La longitud de onda en la que se registra el valor de absorbancia máximo es característico y se denota como λ_{max} . Además, para las medidas en disolución, la absorción de radiación electromagnética está definida mediante la ley de *Beer-Lambert*

$$I = I_0 e^{-\varepsilon' lc} = I_0 10^{-\varepsilon lc} \quad (\text{II.57})$$

Donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente, I en la intensidad de la radiación emitida a través de la celda de l cm de paso óptico y tiene una concentración c de partículas en moles/L, con un *coeficiente de extinción molar* (ε) medido en ($L/mol \cdot cm$). Definimos *absorbancia* (A) como

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (\text{II.58})$$

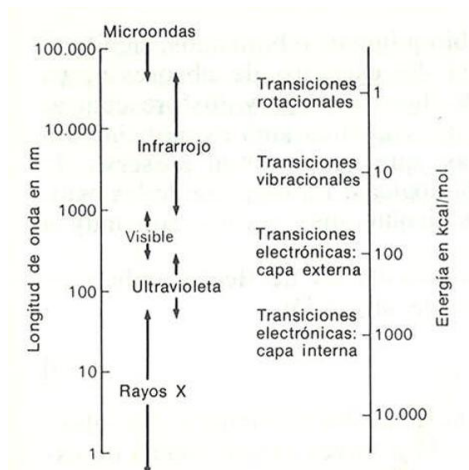


Figura II.12. Diagrama del espectro electromagnético (izquierda) y principales tipos de transiciones energéticas en un estado energético (derecha). Tomado de Van Holde (1979).

A partir de las ecuaciones II.57 y II.58 podemos definir la siguiente

$$A = \epsilon lc \quad (\text{II.59})$$

Para llevar a cabo medidas de absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible T92+ (PG Instruments,UK). En general, los espectrofotómetros cuentan con una fuente de luz monocromática, de forma que se pueda conocer la longitud de onda de la luz incidente y se pueda calcular la disminución de la intensidad de la luz al pasar a través de una celda de medida que presenta un espesor conocido. La Figura II.13 muestra un esquema de un espectrofotómetro de doble celda. En este dispositivo se medirán las dos celdas de forma simultánea. En una de las celdas se medirá la muestra mientras que en la otra se medirá el disolvente puro. De modo que la luz, pasa por un monocromador y se bifurca para pasar a través de las dos celdas en paralelo. Tras atravesar las celdas de medida, la luz llega a unos fotomultiplicadores. El software determina la diferencia en la intensidad de la radiación que alcanza los fotomultiplicadores y devuelve la información como valor de absorbancia a una determinada longitud de onda, o bien realiza un análisis en un rango de longitudes de onda y representa el *espectro de absorbancia*.

En esta memoria se presentan los espectros de absorbancia de las nanoestructuras en el rango de medida indicado en cada caso. Sin embargo, para llevar a cabo el análisis de los espectros, se extrapola una curva basal a partir de los datos de absorbancia del espectro que se encontraban fuera de la sombra del pico de absorbancia. Posteriormente, se calculó la diferencia entre el pico detectado y la curva base extrapolada. A continuación, el valor de longitud de onda de máxima absorbancia se determinó mediante dos procedimientos independientes. Por un lado se ajustó la curva a un pico gaussiano de 4 parámetros, mediante el uso del programa Sigmaplot 10.0 y por otro lado se realizó el cálculo de la media ponderada de los valores de absorbancia del pico.

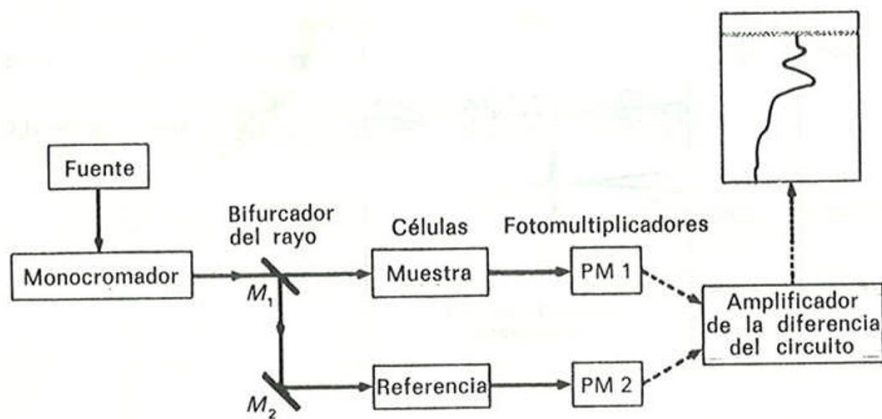


Figura II.13. Diagrama de funcionamiento de un espectrofotómetro de doble cubeta. Tomado de Van Holde (1979).

2.5. Microscopía

- Microscopía electrónica

En microscopía, la resolución, o poder de resolución, es la distancia más pequeña que pueden estar separados dos puntos y poder detectarlos como puntos separados. Se puede calcular mediante la expresión

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{\mu \sin \beta} \quad (\text{II.60})$$

Donde δ es la resolución, λ es la longitud de onda de luz, μ es el índice de refracción del medio y β es el semiángulo de llegada del haz a la lente (Williams & Carter, 2009). El denominador de la ecuación II.47 recibe el nombre de apertura numérica y se puede aproximar a la unidad, por lo que la resolución en microscopía óptica es aproximadamente la mitad de la longitud de onda utilizada. Esto implica que si utilizamos una longitud de onda de 550 nm, la resolución obtenida sería de 300 nm (Williams & Carter, 2009).

El principal interés en el desarrollo del microscopio electrónico radicaba en aumentar la resolución que se obtenía con la microscopía óptica. El descubrimiento del electrón y la hipótesis de *de Broglie*, según la cual los electrones al ser acelerados mostraban un comportamiento que podía explicarse como el comportamiento de una onda fue determinante para el desarrollo del microscopio electrónico. La longitud de onda de los electrones se podría calcular de acuerdo a la ecuación

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \quad (\text{II.61})$$

En la que h es la constante de Planck, p es el momento lineal de la partícula, m es la masa del electrón y v es la velocidad del mismo.

Busch construyó la primera lente magnética en 1926, con la que se conseguía centrar un haz de electrones en un foco. *Davissón y Thomson* recibieron el Nobel de física en 1937 por el descubrimiento de la difracción del electrón. Debido a la existencia de dicha difracción, era necesario acelerar más y condensar el haz de electrones originado para poder desarrollar el microscopio. Años más tarde, *Knoll y Ruska* construyeron el primer microscopio electrónico de lente magnética, utilizando una diferencia de potencial de 60 KV y obteniendo imágenes sobre una pantalla fluorescente. (Naik, 1975).

Cuando los electrones son acelerados bajo la influencia de una diferencia de potencial (V), la longitud de onda λ asociada a los electrones puede calcularse según

$$\lambda = -\frac{1.23}{\sqrt{V}} \quad (\text{II.62})$$

De forma que un electrón acelerado por la acción de una diferencia de potencial igual a 50 KV tiene una λ igual 0.0055 nm. Si sustituimos este valor en la Ecuación (II.60), la resolución obtenida será de 0.27 nm, mil veces mayor que la resolución obtenida con el microscopio de luz visible. Si aumentamos la aceleración de los electrones hasta 365 KV, podríamos llegar a obtener una resolución de 0.1 nm (Naik, 1975).

Por otro lado, cuando un haz de electrones interacciona con una muestra se producen una serie de emisiones secundarias (Figura II.14) que se pueden utilizar para obtener información acerca de la materia que se está analizando (Williams & Carter, 2009).

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La estructura de un microscopio electrónico de transmisión (Figura II.15) consiste en una columna larga, hueca en su interior, por la que se forzará el movimiento de los electrones. Para conseguir la aceleración de los mismos, se debe trabajar en condiciones de alto vacío, concretamente de 10^{-4} a 10^{-6} torr a 0°C . Una vez que se consigue el vacío en el interior de la columna, se conecta un filamento, a menudo de wolframio, que constituye la fuente de los electrones. La potencia aplicada oscila, comúnmente, entre 100 y 300 KV (Egerton, 2005; Naik, 1975). El haz de electrones atraviesa la columna y al llegar a la rejilla, los electrones pueden interaccionar con la muestra y ser desviados o atravesar la muestra y la rejilla y continuar su recorrido a través del tubo hueco (Egerton, 2005); hasta una pantalla fluorescente donde se obtiene imagen (Naik, 1975; Williams & Carter, 2009).

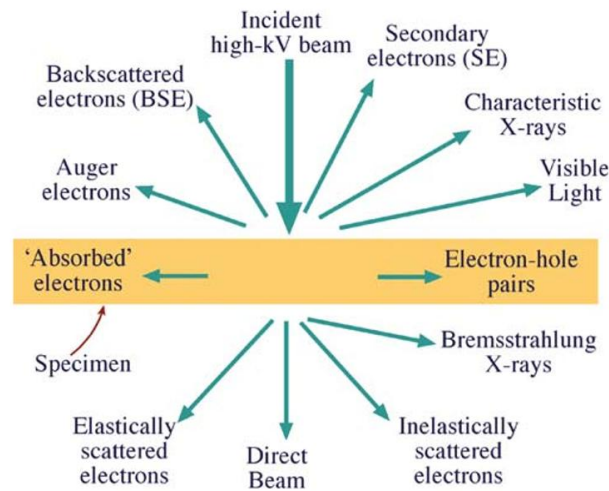


Figura II.14. Emisiones secundarias que aparecen tras la interacción de un haz de electrones con la materia. Tomado de Williams & Carter (2009).

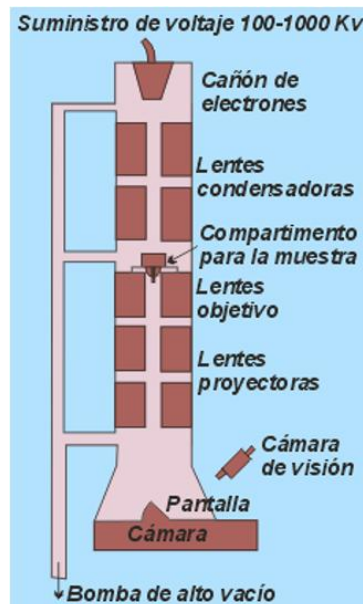


Figura II.15. Estructura de un microscopio electrónico de transmisión. Tomado de www2.uned.es/cristamine/mineral/métodos/tem.htm. Fecha de consulta: Junio de 2017.

- Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La estructura del microscopio electrónico de barrido (Figura II.16) ("Microscopía Electrónica de Barrido con detector EDS (SEM-EDS)") consiste en una columna más corta que la usada en TEM, hueca en el interior, en la que se trabaja en condiciones de vacío. En dichas condiciones, se genera una diferencia de potencial que fuerza el movimiento de los electrones desde un filamento de wolframio a lo largo de la columna. Se utilizan unas lentes magnéticas con las que se consigue desplazar el haz de electrones para conseguir un barrido de la superficie de la muestra. Cuando el haz interactúa con la muestra, se produce una emisión de electrones secundarios (Figura II.14) (Williams & Carter, 2009). Se utiliza un colector de electrones que capta la señal

de la radiación secundaria de interés y transforma la señal recibida en una imagen que puede verse en una pantalla (Naik, 1975)

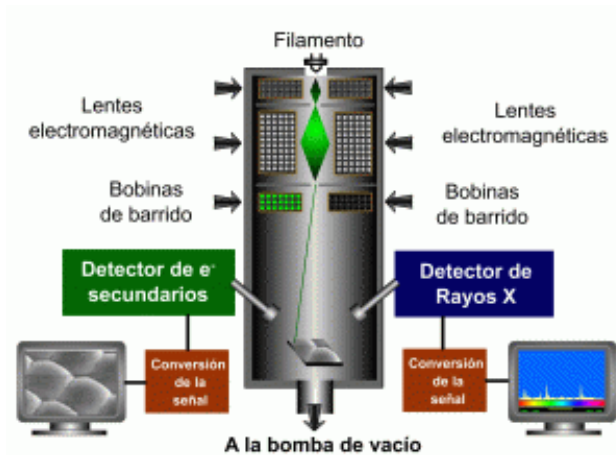


Figura II.16. Estructura de un microscopio electrónico de barrido. Tomado de Microscopía electrónica de barrido con detector EDS (SEM-EDS).³

- Microscopía de barrido láser confocal

La técnica de microscopía confocal fue patentada en 1957 por *Minsky*. No obstante, los primeros microscopios basados en esta técnica fueron descritos por *Petran* en 1968 (Martínez Nistal, 2003). Esta técnica utiliza un láser como fuente de iluminación, de forma que el láser incide sobre una zona muy pequeña de la muestra con una gran intensidad. En su camino hacia la muestra, el láser atraviesa un sistema de filtros que permiten seleccionar la longitud de onda del láser y que dirige el haz hacia la muestra. El haz incide en la muestra de forma transversal, de forma que todas las moléculas con capacidad de emitir fluorescencia que se encuentren en el recorrido del haz van a ser excitadas y producirán una emisión de luz que se dirige hacia el detector. Delante de éste, hay un *pinhole* que permite seleccionar la información procedente de un plano focal reteniendo los haces provenientes de los planos superior e inferior al plano de interés. Ya que la información que recibe el detector proviene de un único punto de la superficie, para obtener una imagen de todo el área que se quiere analizar, es necesario realizar un barrido de la muestra (Martínez Nistal, 2003; Paddock, 1999).

El microscopio utilizado, fue un confocal invertido espectral LEICA TCS-SP2 con AOBS y puerto para luz ultravioleta. Y los fluoróforos utilizados fueron el DAPI y el FITC. Sus longitudes de onda de excitación y emisión aparecen recogidas en la siguiente tabla:

³ <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>. Fecha de acceso: 22 de Junio de 2017.

Tabla 2.1. Longitudes de onda de excitación y de emisión de los fluoróforos utilizados.

	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)
DAPI	360	450
FITC	492	518

2.6. Fotocentrifugación analítica.

La fotocentrifugación analítica es una técnica que permite estudiar el tamaño y la estabilidad de las partículas en una suspensión. Aprovecha la capacidad que tienen las partículas de una suspensión coloidal de reducir la transmisión de luz a través de la misma (Turbitt, O'Hagan, Hasapidis, & Pokrajac, 2002). Así, al someter una suspensión coloidal a centrifugación, podemos estudiar procesos como la flotación o la sedimentación de las partículas en la muestra (Detloff, Sobisch, & Lerche, 2007).

La centrifugación analítica se midió en el dispositivo “LUMiSizer[®] 611/610 photometric pulsed NIR-LED” (LUM GmbH, Germany) que permite centrifugar hasta 12 muestras simultáneamente. En este equipo, la muestra coloidal se introduce en una celda que se dispone horizontalmente sobre el rotor de la centrífuga (Figura II.17). La fuente de luz se sitúa por encima del rotor. Este dispositivo utiliza luz de $\lambda = 870 \text{ nm}$ que tras atravesar la celda llega al sensor. El software calcula la transmitancia a través de la muestra y la representa en un gráfico como el de la Figura II.18 en el que se representa la superposición de todas las curvas registradas durante el experimento frente a la posición en la celda de centrifugación. La medida inicial aparece en rojo y va tornándose verdosa conforme avanza el tiempo. Cada perfil es el resultado de la posición de las partículas en la suspensión en un instante determinado. Si el número de perfiles registrado es elevado, como en el caso de la Figura II.18 superior, es posible seleccionar unos perfiles a lo largo del tiempo de centrifugación para que el estudio de la migración de las partículas en la suspensión sea más sencillo (Figura II.18 inferior).

Si los perfiles no muestran variación en la transmitancia, las partículas no se están moviendo. En caso contrario, si las líneas verdes muestran un aumento de transmitancia en la región cercana al menisco, que aparece como un cambio brusco en la transmitancia en la región de 105 a 107 mm en la Figura II.18, y una disminución de transmitancia en la región alejada del menisco, que se corresponde con el fondo de la celda, las partículas están sedimentando. Si la transmitancia disminuye en la parte cercana al menisco y aumenta en la región del fondo de la celda, entonces las partículas están migrando hacia la parte superior de la celda, es decir, que están flotando.

A partir del análisis de los diferentes perfiles entre sí, podemos inferir si las partículas de una suspensión son del mismo tamaño o de tamaño diferente. Así, en un caso en el que estudiemos sedimentación de partículas de una suspensión, podemos encontrar los siguientes casos:

1. Los perfiles que presentan la misma pendiente y sólo muestran desplazamiento en el eje X, son característicos de suspensiones con un único tamaño de partícula (Figura II.19 izquierda) (Lerche, 2016).
2. Los perfiles en los que podemos apreciar diferente pendiente, en los que, a menudo, aparecen zonas con pendiente próxima a 0, son perfiles característicos de suspensiones de partículas de diferente tamaño (Figura II.19 derecha) (Lerche, 2016).

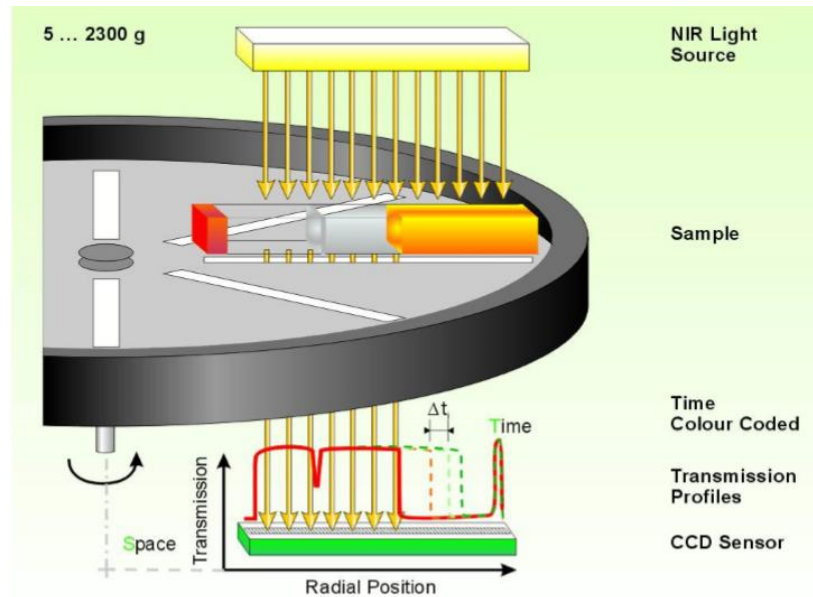


Figura II.17. Esquema de la disposición de la muestra en el dispositivo LUMiSizer. Tomado del manual de LUMiSizer (2014).

El sistema LUMiSizer[®] determina un índice de inestabilidad. Éste es un parámetro relativo que resulta de la comparación de los perfiles de diferentes suspensiones centrifugadas en el mismo momento. El valor del índice está comprendido entre 0 y 1. Siendo 0 poco inestable y 1 muy inestable. Asumiendo la esfericidad de las partículas en la suspensión coloidal, se puede calcular también la velocidad de migración de las partículas en una muestra, así como su tamaño hidrodinámico, a través de la ecuación de *Stokes-Einstein* (Ecuación II.36).

Durante la centrifugación, el movimiento de las partículas está determinado por las fuerzas que sobre ellas actúan (Figura II.20). Estas fuerzas son: la fuerza centrífuga (F_c ; Ecuación II.63, la fuerza de fricción con el medio dispersante (F_f ; Ecuación II.64 y la fuerza del líquido desplazado (F_d ; Ecuación II.65).

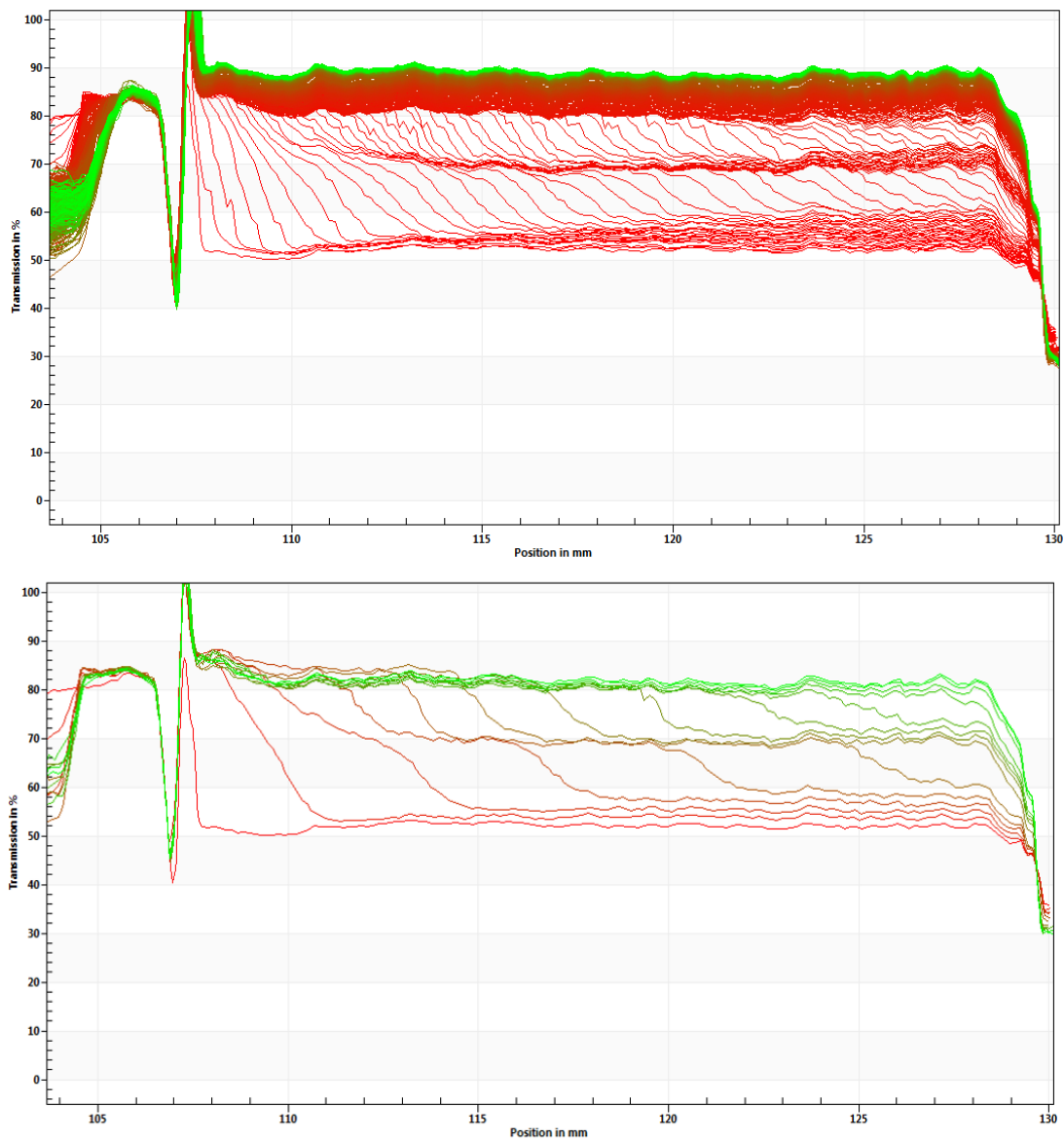


Figura II.18. Perfil de migración de las partículas de una suspensión coloidal. La imagen superior muestra 500 perfiles de transmisión. La imagen inferior corresponde al mismo evento de centrifugación pero muestra solo 9 perfiles. Para facilitar el análisis visual, el perfil inicial se representa en rojo y va tornándose de color verdoso conforme avanza la medida.

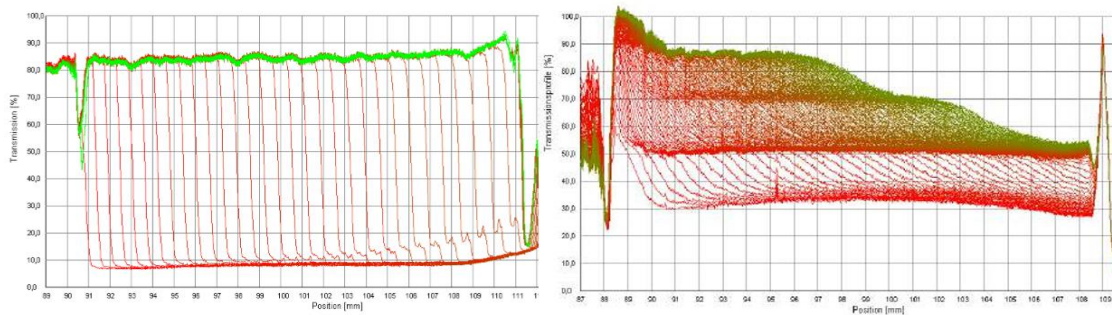


Figura II.19. Perfiles de migración de partículas en el seno de una suspensión que contiene partículas del mismo tamaño (izquierda) o partículas de distinto tamaño (derecha). Tomado de Lerche et al. (2016)

$$F_c = w^2 r_\phi m \quad (\text{II.63})$$

$$F_f = -fv \quad (\text{II.64})$$

$$F_d = -w^2 r_\phi m_0 \quad (\text{II.65})$$

Donde w es la velocidad de centrifugación, r_ϕ es la distancia al eje de giro, m_0 es la masa del líquido, m es la masa de la partícula f es el coeficiente de fricción y v es la velocidad de migración de la partícula.

De modo que el equilibrio de centrifugación se establece según la ecuación:

$$F_c + F_d + F_f = 0 \quad (\text{II.66})$$

En función de la resultante de las fuerzas que determinan el equilibrio descrito, las partículas pueden migrar alejándose del centro de rotación, proceso que denominaremos *sedimentación*, pueden migrar acercándose al centro de migración, proceso que denominaremos *flotación*, o pueden permanecer estáticas, de modo que no experimenten migración alguna. Como resultado de este último caso, no extraeremos información acerca de la estabilidad de las partículas en suspensión. Como alternativa, aumentar el tiempo o la velocidad de centrifugación ayuda a visualizar cambios en la posición de las partículas en la suspensión.

La ecuación II.52 puede reescribirse de la siguiente forma:

$$w^2 r_\phi m - w^2 r_\phi m_0 - fv = 0 \quad (\text{II.67})$$

Despejando la velocidad de migración de la partícula, obtenemos

$$w^2 r_\phi m - w^2 r_\phi m_0 = fv \quad (\text{II.68})$$

$$\frac{w^2 r_\phi}{f} (m - m_0) = v \quad (\text{II.69})$$

Y teniendo en cuenta que $m = V \cdot \rho$, siendo ρ la densidad y que el volumen de la partícula (V) es igual al volumen desalojado por la partícula (V_0), podemos continuar de la siguiente forma

$$\frac{w^2 r_\phi}{f} (\rho_p V - \rho_0 V_0) = v \quad (\text{II.70})$$

Donde ρ_p y ρ_0 son la densidad de la partícula y del disolvente, respectivamente

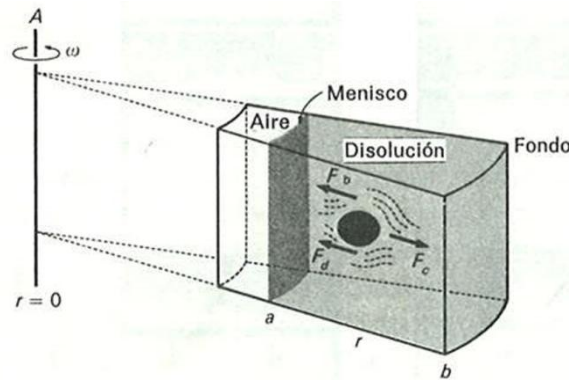


Figura II.20. Representación de las fuerzas que actúan sobre una partícula sometida a centrifugación. Tomado de Van Holde (1979).

$$\frac{w^2 r_{\phi} V}{f} (\rho_p - \rho_0) = v \quad (\text{II.71})$$

$$\frac{w^2 r_{\phi} V}{f} \Delta\rho = v \quad (\text{II.72})$$

Asumiendo la esfericidad de la partícula podemos definir el volumen de la partícula como

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (\text{II.73})$$

Definimos también el f a partir de la ecuación de *Stokes-Einstein* (Ecuación II.50):

$$f = 6\pi\eta r \quad (\text{II.74})$$

Así, combinando las ecuaciones II.72, II.73 y II.74 obtenemos la siguiente expresión

$$\frac{w^2 r_{\phi} \Delta\rho}{6\pi\eta} \frac{4}{3} \pi r^3 = v \quad (\text{II.75})$$

Y simplificando esta, obtenemos:

$$\frac{2w^2 r_{\phi} \Delta\rho}{9\eta} r^2 = v \quad (\text{II.76})$$

El cociente tiene carácter de constante para una determinada medida, por lo que podemos reescribir la Ecuación II.76 como sigue:

$$Cte \cdot r^2 = v \quad (\text{II.77})$$

De modo que podemos establecer que existe una relación cuadrática entre la velocidad de sedimentación y el radio de la partícula (Ecuación II.77). Así, si consideramos dos partículas cuyo radio difiera un orden de magnitud, la partícula mayor experimentará una velocidad de migración igual a 100 veces la velocidad de migración de la partícula pequeña. De esta forma, si durante la centrifugación ocurren procesos de agregación de las partículas, la velocidad de migración de las partículas obtenidas tras dichos procesos de agregación será mucho mayor que la migración que experimentaban las partículas iniciales y el perfil de transmisión de luz a través de la suspensión variará más rápido conforme avanza el ensayo.

2.7. Cromatografía líquida de alta resolución.

Existen cuatro tipos de cromatografía en función del principio físico que se use para separar los analitos de una muestra. La cromatografía de adsorción utiliza la capacidad de los analitos de una muestra de unirse a la fase estacionaria que está en el interior de la columna. De modo que la elución de los analitos se consigue tras eventos repetidos de adsorción y desorción. La cromatografía de partición se basa en la capacidad de los analitos en separarse en función de la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica del soluto de la fase móvil y estacionaria. La cromatografía de intercambio iónico utiliza una fase estacionaria que presenta una carga superficial contraria a la naturaleza iónica de los analitos de la muestra. Por último, la cromatografía por exclusión de tamaño consigue separar los analitos en función de su tamaño molecular (Aguilar, 2004; Bélanger, Paré, Jocelyn, & Sigouin, 1997).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography) permite la separación de componentes presentes en una muestra usando en el proceso una fase móvil líquida y una columna que permite la separación de los componentes de forma rápida (Figura II.21) (Gomis Yagües, 2008). Se denomina tiempo de retención t_r al tiempo que pasa desde que se inyecta un analito hasta que éste atraviesa la columna y es detectado por el detector (Aguilar, 2004).

Se entiende cromatografía en fase normal aquella en la que la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. De forma que los analitos de naturaleza polar se retienen durante más tiempo, mientras que la elución de los analitos apolares ocurre en primer lugar. En caso contrario, aquel en el que la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar se denomina cromatografía en fase reversa (Bélanger et al., 1997). Si la fase móvil tiene una composición constante durante todo el tiempo que está pasando la muestra por el cromatógrafo, la elución se denomina isocrática. Por el contrario, si la composición es variable, recibe el nombre de elución en gradiente (Bélanger et al., 1997). Tras la separación de los analitos de la muestra, llevada a cabo en la cromatografía, se realiza una caracterización de los mismos mediante el acomplamiento en serie de diferentes sistemas detectores. De modo que se analizan conforme son eluidos de la columna. La principal característica que deben presentar los detectores de

HPLC es poseer un volumen interno mínimo a fin de alterar lo menos posible la separación llevada a cabo en la cromatografía (Gomis Yagües, 2008).

Los detectores se pueden basar en la medida de propiedades de la disolución o bien en medidas de una propiedad del soluto. Los del primer tipo se basan en medidas como consecuencia de la presencia del soluto, como medidas del índice de refracción, de la constante dieléctrica, de la densidad o la viscosidad. Los detectores del segundo tipo miden parámetros característicos del soluto como la absorbancia, la fluorescencia, o la intensidad de difusión, el peso molecular del soluto a través de light scattering, etc.. (Bélanger et al., 1997).

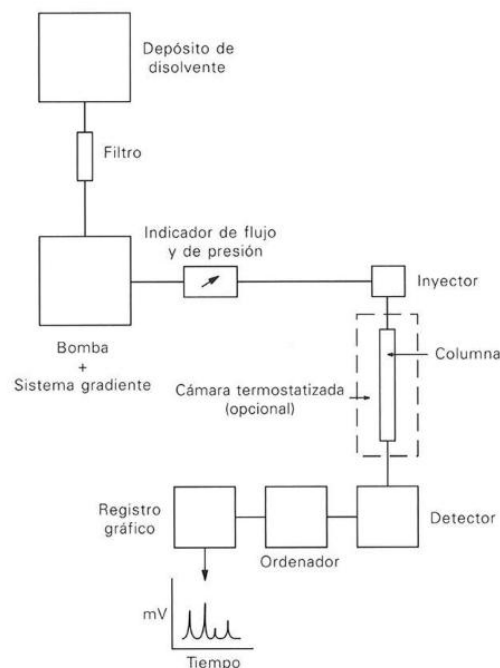


Figura II.21. Diagrama simplificado de un cromatógrafo líquido. Tomado de Issa Katime (1994).

El detector de absorbancia presenta una estructura en forma de Z para conseguir el paso óptico necesario para aplicar la ley de Beer-Lambert limitando el volumen de la misma hasta pocos μL (II.59) (Bélanger et al., 1997; Gomis Yagües, 2008). Tras medir la absorbancia de la muestra, esta se puede direccionar hacia la medida con otro detector (Gomis Yagües, 2008).

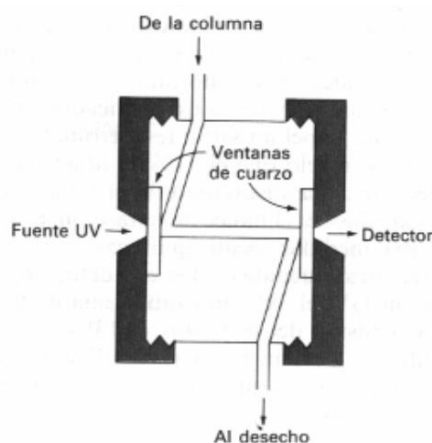


Figura II.22. Detector de absorción de un sistema HPLC. Tomado de Gomis Yagües (2008).

2.8. Sonicación.

La sonicación es una técnica que se basa en la capacidad de los ultrasonidos de transmitirse por un medio acuoso. Dichas ondas de ultrasonidos presentan ciclos de compresión y de expansión. Cuando se transmite por el medio acuoso, la fase de compresión ejerce una presión positiva en el entorno y por tanto fuerza a las moléculas a acercarse unas a otras. A continuación, la fase de expansión ejerce una presión negativa sobre el entorno y fuerza a las moléculas a separarse unas de otras. Cuando se suceden estos ciclos y la amplitud de la presión es superior a la fuerza tensil del líquido en un ciclo de expansión, se forma una burbuja de cavitación. Una vez que se forman las burbujas de cavitación, estas irán creciendo con cada ciclo de compresión y expansión hasta que llega a un tamaño crítico. Alcanzado dicho tamaño crítico, las burbujas se vuelven inestables y colapsan durante ciclos de compresión (Figura II.23). Dicho colapso de las burbujas produce un aumento puntual de la presión y de temperatura que no dura más de un microsegundo. Cada burbuja se considera un punto caliente, en el que la temperatura alcanza los 5000 °K y 500 atm (Rooze, Rebrov, Schouten, & Keurentjes, 2013). El enfriamiento de dichos puntos calientes también es rápido, 10^9 °Ks⁻¹ (Wu, Guo, Teh, & Hay, 2013). De modo que, las condiciones macroscópicas del sistema permanecen inalteradas.

Si consideramos una suspensión coloidal, las burbujas de cavitación constituyen lugares en los que se almacena energía suficiente como para, cuando se colapsa la burbuja, romper algunos enlaces moleculares pudiendo llegar a degradar polímeros (Rooze et al., 2013) o romper estructuras para obtener suspensiones estables de partículas (Wu et al., 2013). Por tanto, el resultado del proceso depende de la propia muestra, de la intensidad y del tiempo de sonicación.

Se utilizó el sonicador modelo Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, USA).

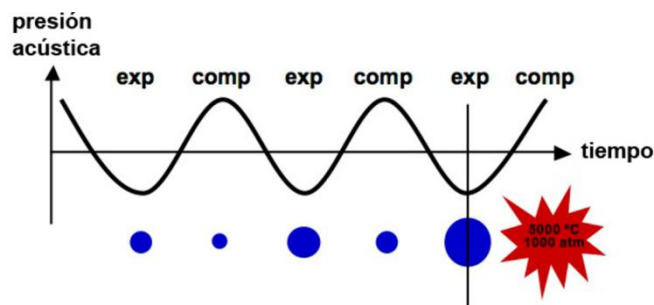


Figura II.23. Diagrama que representa la formación, crecimiento y colapso de burbujas durante la cavitación. Tomado de (GIDOLQUIM).

2.9. Cultivos celulares

- Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron las células HeLa (Figura II.1) y las células MCF7 (Figura II.2). Todos los procedimientos llevados a cabo con las células se realizaron en una cámara de seguridad biológica clase II.

En ambos casos, el medio de cultivo basal, MEM o DMEM, se completó adicionando al mismo: FBS al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina y estreptomicina al 1%.

Las células HeLa se sembraron a una densidad celular igual a 1.3×10^4 células por cm^2 de superficie de cultivo usando MEM completo. Tras la siembra en frascos de cultivo ventilados de 75 cm^2 de superficie, los cultivos se incubaron a 37°C , 95% HR y 5% CO_2 .

Las células MCF7 se sembraron a una densidad celular igual a 3×10^4 células por cm^2 de superficie de cultivo usando DMEM completo. Tras la siembra, en frascos ventilados de 75 cm^2 de superficie, los cultivos se incubaron a 37°C , 95% HR y 9% CO_2 .

- Subcultivo celular

Cuando las células cubrieron aproximadamente el 85% de la superficie de cultivo, se subcultivaron. El protocolo para el subcultivo era igual para ambas líneas celulares, salvo en el tipo de tripsina utilizado para cada línea celular, esta fue tripsina 0.25% con EDTA 0.25% en el caso de células MCF7 y tripsina 0.12% con 0.02% EDTA en el caso de las células HeLa

Para subcultivar las células, se retiró el medio de cultivo del frasco de cultivo que contenía a las células y se lavó la superficie con 1 mL de tripsina. Posteriormente, se adicionó al frasco que contenía las células 2 mL de la disolución de tripsina y se incubó a 37°C , 95% HR y 5% CO_2 hasta que las células estuvieran en suspensión. Se recogió la suspensión celular y se adicionó a 10 mL del medio de cultivo previamente atemperado.

A continuación se centrifugó la suspensión celular a 135 g durante 7 minutos en una centrífuga Multifuge 1L-R (Heraeus) y se decantó el sobrenadante. Luego se resuspendió el precipitado constituido por las células en el medio de cultivo. Se tomó una alícuota de 100 μ L de la suspensión celular, y se preparó una dilución 1:2 con azul tripán. Se estimó el número de células viables en dicha la dilución utilizando una cámara de recuento celular automática TC20TM (Biorad). Por último, se realizó una siembra de células a la densidad celular específica para cada línea celular, tal como se indica más arriba.

- Ensayos de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad aplicado consiste en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), que es de color amarillo a un producto formazano que es de color azul intenso-morado y presenta su máximo de absorbancia a 570 nm (Mosmann, 1983). Dicho proceso es llevado a cabo por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, por lo que sólo aquellas células que presenten mitocondrias íntegras y funcionales van a producir el formazano. El resultado obtenido de la medida de reducción de MTT es proporcional al número de células en un cultivo en crecimiento exponencial, ya que sólo las células que presenten mitocondrias intactas van a conseguir la reducción de la sal.

Para llevar a cabo el ensayo, se retiró el medio de cultivo completo que contenían las células HeLa, y que tenía disuelto el nanosistema en estudio, y se sustituyó por 200 μ L de medio mínimo EMEM que contenía 1% de glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de estreptomina y penicilina. La razón de la eliminación del suero de la composición del medio de incubación atiende a que este interfiere en la medida de la absorbancia. Posteriormente se adicionó una disolución de MTT hasta que la concentración final fuera de 1mg/mL. Se incubó con la sal de tetrazolio durante 4 h. Posteriormente, se desechó el medio de cultivo que contenía el MTT no metabolizado y se lisaron las membranas celulares al adicionar 100 μ L de DMSO, liberando, de este modo el formazano formado en las mitocondrias. Posteriormente se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm y a 690 nm en el espectrofotómetro para placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

Para llevar a cabo el análisis, se calculó la diferencia de la absorbancia entre las dos señales y se calculó la media y la desviación estándar de las diferencias en las absorbancias registradas para cada pocillo en cada densidad celular. La curva de crecimiento se realizó representando las medias de la absorbancia frente al tiempo.

Capítulo III : Caracterización de quitosano de peso molecular medio en disolución.

1. Introducción.

El quitosano (CS) se utiliza como alternativa para conseguir la estabilización de diversos sistemas nanoparticulados y evitar la agregación que típicamente experimentan dichos sistemas en condiciones fisiológicas, por ejemplo. Por ello, es imprescindible conocer cómo se comporta el biopolímero en dichas condiciones.

Además de la fuerza iónica de la disolución y del valor de pH, la concentración del polisacárido es un aspecto muy importante en la obtención de nanopartículas. Las cadenas de CS tienden a enredarse cuando la concentración del polímero es superior a la c^* (capítulo I). Cuanto mayor sea el peso molecular o más rígida sea la cadena polimérica, menor será la c^* .

En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se utilizó el CS a concentración igual a 10^{-3} g/mL. Este valor era próximo a c^* para el caso de nuestro CS en disolución (Cho, Heuzey, Bégin, & Carreau, 2006; Morariu, Brunchi, & Bercea, 2012). Para estimar la c^* , usamos la expresión $c^*[\eta] \approx 1$ (Cho et al., 2006), siendo $[\eta]$ la viscosidad intrínseca del polímero. De esta forma, tomamos de la literatura el valor de $[\eta]$ para las cadenas del polisacárido que presentaban unas características semejantes a las nuestras (Cho et al., 2006), es decir un grado de acetilación aproximado del 20% y un peso molecular medio de 260000 Da, y que hubiera sido disuelto en condiciones similares, es decir pH 4.3 e I 0.2 M. Como resultado, la c^* obtenida fue aproximadamente 8×10^{-4} g/mL. De esta forma, las disoluciones de CS que preparamos están en un régimen de dilución no diluida. Por tanto, parte de las cadenas del biopolímero que se encontraban en la disolución, estarían formando agregados de diferentes tamaños como consecuencia del enredamiento de las cadenas. Las características de esos agregados dependerán tanto de las características intrínsecas del CS como de las condiciones ambientales, como pH, fuerza iónica y concentración entre otros parámetros (Korchagina & Philippova, 2010; Popa-Nita, Alcouffe, Rochas, David, & Domard, 2010; Schatz, Lucas, et al., 2004).

El objetivo de este capítulo es la caracterización del CS de peso molecular medio en disolución en distintas condiciones, incluidas algunas cercanas a las fisiológicas. Con el fin de conocer la conformación y el enredamiento de las cadenas en las condiciones de síntesis y de estabilización en que va a ser utilizado.

2. Materiales y Métodos

Para estudiar el tamaño de los agregados de cadenas de quitosano en una disolución en función de la concentración del polímero, se preparó una disolución de quitosano a concentración 10^{-3} g/mL en agua mili Q a la que se adicionó ácido acético glacial. El disolvente, agua acidificada, tenía un pH igual a 3.6. La disolución de quitosano preparada se mantuvo en agitación durante 48 horas, hasta que no se observaban agregados a simple vista. Posteriormente se filtró la disolución con un filtro de diámetro

de poro igual a $0.22 \mu\text{m}$. A continuación, a partir de la disolución de quitosano preparada y utilizando el disolvente preparado para la disolución del mismo, se prepararon diluciones del polímero hasta alcanzar una concentración final igual a 10^{-4} g/mL, 10^{-5} g/mL, 10^{-6} g/mL y 10^{-7} g/mL. El pH final de las diluciones estaba en el rango de pH entre 3.6 y 4.1.

Para estudiar el efecto del pH en la distribución de tamaño de las cadenas y los agregados en una disolución de CS, se disolvió el polímero a una concentración final igual a 10^{-3} g/mL y a pH 3.5. Una vez disuelto, se ajustó el pH a diferentes valores, de forma que al enrasar las disoluciones, el valor final de las mismas fuera 2.9, 3.6 y 6.3, respectivamente. Paralelamente, se preparó una disolución de CS 10^{-5} g/mL a pH = 3.6, a la que posteriormente se varió el valor del citado parámetro hasta valores 4.0, 4.7, 5.1, 6.6, 7.4 y 9.8. Para ello, se utilizaron disoluciones de NaOH a concentración 0.1 M ó 1M, a fin de adicionar un volumen despreciable respecto al volumen de la disolución final y poder, de esta forma, asumir que no se produjo variación en la concentración del polímero. Para acidificar el medio, se utilizó ácido acético glacial por la misma razón expuesta anteriormente.

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en el tamaño de las poblaciones de cadenas y agregados en una disolución de CS, se disolvió el polímero a concentración 10^{-3} g/mL en agua miliQ acidificada con ácido acético (pH = 3.6) a la que se adicionó la cantidad necesaria de KNO_3 para alcanzar una fuerza iónica igual a 0.15 M ó 0.25 M. Se mantuvo la disolución en agitación durante 24 horas y a continuación se filtró utilizando para ello filtros de diámetro de poro igual a $0.45 \mu\text{m}$ y $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro.

Para llevar a cabo las medidas de DLS, se permitió que el software seleccionara de forma automática el número y el tiempo de cada run, de acuerdo con su criterio de calidad. Para conseguir unos resultados reproducibles, se tomaron, al menos 175 medidas de dispersión de cada disolución. El resultado que se muestra corresponde a la media de las medidas realizadas ($n \geq 175$). Las medidas de potencial Z se realizaron por sextuplicado.

3. Resultados y discusión.

3.1. Efecto de la concentración de quitosano en la distribución de agregados.

Para simplificar el sistema, estudiaremos por separado cómo afectan diversos parámetros ambientales. En primer lugar, estudiamos el efecto de la concentración del polímero en disolución. De acuerdo con los resultados de dispersión de luz obtenidos, al disminuir la concentración del polímero en disolución, el tamaño de los agregados presentes en la disolución disminuye. Para facilitar la interpretación de los resultados, la Figura III.1 recoge las distribuciones en intensidad y en número de las cadenas y

agregados en las diluciones de CS a concentración igual a 10^{-3} g/mL, 10^{-5} g/mL y 10^{-7} g/mL. Se puede observar que al disminuir la concentración del polímero, la población de partículas nanométricas aumenta, desapareciendo simultáneamente las micrométricas. De acuerdo con la distribución en número, la población de agregados micrométricos en las disoluciones si la concentración era igual o inferior a 10^{-5} g/mL era indetectable. En el anexo al capítulo III se representan las distribuciones de disoluciones a otras concentraciones.

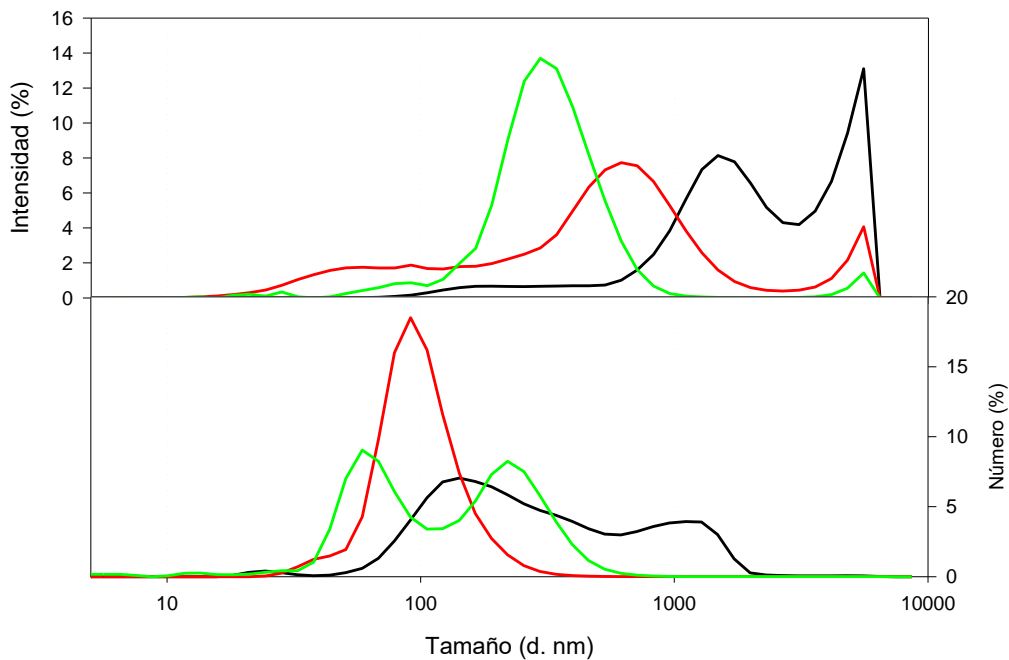


Figura III.1. Distribución de tamaño de los agregados presentes en disoluciones de CS en función de la concentración del polímero en la disolución. Las líneas representan 10^{-3} g/mL (negro), 10^{-5} g/mL (rojo) y 10^{-7} g/mL (verde) pH 3.6 y 10M.

En cuanto al potencial Z de los agregados, también disminuye, debido posiblemente, a la disminución de partículas cargadas en la disolución (Tabla III-1).

3.1. Efecto del pH en el quitosano.

Para probar el efecto del pH en el tamaño de los agregados en una disolución de CS, es necesario disolver el polímero en un medio ácido y posteriormente variar el valor de pH, de lo contrario, no se produciría la disolución del polímero en los valores de pH mayores. Para llevar a cabo el estudio del efecto del pH en el tamaño de las partículas y los agregados, y teniendo en cuenta el valor de la c^* del polisacárido, estudiamos el efecto del pH en disoluciones de diferente concentración, concretamente 10^{-3} g/mL y 10^{-5} g/mL (Figura III.2).

En el caso de la disolución de CS 10^{-3} g/mL, el pH final de las disoluciones ensayadas fue 2.9, 3.6 y 6.3. La distribución en intensidad indicó que existían poblaciones de diferente tamaño. Una disminución en el pH dio lugar a la reducción en el diámetro hidrodinámico de las poblaciones. Aunque un descenso de 6.3 a 3.6 da lugar a una

disminución en el tamaño casi inapreciable en la distribución en intensidad, en número sí muestra un cambio más claro. De hecho, la población que aparecía alrededor de una micra de diámetro hidrodinámico disminuyó al disminuir el pH, y además, aparecía una nueva población alrededor de 20 nm que no se detectaba en la situación en la que el pH era mayor.

Tabla III-1. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de agregados de CS en función de la concentración del polímero en la disolución.

Concentración	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad	
	(gmL)	(mV)	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%		
10^{-3}		82 \pm 5	100	6.4 \pm 0.4	100	0.344
10^{-4}		60 \pm 5	80.7	4.7 \pm 0.4	80.7	0.179
		43 \pm 4	19.3	3.3 \pm 0.3	19.3	
10^{-5}		48 \pm 5	83.6	3.8 \pm 0.4	83.6	0.041
		18 \pm 7	15.7	1.4 \pm 0.5	15.7	
10^{-6}		29 \pm 5	47.7	2.3 \pm 0.4	47.7	0.316
		7 \pm 4	27.6	0.6 \pm 0.3	27.6	
		55 \pm 3	24.7	4.3 \pm 0.3	24.7	
10^{-7}		29 \pm 4	53.6	2.3 \pm 0.3	53.6	0.329
		-2 \pm 3	21.3	-0.2 \pm 0.2	21.3	
		14 \pm 3	18.5	1.11 \pm 0.1	18.5	

Los resultados obtenidos apoyaban la hipótesis de que en disoluciones más ácidas, las cadenas de CS debían estar más protonadas que en las de valores más básicos, por lo que la tendencia de las cadenas del polielectrolito a agregar entre ellas disminuyó y, por tanto, el diámetro de las partículas disminuyó también. Por otra parte, el caso del descenso de pH hasta un valor de 2.9 mostró una situación extrema en la que se observó una población de partículas de diámetro hidrodinámico inferior a 10 nm en la distribución en intensidad, dicha población podría ser resultado de la degradación del polímero al ser expuesto a un pH ácido, como ha sido expuesto más arriba. Esta población ganó protagonismo en la distribución en número, en la que el 100 % de la distribución se localizó en este valor de diámetro hidrodinámico. Este resultado era esperable ya que la distribución se expresa en términos relativos al total de partículas o agregados en la disolución. Aunque la distribución en intensidad revelaba tres poblaciones de agregados, la población más pequeña estaba situada en torno a unos pocos nanómetros de diámetro, mientras que las otras dos poblaciones mostraban un diámetro mucho mayor, concretamente dos órdenes de magnitud superior o incluso tres o cuatro. De acuerdo con los principios de la técnica (ver página 41), para que los agregados mayores fueran representados en la distribución en número, debían producir una dispersión en intensidad que fuera 10^{12} o 10^{18} veces la intensidad de los agregados pequeños. Como no era así, las poblaciones mayores, aunque estaban presentes en la disolución, no aparecían reflejadas en la distribución en número. Como conclusión, edujimos que la presencia relativa de los agregados mayores en esa disolución era ínfima.

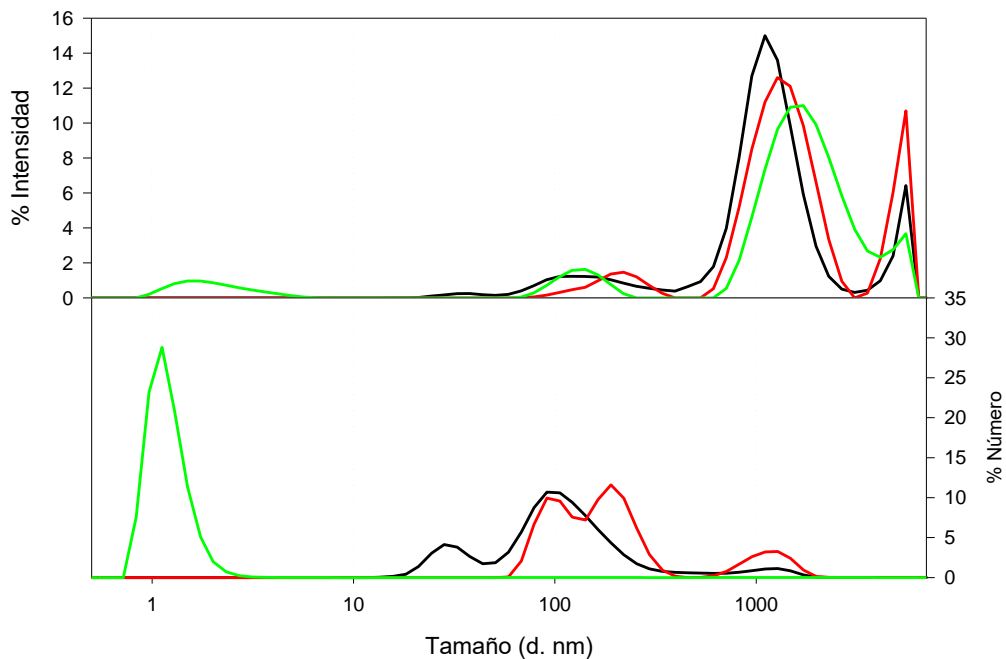


Figura III.2. Distribución de tamaño de los agregados presentes en disoluciones de CS 10^{-3} gcm^{-3} en función del pH del medio. Los valores de pH representados son 2.9 (verde), 3.6 (negro) y 6.3 (rojo).

Posteriormente, preparamos una disolución de CS a una concentración igual a 10^{-5} g/mL. Teniendo en cuenta que esta concentración está compuesta principalmente por cadenas de CS libres y que el pH muy ácido produce la degradación de las cadenas del biopolímero, ampliamos el rango de pH estudiado pero excluimos el valor de $\text{pH} = 2.9$. El parámetro en estudio se ajustó a 4.0, 4.7, 5.1, 6.6, 7.4 y 9.8. Para simplificar el análisis de los resultados, se incluye en la Figura III.3 la distribución de las disoluciones a $\text{pH} 3.6$, 6.6 , que corresponde al valor en torno al cual se encuentra el punto isoeléctrico del biopolímero y $\text{pH} 9.8$, valor muy por encima del punto isoeléctrico (pI). Además, se incluye en el anexo al capítulo III, las distribuciones a otros valores de pH.

A $\text{pH}=3.6$, las distribuciones en intensidad y en número mostraron una población monodispersa de partículas de CS. Dicha población mostraba un diámetro hidrodinámico de centenares de nm, por lo que bien podría representar cadenas sueltas del polímero. A pH próximo al pI del polielectrolito, existían en la disolución, al menos, dos poblaciones de partículas en la distribución en intensidad. Una de ellas centrada en las decenas de nm y la segunda en las centenas y se extendía hasta los millares de nm. Sin embargo, esta última estaba ausente en la distribución en número. A pH superiores, se registraron distribuciones en intensidad monodispersas que mostraban una población centrada en los centenares de nm, tanto a $\text{pH} = 7.4$ (anexo al capítulo III) como a $\text{pH} = 9.8$ (Figura III.3). La concentración de CS en estas disoluciones es tan baja que sería casi imposible determinar a simple vista fenómenos como la flotación o la precipitación del polímero, en caso de que estos procesos estuvieran teniendo lugar. Sin embargo, el resultado que obtuvimos indicó la presencia de agregados en el seno de la disolución cuando el pH era igual o superior al punto isoeléctrico del polisacárido.

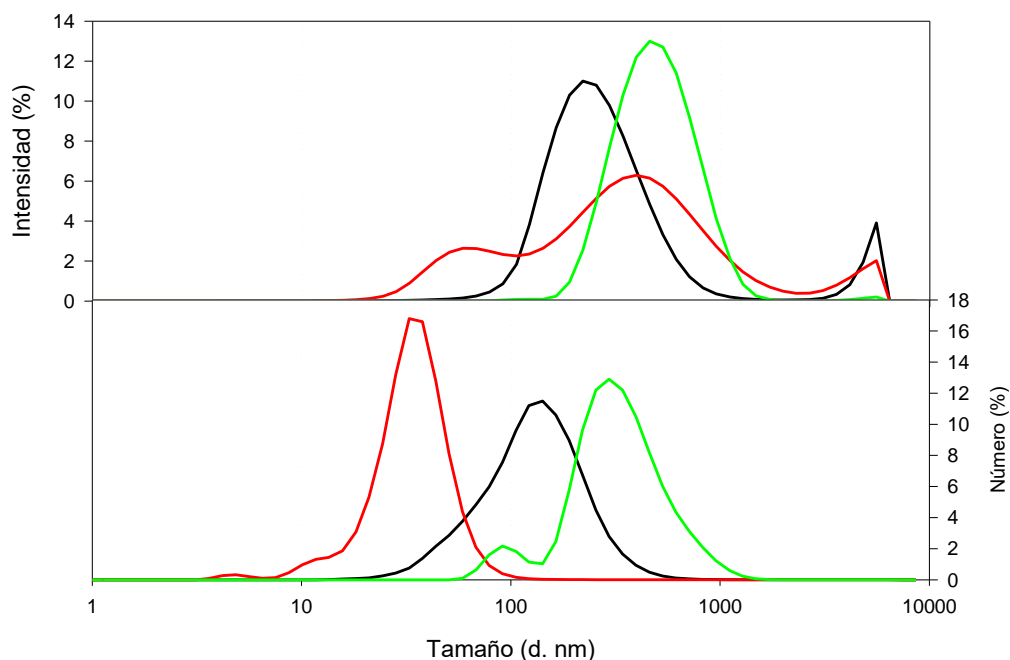


Figura III.3. Distribución de tamaño de los agregados presentes en disoluciones de CS 10^{-5} g/mL en función del pH del medio. Los valores de pH representados son 3.6 (negro), 6.6 (rojo) y 9.8 (verde).

La conformación y el carácter polielectrolítico del polímero deben de variar considerablemente como resultado de la variación del pH del medio. La Tabla III-2 recoge el valor de potencial Z del polímero a los diferentes valores del parámetro ensayados. Como cabría esperar, se observa una disminución de la carga superficial del polímero en disolución debido a la disminución de la protonación de los grupos amina cuando el pH es igual o superior al pI.

3.1. Efecto de la fuerza iónica en el quitosano.

La Figura III.4 muestra la distribución de diámetros hidrodinámicos de las partículas presentes en disoluciones de CS de una concentración 10^{-3} g/mL a pH 3.6 y diferentes I, concretamente: 0 M, 0.15 M y 0.25 M. La distribución en intensidad para el caso en el que la I no se incrementó se extiende en el rango de tamaños de 100 nm hasta 8000 nm. Aunque los valores superiores a 2000 nm no pueden considerarse por estar fuera del límite de resolución de la técnica, claramente existen agregados micrométricos de cadenas del polielectrolito en la disolución. La distribución en número indicó que las poblaciones centradas en los centenares de nm y en la micra eran aproximadamente igual de abundantes en la disolución.

Tabla III-2. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de agregados de CS presentes en disoluciones de CS 10^{-5} g/mL a diferente valor de pH.

pH	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad (mS/cm)
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	
3.6	48 \pm 5	83.6	3.8 \pm 0.4	83.6	0.041
	18 \pm 7	15.7	1.4 \pm 0.5	15.7	
4.0	49 \pm 7	98.9	3.8 \pm 0.5	98.9	0.040
	13 \pm 7	1.0	1.0 \pm 0.6	1.0	
	-42 \pm 2	0.1	-3.3 \pm 0.2	0.1	
5.1	41 \pm 6	93.4	3.2 \pm 0.5	93.4	0.394
	5 \pm 2	5.6	0.3 \pm 0.2	5.6	
	66 \pm 2	1.1	5.2 \pm 0.2	1.1	
6.6	6 \pm 6	100	0.5 \pm 0.5	100	0.531
7.4	7 \pm 6	100	0.5 \pm 0.5	100	0.515
9.8	2 \pm 3	100	0.14 \pm 0.23	100	0.067

Por otra parte, al adicionar KNO_3 , la señal detectada en la zona de diámetros hidrodinámicos superiores a 1 micra, decayó de forma brusca en la distribución en intensidad y era inexistente en la distribución en número. Sin embargo, en los casos de I elevada, se registró la presencia de partículas en el rango de tamaños desde los 10 nm hasta los 1000 nm aproximadamente. En estas distribuciones, podemos observar la presencia de dos picos claramente separados. El primero de ellos centrado alrededor de 60 nm, y el segundo alrededor de 600 nm. Este tipo de distribuciones bimodales han sido referenciadas previamente en disoluciones de CS de bajo peso molecular (Chattopadhyay & Inamdar, 2010; Korchagina & Philippova, 2010). De acuerdo a la distribución en número, en ambos casos en los que se incrementó la I, las poblaciones de mayor diámetro hidrodinámico redujeron tanto su presencia en la disolución que la curva resultante del análisis reveló que casi la totalidad de las partículas se encontraban en la región de las decenas de nm. También se encontró una población muy pequeña, de diámetro inferior a la decena de nm, que debía corresponder a la presencia de impurezas o de fragmentos de CS que aparecieron por la degradación del polímero (Bhattacharai et al., 2008; Mironov, Vikhoreva, Kil'deeva, & Uspenskii, 2007).

En conclusión, en presencia de sal, los agregados de CS presentaban un tamaño inferior a una micra de diámetro hidrodinámico, y además, una parte importante de la población presentaba un tamaño inferior a 100 nm. La razón debía ser que las cadenas de CS, tanto libres como las que formaban parte de agregados, debían presentar una conformación menos extendida en la disolución de fuerza iónica elevada debido al apantallamiento de las cargas que produciría la presencia de iones NO_3^- sobre las cargas positivas que se encontraban sobre las cadenas de CS. Además, es muy probable que, en esas condiciones, las moléculas de CS tuvieran mucha menor tendencia a formar agregados.

Se puede estimar de forma aproximada el rango de diámetros hidrodinámicos que tendrían las cadenas libres de nuestro CS usando la relación propuesta por el grupo de Morris

$$d = (3[\eta]M/10\pi\mathcal{N}_A)^{1/3} \quad (\text{III.1})$$

En la que M es el peso molecular y \mathcal{N}_A es el número de Avogadro. De nuevo, tomamos de la literatura (Morris et al., 2009) valores de $[\eta]$ y M para cadenas de CS que presentaran características similares y hubieran sido disueltas en condiciones semejantes de fuerza iónica y obtuvimos valores de diámetro hidrodinámico entre 50 nm y 80 nm. Así, para el caso de la disolución con $I = 0.25$ M, el pico que aparece alrededor de 60 nm podría corresponder a cadenas de CS libres, las cuales mostraban una conformación próxima a la cadena aleatoria. El hecho de que el CS mostraría tal conformación, explicaría la presencia de una gran población de cadenas libres ya que estas cadenas no interaccionan fácilmente para producir agregados. Sin embargo, el pico que se encontraba alrededor de los 600 nm correspondería, sin lugar a dudas, a agregados de CS.

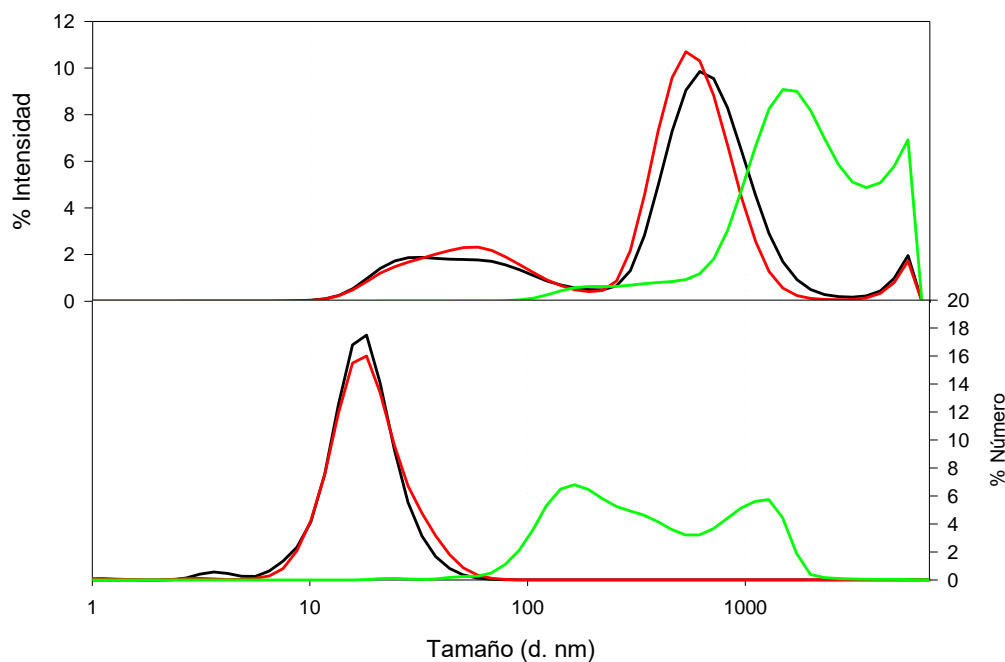


Figura III.4. Distribución de tamaño de los agregados presentes en disoluciones de CS 10^{-3} g/mL en función de la I del medio. Las líneas representan I 0 M (verde), I 0.15 M (negro) y I 0.25 M (rojo).

3.2. Aspecto de los agregados de quitosano

El bajo poder de resolución del microscopio de luz visible hace que sólo aquellos agregados grandes, de varios cientos de nanómetros o micrómetros, puedan ser identificados como unidades independientes. Como alternativa aparece el uso de la microscopía electrónica.

Para visualizar el CS recurrimos al uso de TEM. Para visualizar los agregados del biopolímero mediante esta técnica, era necesario aumentar el contraste del polímero mediante el uso de una disolución de acetato de uranilo (AcUr) al 2%. Como resultado pudimos observar imágenes de quitosano como las que se muestran de la Figura III.5 a la Figura III.8, en las que la apariencia del polímero variaba mucho de unas imágenes a otras. Mientras que en la Figura III.5 aparece con un aspecto laminar, en las Figura III.6 a Figura III.8 parecía que los agregados de quitosano presentaban una estructura tridimensional. En las Figura III.6 y Figura III.7 los agregados tenían una apariencia más globular y en la Figura III.8 recordaba más a una estructura reticular. Además, el tamaño de los agregados que podían verse variaba enormemente de unas figuras a otras.

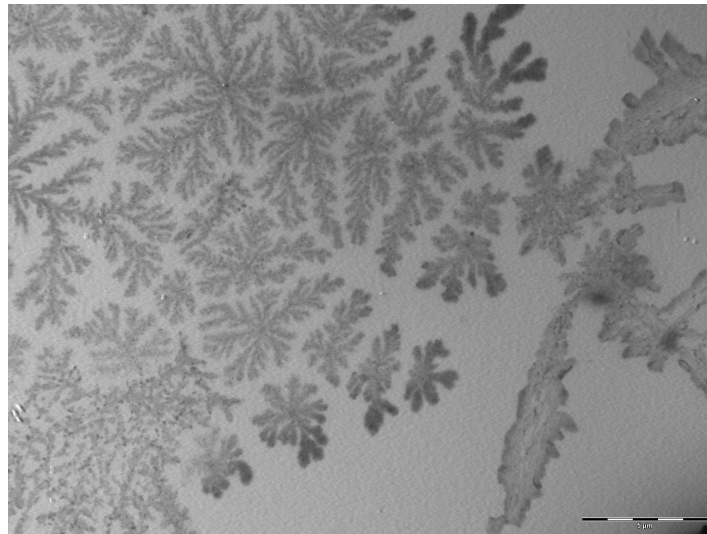


Figura III.5. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH= 4 y I= 0M al microscopio electrónico de transmisión. La muestra fue tratada con acetato de uranilo para aumentar el contraste del polímero. La escala aparece en la esquina inferior derecha, la barra corresponde a 5 μm .

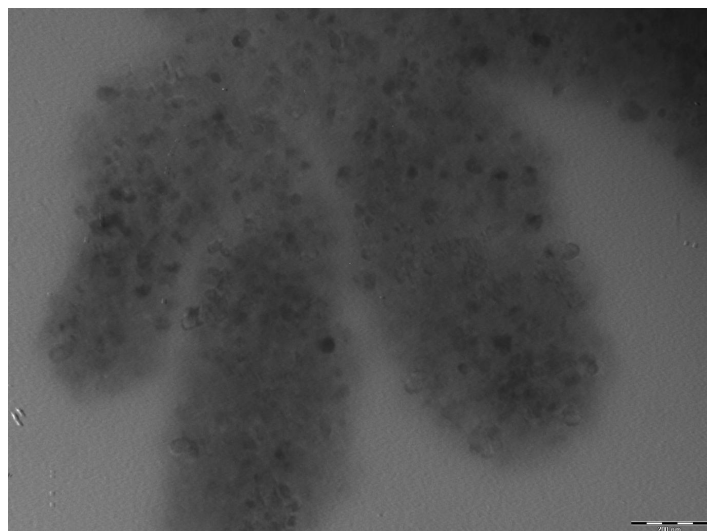


Figura III.6. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH= 4 y I= 0M al microscopio electrónico de transmisión. La muestra fue tratada con acetato de uranilo para aumentar el contraste del polímero. La escala aparece en la esquina derecha, la barra corresponde a 200 nm.

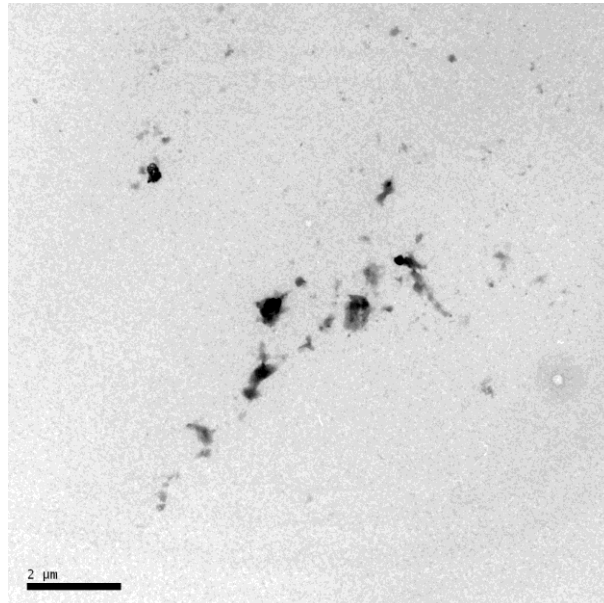


Figura III.7. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH = 4 y I = 0M al microscopio electrónico de transmisión. La muestra fue tratada con acetato de uranilo para aumentar el contraste. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda, representa 2 μ m.

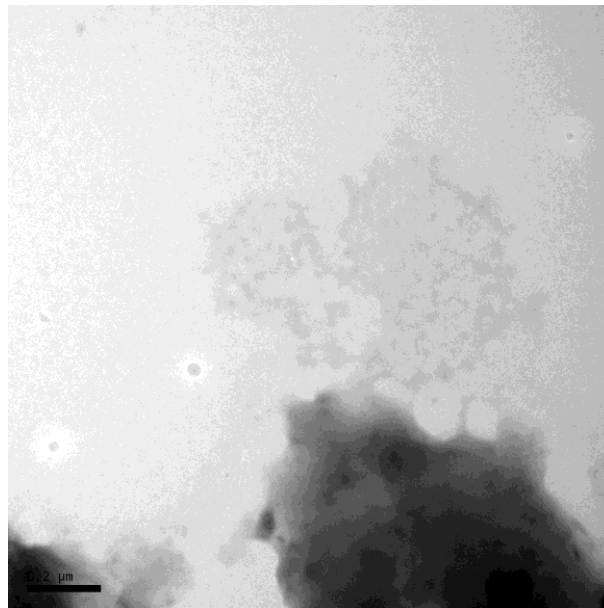


Figura III.8. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH = 4 y I = 0M al microscopio electrónico de transmisión. La muestra fue tratada con acetato de uranilo para aumentar el contraste. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda, representa 0.2 μ m.

Para complementar el estudio de los agregados de quitosano, se tomaron imágenes de SEM. En esta ocasión también encontramos diversidad en las imágenes. La Figura III.9 muestra estructuras recuerdan a aquellas obtenidas con TEM y que se muestran en la Figura III.5. También encontramos estructuras que se corresponderían a las imágenes obtenidas por TEM que indicaban la presencia de agregados tridimensionales (Figura III.10).

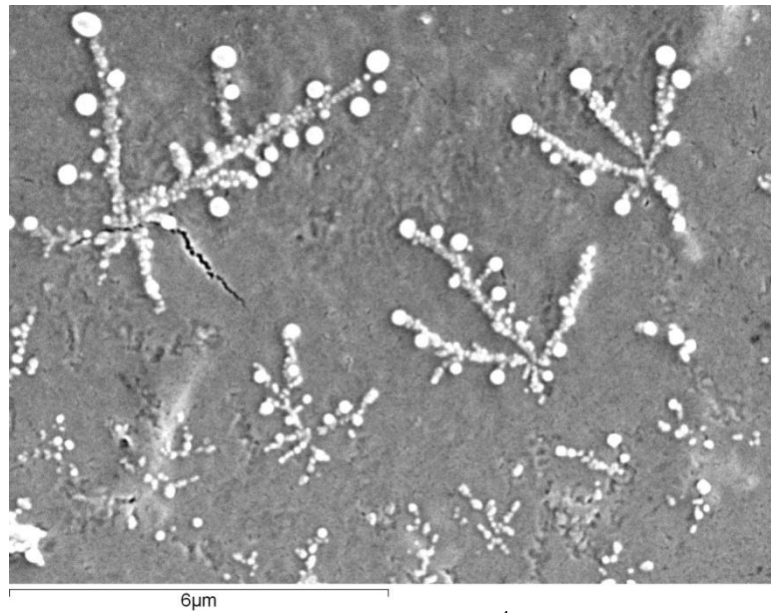


Figura III.9. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH = 4 y I = 0M al microscopio electrónico de barrido. La muestra se recubrió de oro para aumentar el contraste de la misma. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda, representa 6 μ m.

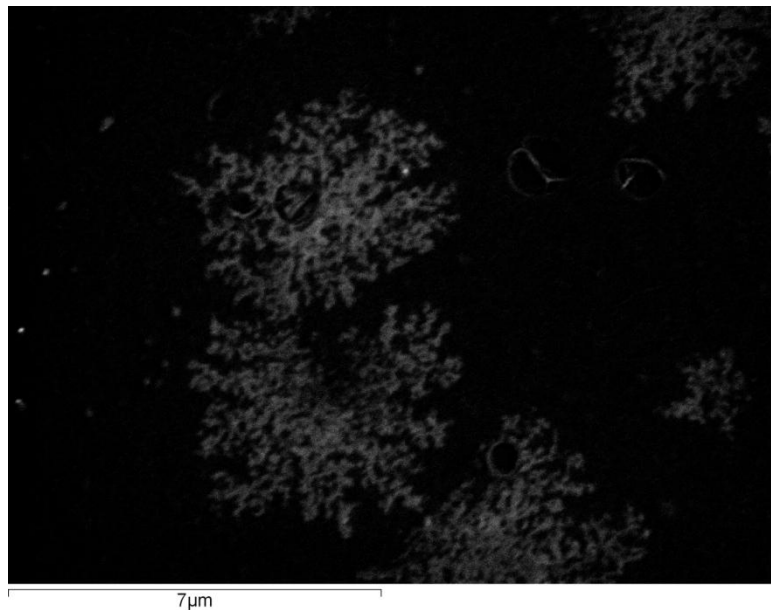


Figura III.10. Agregados de quitosano en disolución a $c = 10^{-4}$ g/mL, pH = 4 y I = 0M al microscopio electrónico de barrido. La muestra se recubrió de oro coloidal para aumentar el contraste de la misma. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda, representa 7 μ m

4. Conclusiones.

El estudio de las disoluciones de quitosano en función de diferentes parámetros ambientales permite concluir:

1. La concentración de quitosano en disolución es un aspecto fundamental que afecta al número de moléculas que pueda enredarse y formar agregados. Las interacciones que se producen durante el enredamiento son débiles y el proceso

es dinámico tal como se deduce por las variaciones en el tamaño de los agregados que se encuentran en la disolución. De acuerdo con los resultados obtenidos, una disolución a $c = 10^{-3}$ g/mL, estaría por encima de c^* y presenta agregados micrométricos. Si reducimos la concentración del polímero a una $c \leq 10^{-5}$ g/mL, dichos agregados micrométricos no se observan en las distribuciones obtenidas por DLS.

2. El pH es un aspecto clave para conseguir la disolución del CS. Una vez disuelto el polímero, un incremento en el valor de pH de la disolución, sin rebasar el valor de punto isoeléctrico, aproximadamente 6.5, no produce una variación significativa en el perfil de distribución de las estructuras medida por dispersión de luz. Las distribuciones presentan dos poblaciones de estructuras. Sin embargo, al incrementar el pH por encima del pI, se produce una variación en el perfil de distribución del polímero. La solubilidad del CS disminuye, y se observa una única población en el rango de los cientos de nanómetros que es el resultado de la agregación. Este cambio de perfil junto con el cambio en el potencial Z, parece indicar un cambio en la conformación del polímero al aumentar el pH. La agregación no se produce por el enredamiento del biopolímero, sino que la disminución de la solubilidad hace que, desde un punto de vista termodinámico, sean más favorables las interacciones entre las moléculas de soluto que entre el soluto y el disolvente.
3. Por último, un incremento en la fuerza iónica del medio da lugar a una disminución del tamaño de los agregados en la disolución a $c = 10^{-5}$ g/mL manteniendo las dos poblaciones de estructuras presentes en las disoluciones, que se desplazan hacia regiones de menor diámetro hidrodinámico. Tal como se ha descrito en la literatura, un aumento en la fuerza iónica produce un efecto pantalla en las interacciones electrostáticas de las cargas presentes. De acuerdo con nuestros resultados, esto da lugar a un triple efecto: las repulsiones internas entre los grupos amina cargados disminuyen, lo que provoca una conformación más plegada y menos rígida; en estas condiciones, la probabilidad de que se produzcan enredamientos entre las moléculas disminuye, y por último, cuando éstas se producen, los agregados están menos extendidos en el espacio y por tanto, muestran un tamaño menor.

Anexo al capítulo III

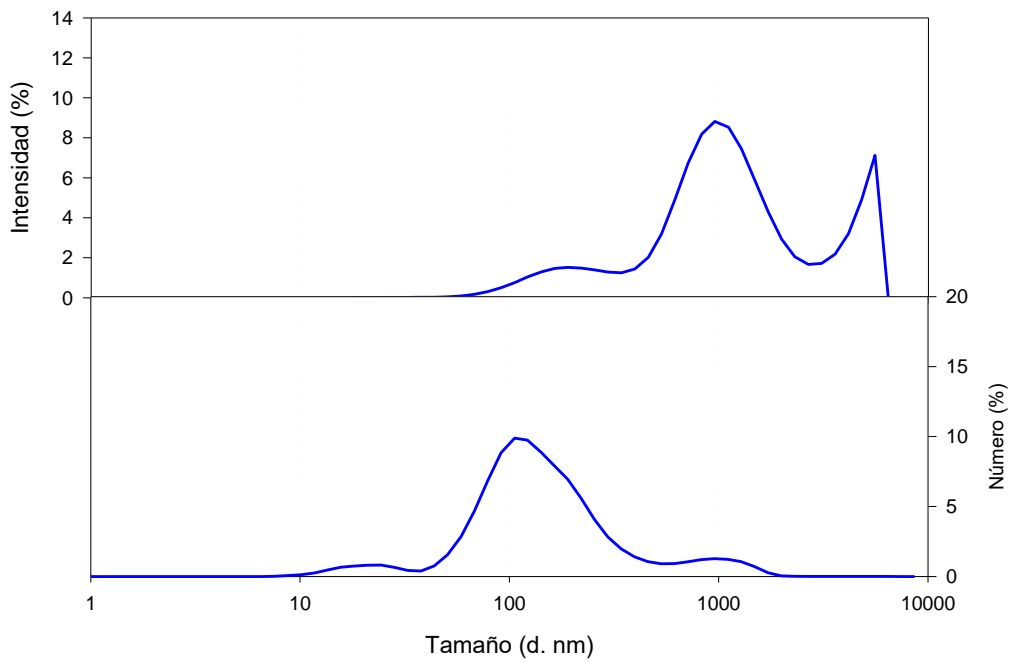


Figura III.11. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-4} g/mL, pH 3.6 y I 0 M.

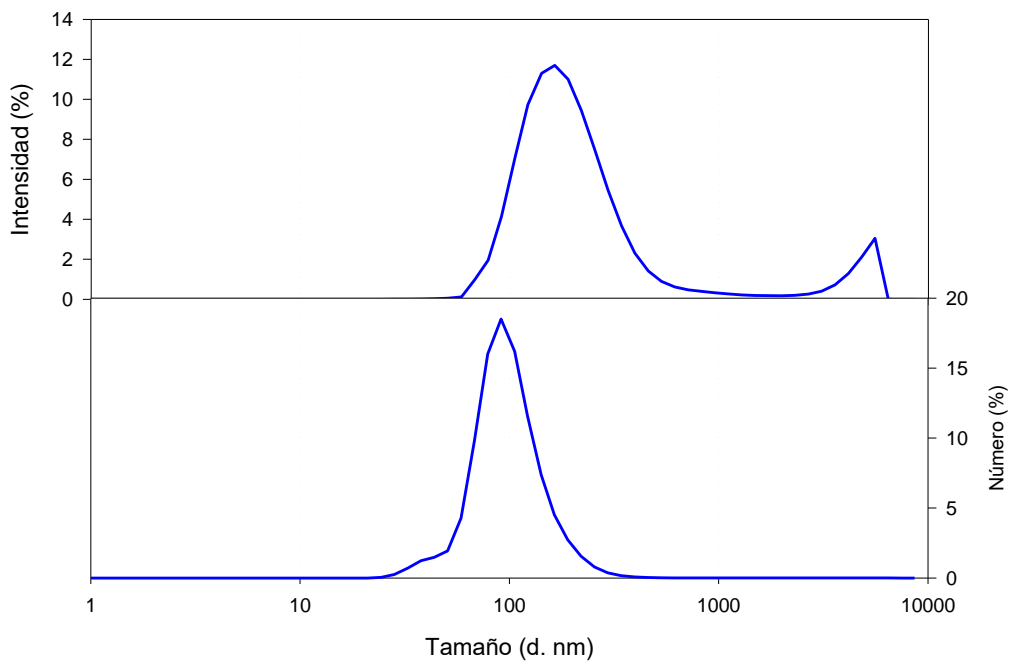


Figura III.12. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-6} g/mL, pH 3.6 y I 0 M.

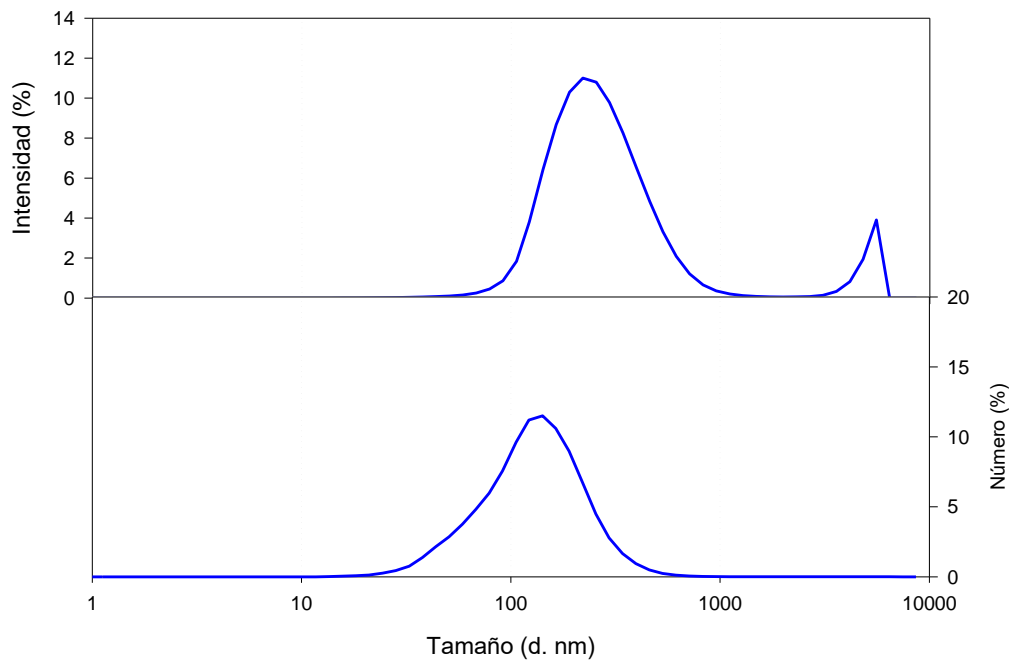


Figura III.13. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-8} g/mL, pH 3.6 y 1.0 M.

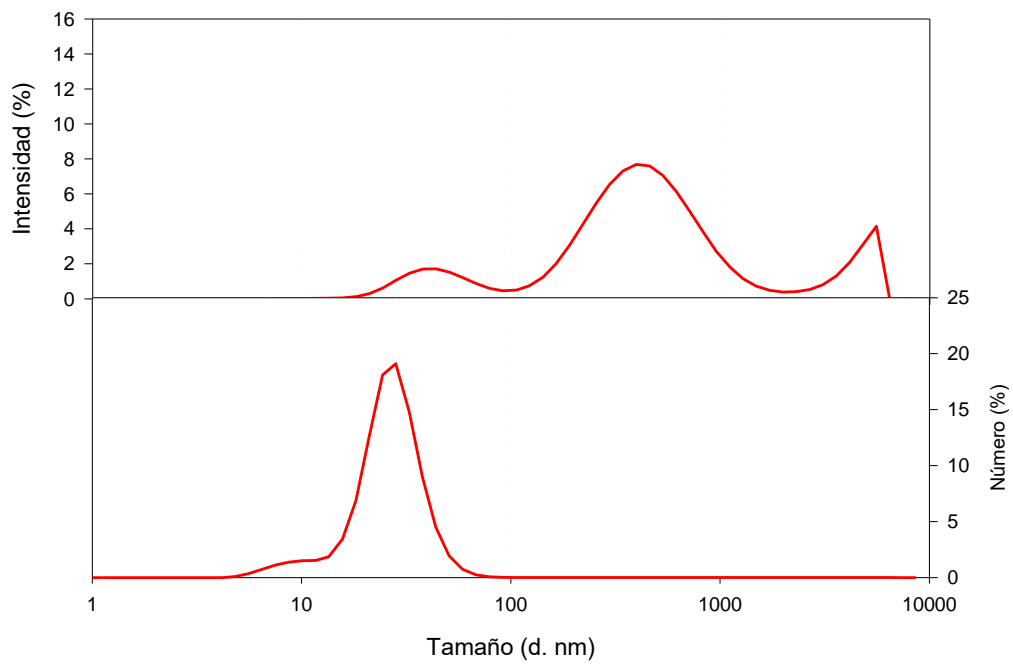


Figura III.14. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-5} g/mL, pH 4.7 y 1.0 M.

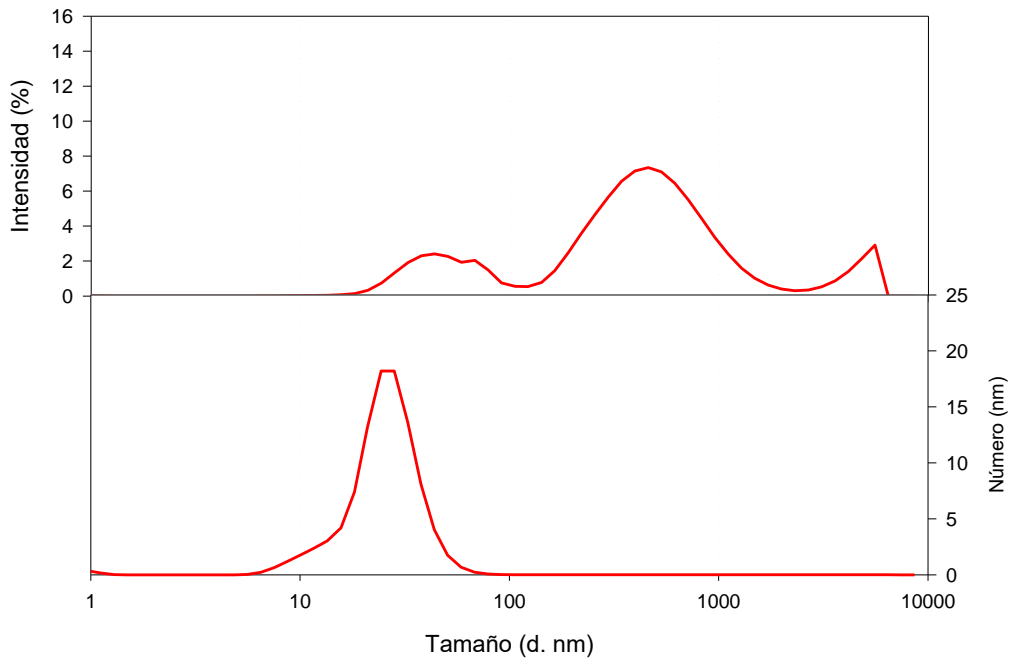


Figura III.15. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-5} g/mL, pH 5.1 y I 0 M.

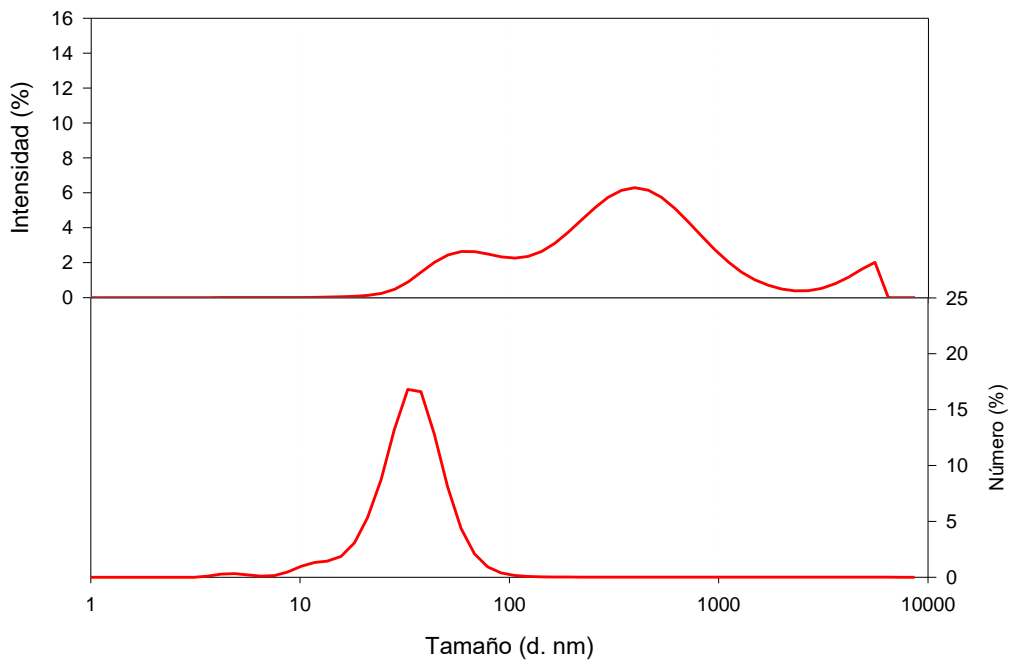


Figura III.16. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-5} g/mL, pH 6.6 y I 0 M.

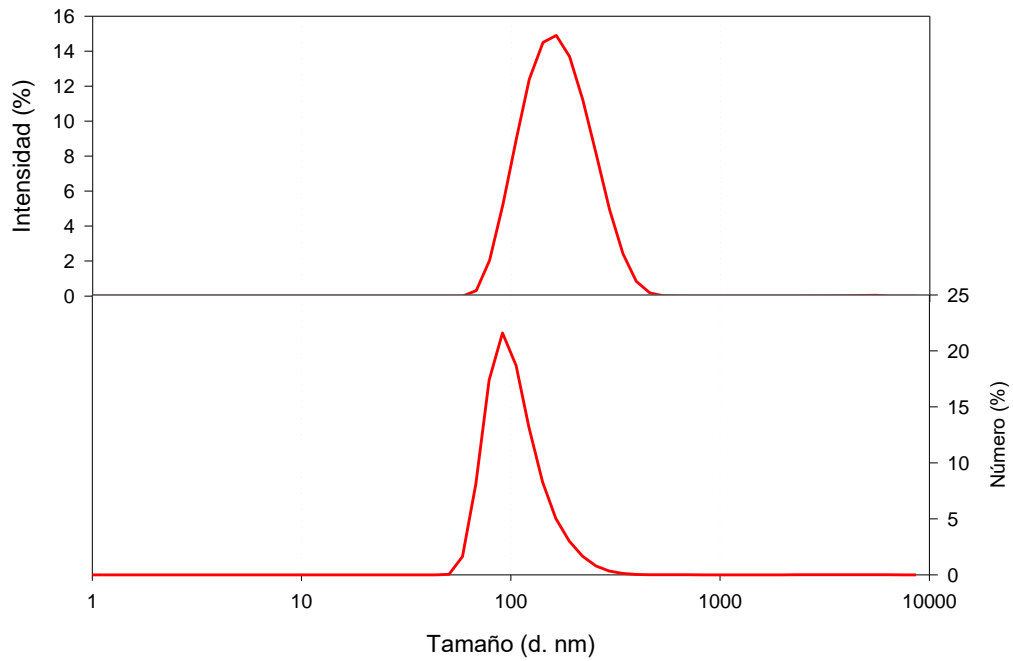


Figura III.17. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-5} g/mL, pH 7.4 y I 0 M.

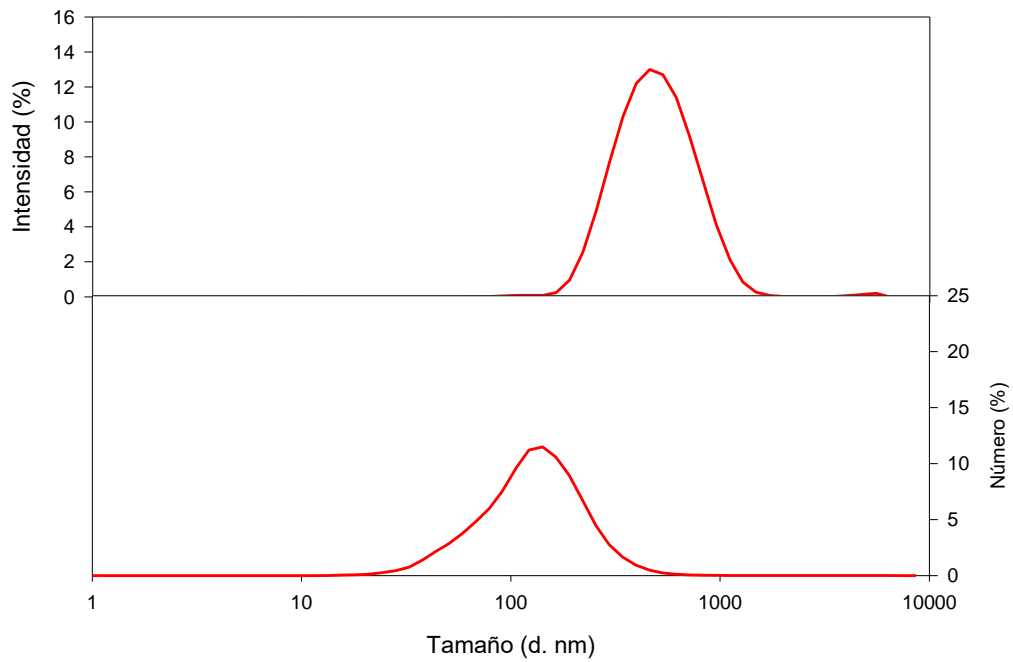


Figura III.18. Distribución de tamaño de los agregados presentes en una disolución de CS de concentración 10^{-5} g/mL, pH 9.8 y I 0 M.

**Capítulo IV : ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN
DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN
PRESENCIA DE QUITOSANO.**

1. Introduction.

En disolución en agua, el CS es uno de los pocos polisacáridos cargados positivamente y, por tanto, capaz de interactuar con nanopartículas metálicas como las AuNP (H. Huang & Yang, 2004; Linlin Wu, Chunsheng Shi, Liangfei Tian, & Zhu, 2007; Regiel, Irusta, Kyzioł, Arruebo, & Santamaria, 2013) y como agente de recubrimiento en el desarrollo de sistemas de nanopartículas capaces de actuar como sensores o como liberadores de fármacos (Bhattarai et al., 2008; Prado-Gotor et al., 2014; Regiel et al., 2013).

En la literatura existen pocos trabajos en los que se haya centrado la atención directamente en la influencia de los parámetros de la disolución sobre la interacción entre el CS y las nanopartículas (Prado-Gotor et al., 2014). El objetivo de este capítulo es evaluar el papel del CS en la prevención de la agregación de las AuNP en condiciones de fuerza iónica elevada. También forma parte de los objetivos de este capítulo el estudio de los tipos de estructuras formadas cuando la suspensión de AuNP y la solución de CS de peso molecular medio se mezclan. Y la influencia que ejerce sobre el sistema, la bajada del pH del medio.

En este capítulo, caracterizamos las nanoestructuras formadas por AuNP y CS en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica mediante medidas del diámetro hidrodinámico a través del uso de la dispersión dinámica de luz (DLS), el potencial Z, el estudio de la espectrofotometría en la región ultravioleta-visible (UV-Vis) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Ya que el CS sólo es soluble en disoluciones acuosas acídicas, lo primero que hicimos fue determinar qué valor de pH en la disolución permite la disolución del polisacárido sin producir la agregación de las AuNP (Capítulo III) Finalmente, discutimos sobre los NC formados al mezclar las suspensiones de AuNP y CS, y sobre la capacidad del biopolímero de prevenir la agregación de las AuNP en un medio con alta fuerza iónica o con bajo pH.

2. Materiales y Métodos

Las nanopartículas de oro recubiertas con citrato se adquirieron de Ted Pella, Inc. (Redding, CA).

El CS MMW (448877-250G) se adquirió de Sigma-Aldrich. La disolución del biopolímero se realizó a una concentración de 10^{-3} g/mL y pH igual a 4 utilizando para ello ácido acético glacial. Tras agitar durante 24 h, la disolución se filtró utilizando filtros de diámetro de poro igual a $0.45 \mu\text{m}$ y $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro.

Para preparar los NC compuestos de AuNP y CS, se realizó una dilución AuNP:CS 1:1 v:v.

Para ajustar el valor de pH se utilizó ácido acético para ajustar a $\text{pH} = 4$ y ácido clorhídrico para $\text{pH} = 2$. Para ajustar el valor de I, se utilizó KNO_3 en disolución.

Las medidas de diámetro hidrodinámico consistían en 90 medidas de 10 runs y 10 segundos por run sin retraso entre las diferentes medidas. Cada ensayo se prolongaba durante unas 4 horas aproximadamente. Hemos comprobado que este protocolo rinde resultados muy reproducibles en la distribución en intensidad y número. El resultado indicado en esta memoria es la media de las medidas realizadas.

El análisis del potencial Z se realizó utilizando el mismo dispositivo. En este caso, cada medida consistió en 6 medidas en las que se aplicó los parámetros de calidad del software.

3. Resultados y discusión.

Para desarrollar los objetivos que nos marcamos en este capítulo hemos trabajado con tres sistemas, estos son: 1) la suspensión de AuNP, 2) la disolución de CS 10^{-3} g/mL y 3) la mezcla de la suspensión de AuNP y la disolución de CS. La temperatura de trabajo fue $25\text{ }^\circ\text{C}$. La suspensión de AuNP tenía una concentración igual a 2.85×10^{12} partículas/mL y la concentración de la disolución de CS era 10^{-3} g/mL. El principal objetivo fue determinar como interaccionan las AuNP con los agregados de CS formados por las cadenas de CS en disolución del polímero, tanto en ausencia como en presencia de sal. En el caso del estudio en presencia de sal, la fuerza iónica de la suspensión se incrementó hasta $I=0.25\text{M}$ mediante la adición de NaNO_3 . La fuerza iónica se fijó en 0.25M debido a que en este valor de fuerza iónica, las AuNP agregan de forma muy rápida (Pamies et al., 2014).

La mayoría de los experimentos se realizaron a $\text{pH} 4$ porque a este valor de pH , las AuNP no mostraron agregación, al menos en tiempo de experimentación, mientras que el CS MMW 10^{-3} g/mL se disolvía fácilmente. Por otra parte, utilizamos ácido acético para fijar el pH y no tampón acetato debido a que el incremento de fuerza iónica asociado al uso del tampón inducía una fuerte agregación de las AuNP. De forma paralela, desarrollamos algunos experimentos a $\text{pH} 2$ mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) para determinar si el CS conseguía impedir la agregación de las AuNP a bajo pH . Además, comprobamos que un pH mayor a 4 no inducía la agregación de las AuNP, al menos hasta un pH igual a 9.

3.1. Influencia del pH y de la fuerza iónica en la suspensión de AuNP.

El pH de la suspensión comercial de AuNP era 5.5. Para comprobar el efecto del pH, se prepararon diluciones 1:1 con disoluciones de HCl o NaOH que tenían diferentes valores de pH, a fin de variar el pH de la suspensión de AuNP. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante DLS (Figura IV.1), la agregación de las AuNP es tanto más rápida cuanto más bajo es el pH. De esta forma, un descenso en el pH de la suspensión de AuNP hasta un valor igual a 1.8 o 2.5 indujo una agregación casi instantánea, mientras que un aumento del pH hasta un valor de 9.8 no dio lugar al cambio en el valor de diámetro hidrodinámico de las partículas de la suspensión.

Es necesario tener en cuenta que al adicionar un ácido o una base a una suspensión, el pH de la misma cambia de forma instantánea, sin embargo la cinética de cambio de las partículas presentes en la suspensión puede llevar más o menos tiempo en función del tipo de partículas que se hallen en la misma y de lo importante que sea el cambio en el pH. Así, pasadas 24 horas, el análisis de DLS indicó que las únicas suspensiones en las que no se produjo la agregación de las AuNP eran las que tenían un pH igual o superior a 5.5 (Figura IV.2). Además, las suspensiones de pH 1.8 y 2.5 presentaban un precipitado de color rojizo en la base de la cubeta de medida, resultado de la agregación y posterior precipitación de las partículas de la suspensión.

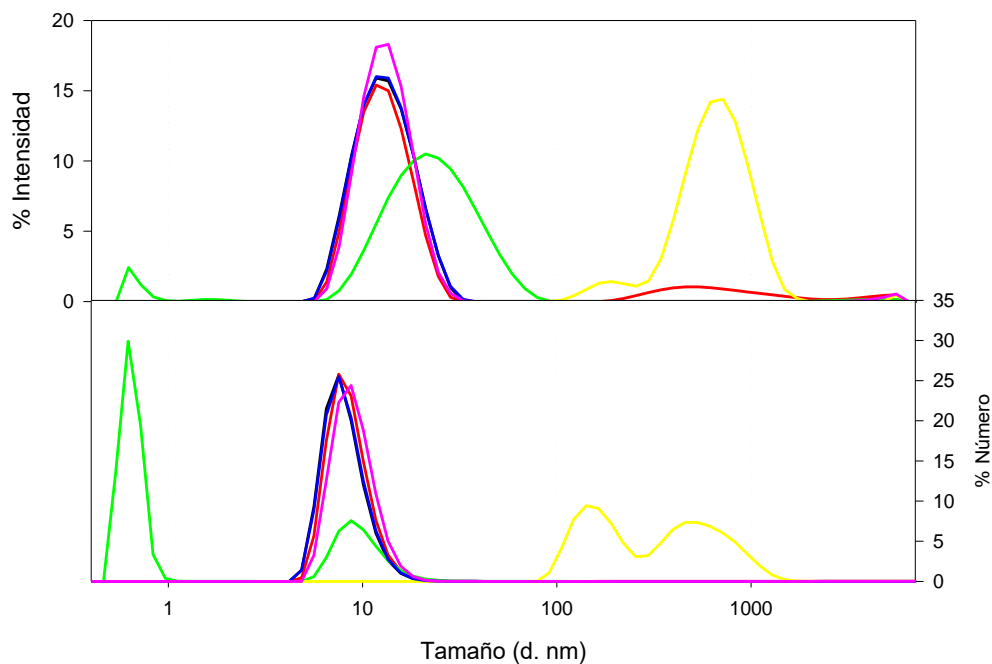


Figura IV.1. Diámetro hidrodinámico de las AuNP en función del pH del medio en el momento en el que se varió el pH. Los valores de pH a los que se expusieron las AuNP fueron 1.8 (amarillo), 2.5 (verde), 3.6 (rojo), 4.0 (rosa), 5.5 (negro) y 9.8 (azul).

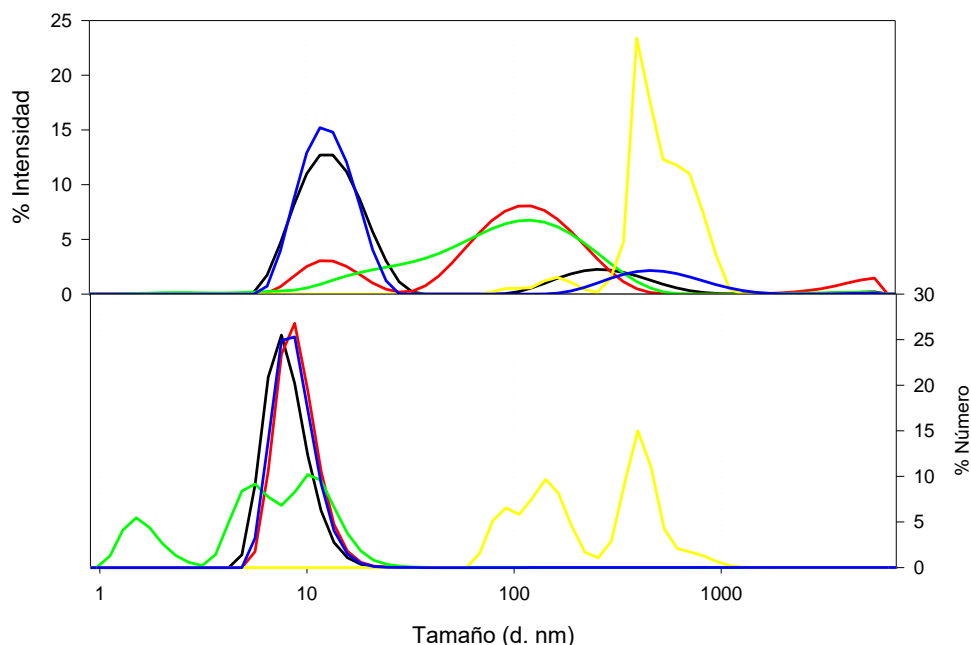


Figura IV.2. Diámetro hidrodinámico de las AuNP en función del pH del medio. Estas medidas corresponden a 24 h tras la variación del pH. Los valores de pH a los que se expusieron las AuNP fueron 1.8 (amarillo), 2.5 (verde), 3.6 (rojo), 5.5 (negro) y 9.8 (azul).

Para completar la caracterización de la agregación de las AuNP, se midió su espectro de absorción UV-Vis al ser expuestas a los distintos pH. Como puede observarse en la Figura IV.3, el máximo de absorbancia se desplazó hacia valores mayores de longitud de onda cuando el pH de la suspensión disminuyó. En los primeros instantes tras la variación del pH, la variación de $\lambda_{m\acute{a}x}$ se observa claramente en la suspensión de pH igual a 1.8, en el que fue imposible detectar el máximo de absorción. Sin embargo, para valores mayores de pH, la variación inicial de $\lambda_{m\acute{a}x}$ es discreta. Para facilitar el análisis, el valor exacto del máximo de absorción para cada curva está reflejado en la Tabla IV-1.

El análisis de los $\lambda_{m\acute{a}x}$, permitió comprobar que las AuNP al ser expuestas a un pH igual a 2.5 mostraban una agregación incipiente, ya que el máximo migró desde $\lambda = 521.6$ nm de la suspensión comercial de AuNP hasta $\lambda = 529.5$ nm. Para el resto de valores de pH, no se observó agregación, ya que el $\lambda_{m\acute{a}x}$ fue prácticamente igual al de la suspensión comercial.

Sin embargo, pasadas 24 h, no fue posible encontrar $\lambda_{m\acute{a}x}$ en las suspensiones con pH igual o inferior a 2.5 (Figura IV.3) y la suspensión con pH igual a 3.6 mostró un pico ligeramente desplazado hacia los valores mayores de λ , concretamente 524.4 nm (Tabla IV-1), reforzando los resultados obtenidos al medir el diámetro hidrodinámico de las AuNP tras 24 h de exposición a pH 3.6 (Figura IV.2). En el caso de las demás condiciones de pH, el pico no mostró variación respecto a la situación inicial.

Tabla IV-1. Valores de máxima absorbaUV-Vis de las AuNP expuestas a distintos pH en el momento del cambio del valor de pH del medio o 24 h después.

pH	0 horas	24 horas
1.8	Ø	Ø
2.5	529.5	Ø
3.6	522.4	524.4
5.5	521.6	521.9
5.9	521.0	521.4
9.8	522.4	521.7

Ø: no se obtuvo un pico en la medida de absorbancia.

Respecto a la variación de fuerza iónica (I) de la suspensión de AuNP, consideramos la I propia de la suspensión comercial como referencia y le atribuimos valor 0. Posteriormente, aumentamos la I del medio usando diluciones de KNO₃ a diferente concentración, a fin de que pudiéramos conseguir diferentes I finales mediante diluciones en las mismas condiciones para todas las muestras y evitar así posibles efectos derivados de la dilución.

Como puede verse en la Figura IV.4, un aumento de la I indujo una rápida agregación de las AuNP para valores de I iguales o superiores a 1.0 M. Estos resultados confirman los resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación (Pamies y colaboradores, 2014). En aquella ocasión, el valor de I a la cual se observó un incremento en el diámetro hidrodinámico de las AuNP fue 0.08 M.

De forma complementaria, igual que en el estudio del efecto del pH, se estudió el espectro de absorbancia de las suspensiones de AuNP expuestas a diferente I. Un incremento en esta, dio lugar a una rápida agregación (Figura IV.5). Un incremento en la I hasta un valor de 0.05 M dio lugar a un desplazamiento del pico hacia valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ mayores. Concretamente, desde $\lambda = 521$ nm para la suspensión comercial hasta $\lambda = 598$ nm en el caso de $I = 0.05$ M y $\lambda = 601$ nm en el caso de $I = 0.5$ M. Un comportamiento semejante de agregación se describió en un trabajo previo de nuestro laboratorio, en el cual se observó una fuerte agregación de las AuNP cuando la I era superior a 0.08 M (Pamies et al., 2014).

Por tanto, concluimos que las AuNP formaron agregados grandes al disminuir el pH de la suspensión. Sin embargo, un descenso moderado del pH, hasta un valor igual a 4, no indujo su agregación o la cinética de agregación era suficientemente lenta para permitir la interacción con el CS. También concluimos que un incremento en la I de la suspensión dio lugar a una agregación rápida de las AuNP.

Para complementar el estudio del estado de agregación de las AuNP, tomamos imágenes de TEM. La Figura IV.6 corresponde a una alícuota de la suspensión comercial utilizada en la que se puede apreciar a las AuNP sin agregar. Cuando se disminuyó el pH de la suspensión hasta pH = 3, se observó una clara agregación de las

nanoestructuras (Figura IV.7). El tamaño de los agregados que se observaban estaba en el mismo rango de diámetro hidrodinámico que mostraron los agregados observados en los análisis de DLS para una disolución de las mismas características.

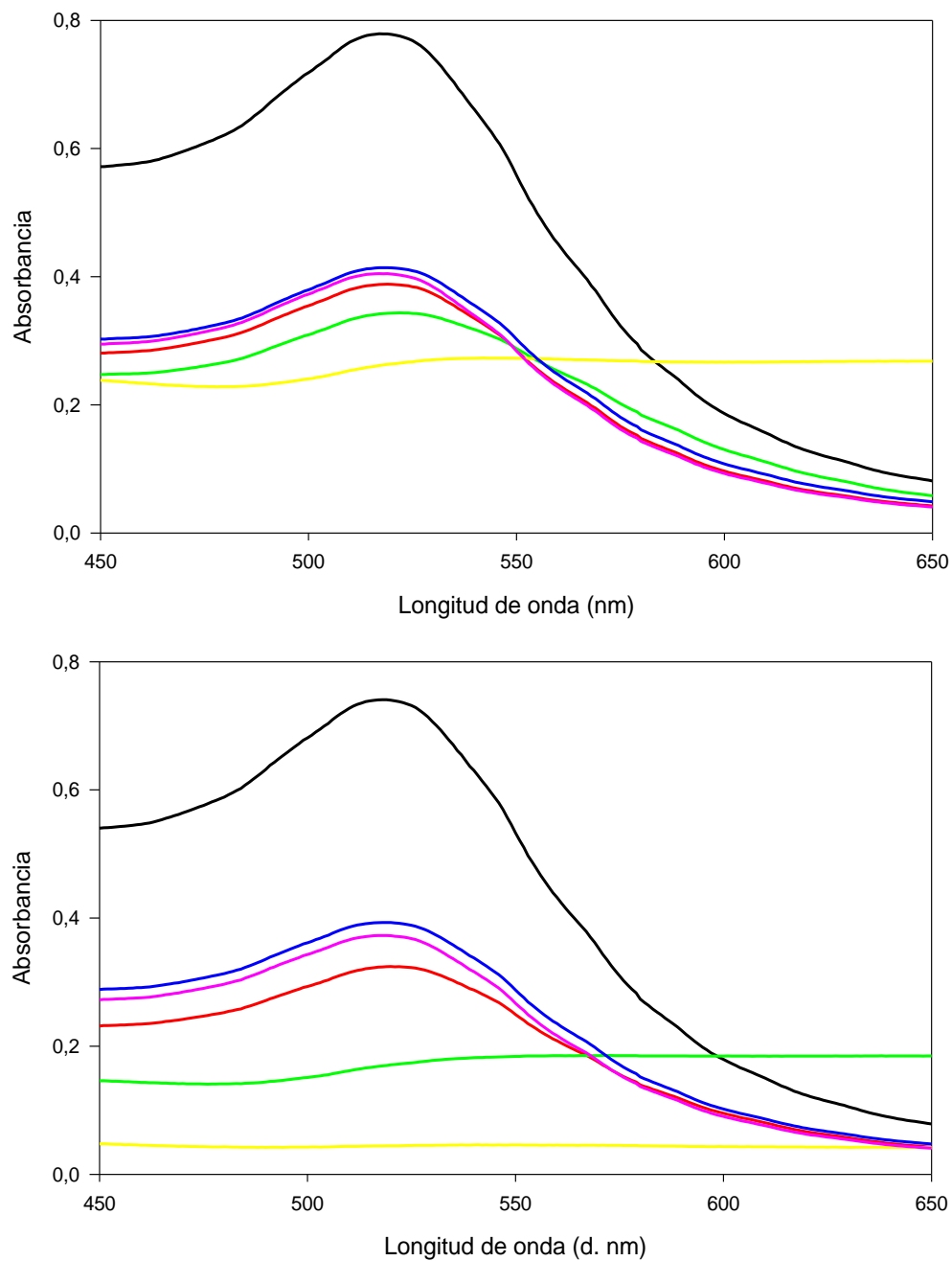


Figura IV.3. Espectro UV-Vis de las AuNP expuestas a diferentes pH en el momento del cambio de pH (arriba) y 24 h después de haber cambiado el pH (abajo). Los valores de pH a los que se expusieron las AuNP fue 1.8 (amarillo), 2.5 (verde), 3.6 (rojo), 5.5 (negro), 5.9 (rosa) y 9.8 (azul).

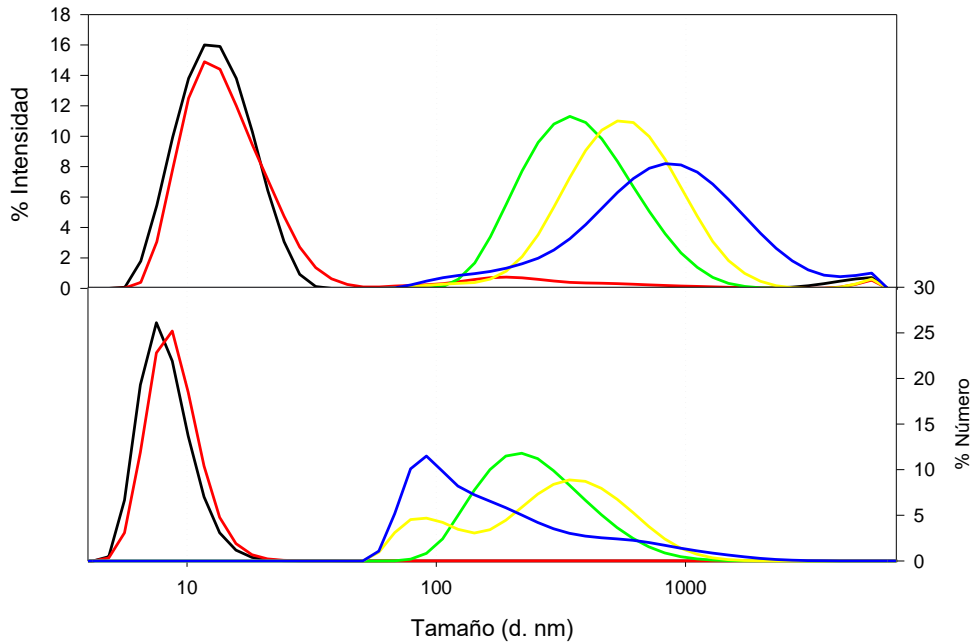


Figura IV.4. Distribución de tamaño de las AuNP en función de la fuerza iónica del medio. Las fuerzas iónicas de las suspensiones representadas fueron 0 M (negro), 0.05 M (rojo) , 0.1 M (verde), 0.25 M (amarillo) y 0.5 M (azul).

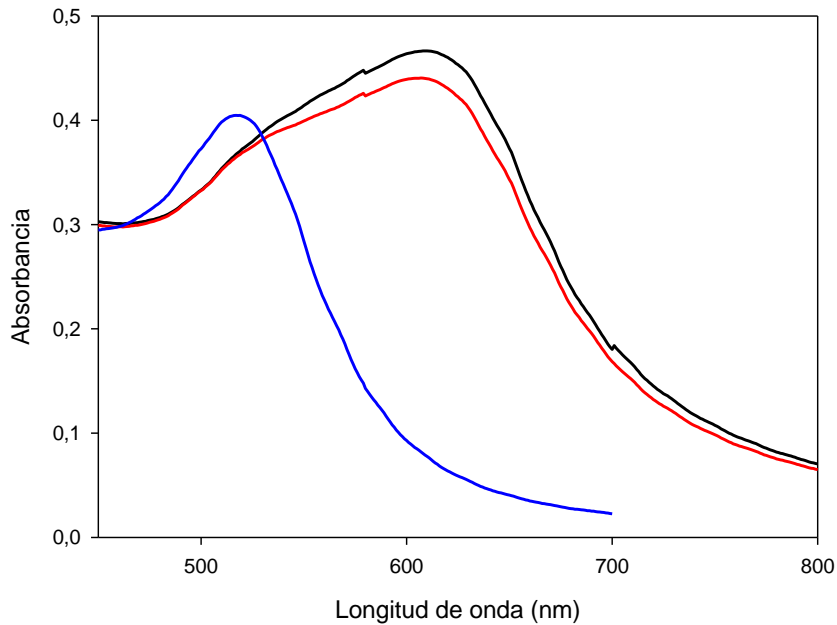


Figura IV.5. Espectro de UV-Vis de las AuNP expuestas a diferentes I (en el momento de cambio de I). Los valores de I a los que se expusieron las AuNP fue 0 M (azul), 0.05 M (rojo) y 0.5 M (negro).

Por último, la Figura IV.8 muestra el estado de agregación de las AuNP expuestas a $I = 0.05$ M. En este caso, la agregación de las nanopartículas dio como resultado la aparición de un agregado mucho mayor de los detectados en el análisis de DLS. En parte debido, a que dichos agregados presentaban un diámetro hidrodinámico mayor

que el máximo detectado mediante la técnica dispersión de luz, cuyo límite está en torno a pocas micras de diámetro hidrodinámico.

3.2. Influencia del pH y de la fuerza iónica en los nanocomposites de AuNP y CS.

Debido a las características intrínsecas del CS (ver capítulo III), las disoluciones del polímero deben tener siempre un carácter ácido. Sin embargo, las AuNP, tal como se ha visto anteriormente en este capítulo, muestran una clara agregación en condiciones de pH ácido. Teniendo en cuenta ambos condicionantes, decidimos estudiar el efecto del pH en unos NC sintetizados a partir de una disolución de CS a pH 3.6, ya que este valor de pH es suficientemente ácido para conseguir la disolución del polímero de CS sin comprometer la integridad del mismo (capítulo III). Además, este valor de pH no induce una rápida agregación de las AuNP, por lo que la interacción entre el CS y las AuNP podría tener lugar antes de que se produjera el colapso de las AuNP.

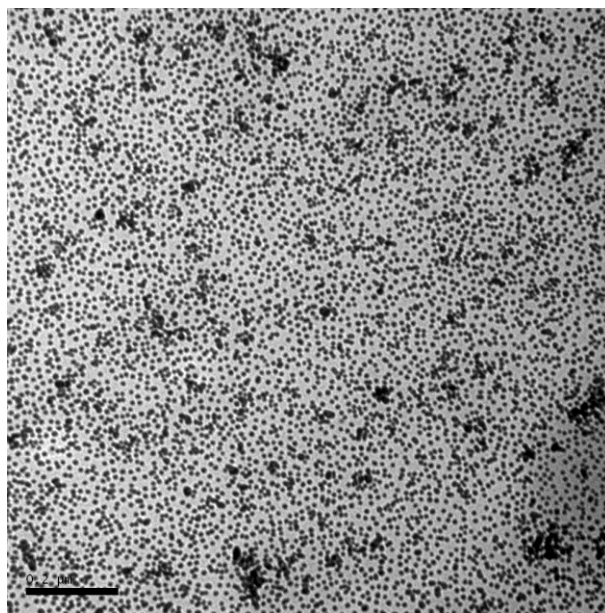


Figura IV.6. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de oro comerciales. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda y representa 0.2 μm .

En la Figura IV.9 aparece representada la distribución en intensidad y número de una suspensión de AuNP, una disolución de CS a una concentración final igual a 10^{-3} g/mL a pH 4 y los NC obtenidos a partir de la mezcla 1:1 v:v de la suspensión y la disolución previamente señaladas. La distribución en intensidad indicó claramente que la interacción entre las AuNP y el CS dio lugar a una reducción de los agregados presentes en la suspensión final. Puede verse que la población principal en la disolución del polímero, que se sitúa alrededor de tres micras de diámetro, migra hacia valores inferiores, centrándose alrededor de 500 nm. A su vez, la población que aparece en torno a los 13 nm de diámetro en la suspensión de AuNP no se encontró. Por lo que la población que aparecía en torno a 500 nm en la suspensión de NC pudo deberse a la

presencia de estructuras de CS que disminuyeron su diámetro hidrodinámico debido al apantallamiento de sus cargas superficiales como consecuencia de la existencia en el medio de AuNP cargadas negativamente. Por lo que, los resultados obtenidos parecían indicar que el CS y las AuNP interactuaban dando lugar a unas estructuras en las que el CS podía actuar como una estructura que atrapara a las AuNP. Por otra parte, en la distribución en número puede observarse una población con diámetro hidrodinámico inferior a 10 nm, ésta población podía estar compuesta por porciones de cadenas del polímero que aparecían como resultado de la degradación en medio ácido (Mironov et al., 2007).

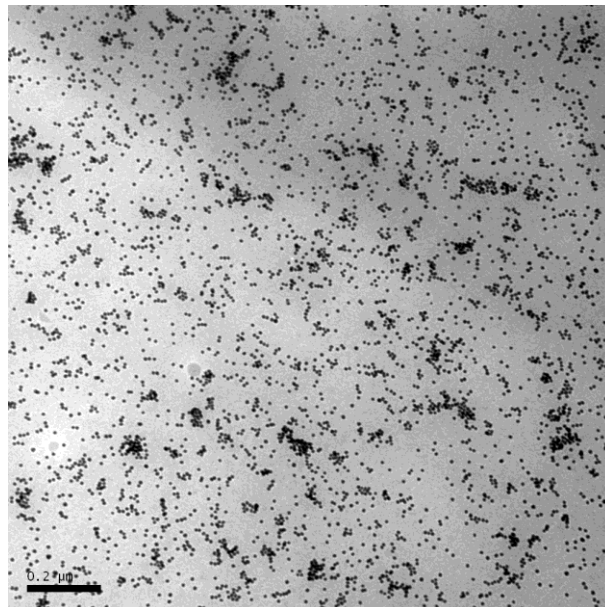


Figura IV.7. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de oro a un pH igual a 3. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda y representa 0.2 μm .

Una vez preparados los NC, variamos el pH del medio para comprobar el efecto de éste parámetro sobre la distribución de los NC compuestos de CS y AuNP. Como resultado de un incremento en el valor de pH del medio, la distribución en intensidad de los NC se volvió más homogénea y monodispersa, y se centró en un valor medio de unos 90 nm. Resulta llamativo el hecho de que la población mostró la misma distribución a pH 5.4 o superior (Figura IV.10). Además, al incrementar el pH no se obtuvo señal de dispersión de luz de partículas inferiores a 10 nm, de modo que la hipótesis de la degradación del biopolímero a pH bajo se vio reforzada.

Para comprobar el efecto que la I tenía sobre los NC compuestos de AuNP y CS, disolvimos CS a concentración igual a 10^{-3} g/mL pH 4.0 y I = 0.25M. Posteriormente, repetimos el protocolo de síntesis de los NC utilizado previamente y medimos el tamaño de los NC presentes en la suspensión.

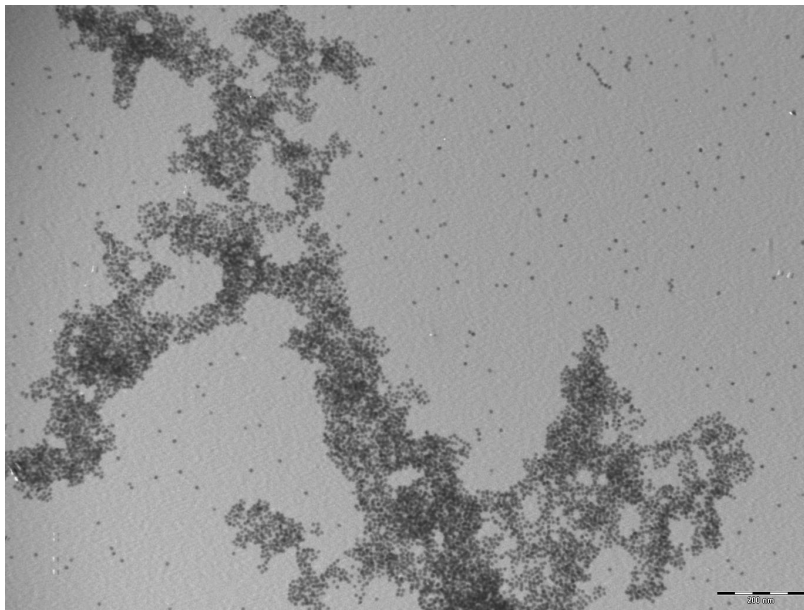


Figura IV.8. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de oro expuestas a una fuerza iónica igual a 0.05 M. La barra de escala aparece en la esquina inferior derecha y representa 0.2 μm .

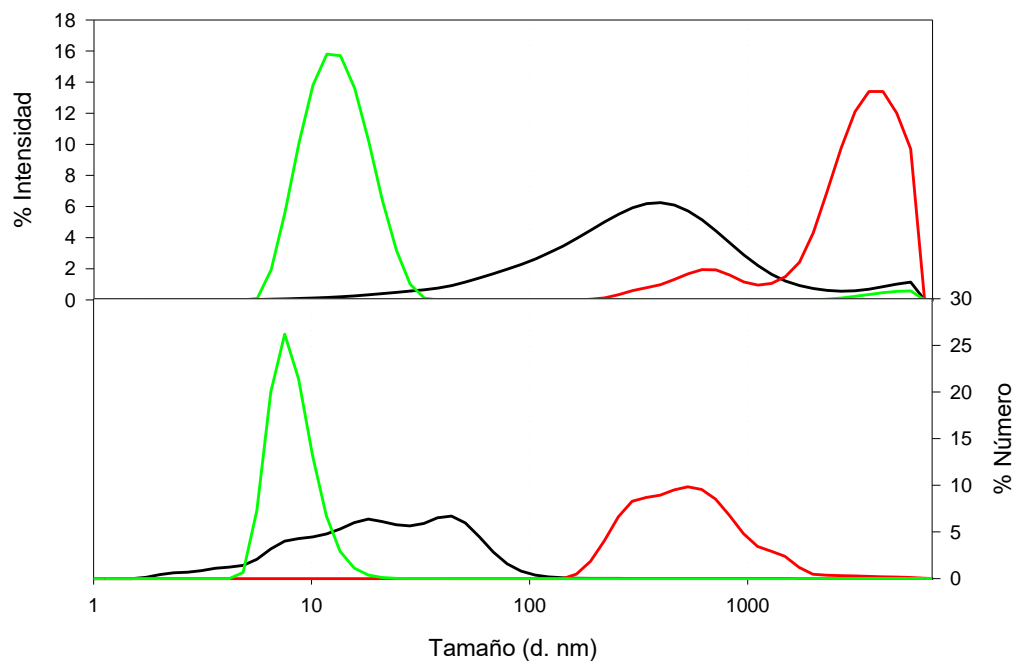


Figura IV.9. Distribución en intensidad y número de las partículas presentes en una suspensión de AuNP (verde), en una disolución de CS (rojo) y en una suspensión de NC compuestos por AuNP y CS (negro).

El valor de I utilizado provoca una fuerte y rápida agregación de las AuNP (Pamies et al., 2014), por lo que al adicionar estas nanoestructuras a la disolución de CS con elevada I , podrían plantearse dos alternativas: bien que las AuNP agreguen como vimos anteriormente o bien que las AuNP interactúen con el CS via interacción electrostática. Como resultado de la primera alternativa, las AuNP formarían agregados micrométricos que se observarían en la distribución en intensidad y quedarían patentes

en la distribución en número obtenidas en la medida en DLS. Sin embargo, el resultado obtenido (Figura IV.11) reveló una clara ausencia de tales estructuras por lo que la interacción de las AuNP con el CS parece más acertada. Los resultados obtenidos indicaron que el CS estabilizaba a las AuNP, evitando la agregación de las mismas, de una forma muy eficiente.

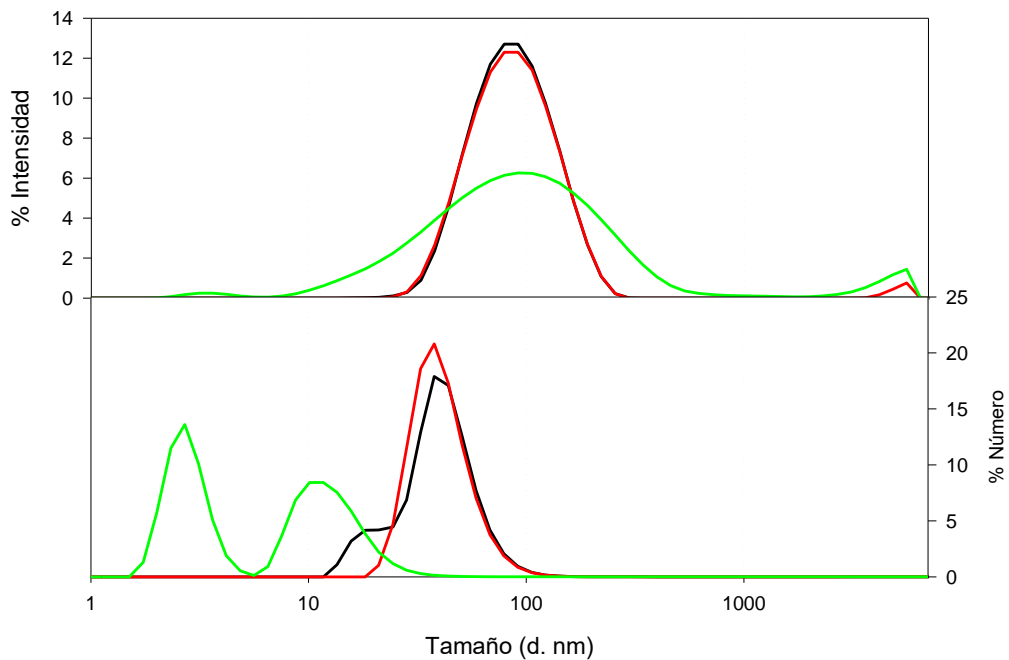


Figura IV.10. Distribución en intensidad y número de nanocompuestos compuestos de AuNP y CS expuestos a pH 3.6 (verde) 5.4 (rojo) o 6.1 (negro).

Como se explicó en el capítulo III, la presencia de iones NO_3^- produce un apantallamiento de cargas en la superficie de las cadenas y agregados de CS que da lugar a estructuras menos extendidas. La distribución en intensidad reveló que el incremento en la I del medio dio lugar a una disminución del tamaño de los NC, debido al apantallamiento sobre la superficie del CS que producen tanto la presencia de los aniones de la disolución como las AuNP.

Parece claro que cuando las AuNP se adicionaron a una disolución de CS en condiciones de pH e I favorables para la rápida agregación de las primeras, dicha agregación no tuvo lugar debido a la rápida y eficiente interacción con las estructuras de CS.

Para confirmar el estado de agregación de las AuNP, se llevaron a cabo medidas de los espectros en la región UV-Vis de los NC en las distintas condiciones analizadas. En condiciones de no agregación, el $\lambda_{m\acute{a}x}$ de las AuNP a pH 4 se situó aproximadamente a $\lambda = 520$ nm. En el caso de los NC compuestos de AuNP y CS en las diferentes condiciones de pH e I, no se registró una diferencia significativa en cuanto a la posición del máximo de absorbancia (Figura IV.12).

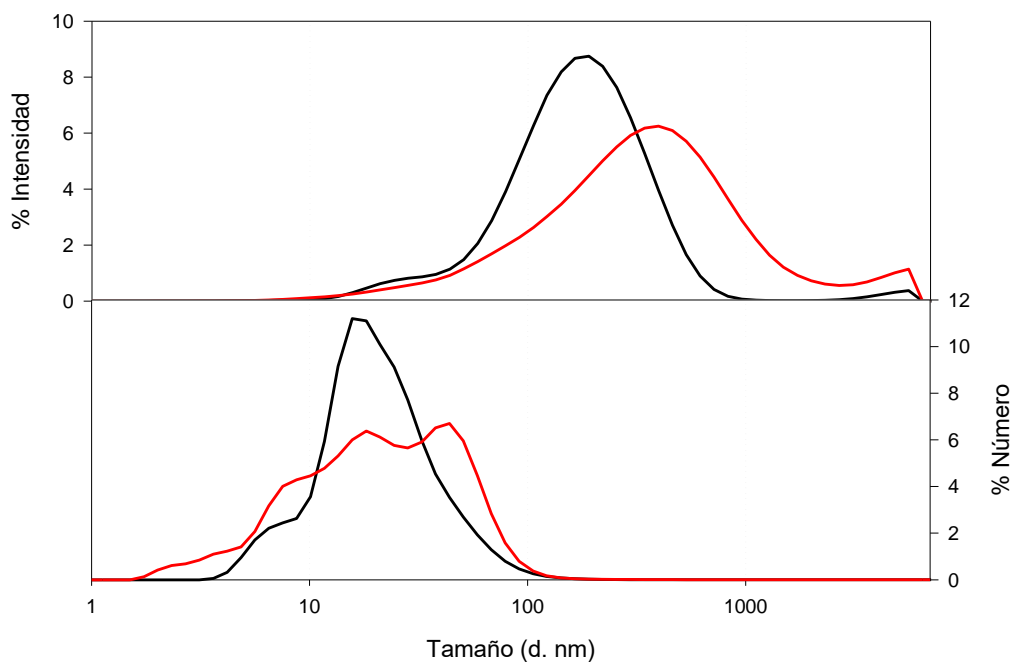


Figura IV.11. Distribución en intensidad y número de nanocompuestos compuestos de AuNP y CS a $I = 0$ M (rojo) o $I = 0.25$ M (negro).

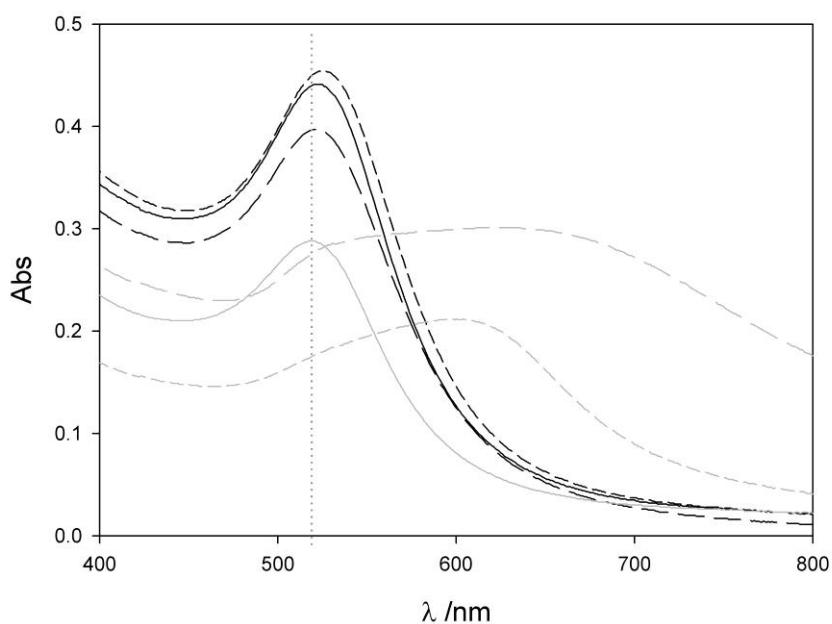


Figura IV.12. Espectros de absorbancia Vis-UV de AuNP (líneas grises) y NC compuestos por AuNP y CS (líneas negras). Las líneas representan las suspensiones a $\text{pH} = 4$ (línea continua), a $\text{pH} = 2$ (línea de trazos largos) y $I = 0.25$ M (línea de trazos cortos). Como control se incluye una línea vertical que corresponde a $\lambda = 518$ nm.

Los resultados de DLS y espectrofotometría demostraron que ni a bajo pH ni a elevada I se producía la agregación de las AuNP en presencia de CS, ya que la formación de NC era un proceso muy rápido y las estructuras obtenidas muy estables. No obstante, un

análisis más detallado del $\lambda_{m\acute{a}x}$ en cada condición indicó que se produjo un ligero desplazamiento hacia λ mayores, concretamente 524 nm.

Nuestra hipótesis es que las AuNP al interactuar con las estructuras de CS quedaban adsorbidas en la superficie del polímero. Esta hipótesis explicaba tanto los resultados obtenidos mediante DLS como mediante espectrofotometría por las siguientes razones:

Primero, la posición de $\lambda_{m\acute{a}x}$ en todos los casos era muy similar al que mostraban las AuNP libres. Sin embargo, no se observaron tales nanopartículas libres en las medidas de DLS. La razón para estos resultados, que inicialmente parecían contradictorios era que las AuNP no podían moverse libremente en la suspensión ya que estaban atrapadas en los agregados de CS.

Segundo, el desplazamiento hasta λ ligeramente superior registrado en los NC respecto al valor inicial de la suspensión de AuNP podía explicarse si las AuNP se hallaban próximas unas de otras (Sönnichsen, Reinhard, Liphardt, & Alivisatos, 2005) sin llegar a establecer el contacto necesario para dar lugar a la aparición de agregados grandes, como los que se observaron al exponer a las AuNP a bajos valores de pH o altos valores de I. La aparición de dichos agregados produciría un drástico viraje hacia λ en la región roja del espectro. Esta posibilidad podría tener lugar, si muchas AuNP o agregados de AuNP se agregaran en el interior de las estructuras de CS.

Por último, la buena superposición de las curvas de espectrofotometría en ausencia y presencia de sal, al mismo valor de pH, confirma la rápida inmovilización de muchas AuNP individuales o de pequeños agregados de AuNP en las estructuras de CS, independientemente de las condiciones ambientales.

Para visualizar el tipo de estructuras obtenidas tras la interacción del CS y las AuNP, se tomaron imágenes de TEM y SEM de los NC en diferentes condiciones. La Figura IV.13 corresponde a una imagen de TEM de NC de AuNP y CS a pH 4 e I = 0M. En esa imagen las AuNP aparecían como puntos negros que se agregaban en diferentes regiones, manteniendo la individualidad de las nanopartículas. El tamaño de esos agregados dependía del tamaño de los agregados de CS subyacentes, los cuales son difíciles de intuir en esa imagen.

Para facilitar la identificación del CS en las imágenes de TEM, se aplicó acetato de uranilo (AcUr) al 2% con lo que se consiguió mejorar el contraste del biopolímero. La Figura IV.14 es una imagen tomada a mayor aumento de los NC presentes en la misma suspensión que la figura anterior, es decir I = 0M y pH = 4, pero en esta ocasión se contrastó con AcUr 2%. En esta imagen puede observarse que existían estructuras de CS tanto con AuNP como libres de las mismas. Esta imagen es consistente con una migración $\lambda_{m\acute{a}x}$ hasta 524 nm ya que las AuNP parecen formar asociaciones de partículas individuales que se encuentran suficientemente cercanas como para provocar

una ligera variación del plasmón. Además, se observaban AuNP aisladas en zonas sombreadas, por lo que estaban unidas también a CS.

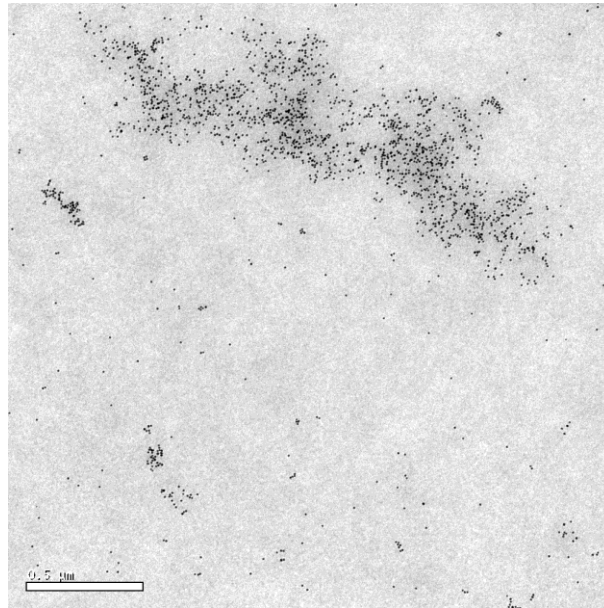


Figura IV.13. Imagen de TEM de NC compuestos de AuNP y CS en una suspensión con $I = 0$ M y $\text{pH} = 4$. La barra blanca en la zona inferior izquierda representa $0.5 \mu\text{m}$.

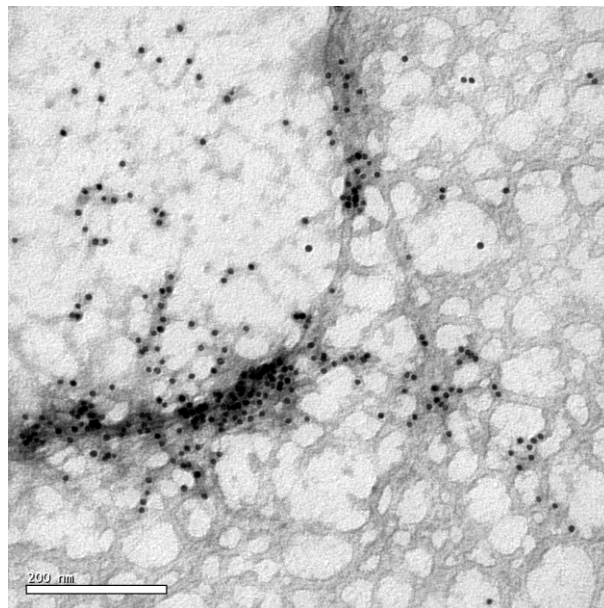


Figura IV.14. Imagen de TEM de NC compuestos de AuNP y CS en una suspensión con $I = 0$ M y $\text{pH} = 4$ tras ser contrastada con AcUr 2% durante 3 minutos. La barra blanca en la zona inferior izquierda representa 200 nm.

Al incrementar la I de la suspensión hasta 0.25 M, obtuvimos imágenes como la Figura IV.15. De nuevo las AuNP se observaban sobre zonas sombreadas de la imagen, revelando la asociación con el CS. En presencia de sal, las estructuras del biopolímero parecían poseer una disposición más compacta que las estructuras observadas en

ausencia de sal. Estos resultados apoyaban la hipótesis planteada, según la cual la presencia de sal induciría la reducción de los agregados de sal.

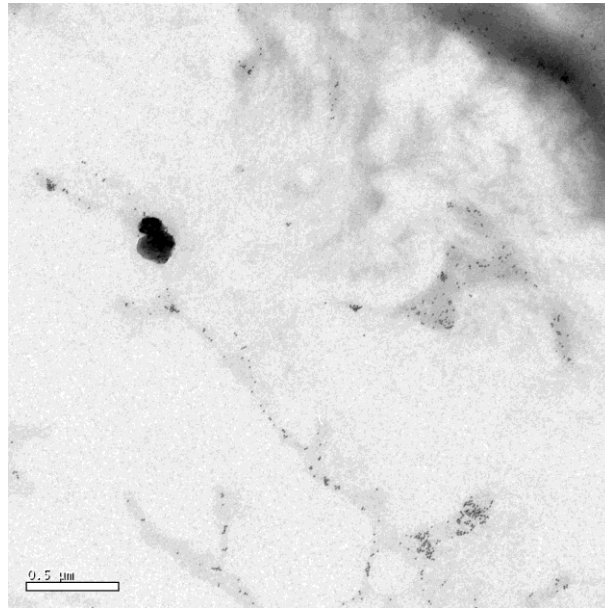


Figura IV.15. Imagen de TEM de NC compuestos de AuNP y CS en una suspensión con $I = 0.25$ M y $\text{pH} = 4$, tras ser contrastada con AcUr 2% durante 3 minutos. La barra blanca en la zona inferior izquierda representa $0.5 \mu\text{m}$.

Finalmente, cabe resaltar que las imágenes de TEM sugerían que las AuNP estaban, de alguna forma, adheridas a la superficie de los agregados de CS. Ya que, si las AuNP pudieran introducirse fácilmente en los agregados del biopolímero, las imágenes mostrarían regiones con una alta densidad de AuNP y la individualidad de las AuNP no podría apreciarse.

De forma paralela, las imágenes de SEM mostraban que los NC formados por la unión de AuNP y CS, mantenían su individualidad (Figura IV.16). El polielectrolito permitía la adsorción de las AuNP en su superficie a la vez que evitaba el colapso de las que se encontraban en la superficie de las estructuras formadas.

4. Conclusiones.

El CS es un polisacárido policatiónico que tras ser disuelto en condiciones ácidas forma agregados (véase capítulo III). Cuando una suspensión de AuNP se añade a una disolución de CS, que, en realidad puede ser considerada como una suspensión de agregados de CS, las nanopartículas metálicas se aproximan a los agregados de CS debido a la interacción electrostática. Estas nanopartículas metálicas se adhieren a la superficie del polisacárido donde permanecen inmovilizadas. Aunque los NC formados de esta forma varían en cuanto al tamaño y la forma, debido a parámetros como pH e I de la suspensión en la que se hallan, raramente se encuentran estructuras de tamaño superior a una micra de diámetro hidrodinámico.

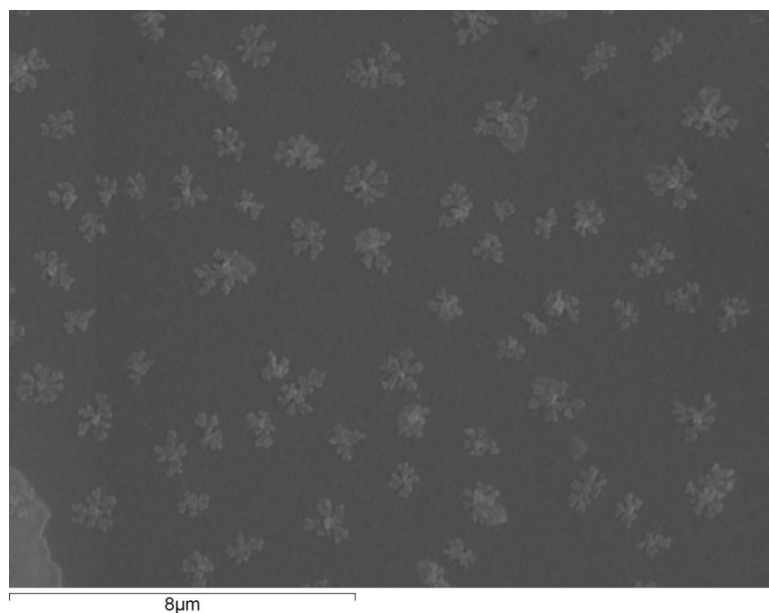


Figura IV.16. Imagen de SEM de NC compuestos de AuNP y CS en una suspensión con $I = 0 \text{ M}$ y $\text{pH} = 4$. La barra de escala aparece en la zona inferior izquierda y representa $8 \mu\text{m}$.

Aunque las AuNP muestran una agregación muy rápida en condiciones de bajo pH o alta concentración de sal, dicha agregación no acontece en presencia de CS. La razón por la cual no se produce la característica agregación de las AuNP es que la formación de los NC es muy rápida y una vez que se produce la interacción entre las nanopartículas metálicas y el CS, las AuNP quedan atrapadas en las redes del biopolímero y no pueden agregar. Las AuNP se distribuyen principalmente en la superficie de las estructuras de CS, de tal forma que están suficientemente cerca pero sin establecer el contacto necesario conducente a la formación de grandes agregados de AuNP. Este hecho explica la migración del $\lambda_{m\acute{a}x}$ del espectro de absorbancia de las AuNP desde 520 nm , que es característico de las AuNP de 13 nm de diámetro hidrodinámico, hasta valores de $\lambda = 524 \text{ nm}$. Como conclusión, el CS previene la agregación de las AuNP.

Capítulo V : CARACTERIZACIÓN DE
NANOCOMPOSITES DE TAMAÑO
NANOMÉTRICO COMPUESTOS DE
QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE ORO.

1. Introducción.

La inestabilidad de las nanopartículas de oro en condiciones fisiológicas hace necesario el uso de estabilizadores que eviten la agregación de las mismas. Sin embargo, aunque han pasado casi tres siglos desde que apareciera la primera referencia del poder estabilizador de los polímeros sobre estas nanoestructuras y se ha avanzado mucho en el campo de su estabilización, esta es aún una tarea pendiente.

Las nanopartículas de oro son especialmente interesantes, por sus propiedades se han desarrollado varias aplicaciones en el sector de la biomedicina (Larguinho & Baptista, 2012; Yavuz et al., 2009). Debido a que estas nanopartículas tienden a agregar en disolución, una estrategia para conseguir su estabilización consiste en recubrirlas con pequeñas moléculas cargadas que actúan como agentes estabilizadores a través de la aparición de fuerzas electrostáticas de repulsión entre las moléculas inmovilizadas en la superficie de las AuNP. Sin embargo, si el medio en el que están inmersas tiene una fuerza iónica suficientemente alta o bajo pH, esas interacciones electrostáticas que impedian la agregación son apantalladas y como consecuencia se produce la agregación de las mismas (Laaksonen, Ahonen, Johans, & Kontturi, 2006; Pamies et al., 2014).

Una solución práctica para poder estabilizar las nanopartículas de oro es añadir algún polímero biocompatible que quede adsorbido en la superficie de las nanopartículas dando lugar a las llamadas nanopartículas *core-shell* (Chatterjee et al., 2014). En las nanopartículas de oro recubiertas con citrato (AuNP), el citrato presenta potencial Z negativo y actúa como puente entre las nanopartículas y un polímero policatiónico (Ojea-Jiménez & Puentes, 2009) como el quitosano. Prado-Gotor y su grupo publicaron el primer intento de sintetizar nanocomposites (NC) compuestos de AuNP y CS de bajo peso molecular (Prado-Gotor et al., 2014). En el citado trabajo, se consiguió el desarrollo de nanoestructuras en las que el biopolímero se disponía alrededor de las AuNP que se disponían en el interior de las nanoestructuras obtenidas.

El primer objetivo de este capítulo es la obtención de nanocomposites formados por CS de peso molecular medio y AuNP. El segundo objetivo es el estudio de la estabilidad a lo largo del tiempo los sistemas obtenidos. Y la caracterización de los mismos después de haberlos expuesto a diferentes condiciones que producen la agregación de las AuNP, como son la temperatura, la sonicación y la liofilización.

2. Materiales y métodos

Las nanopartículas de oro recubiertas de citrato fueron adquiridas de TedPella, Inc (Redding, Ca). El quitosano de peso molecular medio se adquirió de Sigma-Aldrich (448877-250G). Para disolver el quitosano se utilizó ácido acético glacial de Panreac en disolución acuosa a pH igual a 3. Se preparó una disolución inicial de quitosano de concentración 10^{-3} g/mL que posteriormente se diluyó hasta 10^{-5} g/mL en agua mili Q.

Para la síntesis de NC los experimentos comenzaron con 1.5 mL de suspensión de AuNP al que se adicionó de manera controlada un volumen determinado de CS 10^{-5} g/mL (Tabla V-1). Tras la adición del polímero, la muestra se homogeneizó y se midió en el DLS. Para la caracterización mediante medidas de potencial Z, espectrofotometría y estabilidad frente a diversos factores, se inició la síntesis con 1mL al que se adicionó el volumen adecuado para mantener la proporción entre las especies reaccionantes.

Tabla V-1. Volúmenes de disolución de CS 10^{-5} g/mL adicionado a 1 mL ó 1.5 mL de AuNP en la síntesis de nanocomposites de AuNP y CS.

1 mL AuNP	1.5 mL AuNP
20 μ L	30 μ L
100 μ L	150 μ L
246.5 μ L	390 μ L
652.5 μ L	1030 μ L
975.9 μ L	1930 μ L
1617.9 μ L	2530 μ L

Las medidas de dispersión dinámica de luz realizadas durante el proceso de síntesis de los nanocomposites estaban compuestas de 4 repeticiones en las que el propio software del equipo determinaba la duración y el número de subruns en función de los criterios de calidad internos. Respecto a las medidas para comprobar la estabilidad de los nanosistemas obtenidos, se realizaron 5 repeticiones de medidas que estaban compuestas de 5 subruns de 20 segundos cada uno. Cada representación es la media de las repeticiones realizadas en cada condición. Hemos comprobado la reproducibilidad de los resultados en las distribuciones en intensidad, volumen y número.

Cada análisis de potencial Z estaba compuesto de seis medidas en las que el propio sistema determinaba el número de subruns que medía antes de ofrecer el resultado de la medida. El número mínimo de subruns fue 13.

La medida de absorbancia se realizó mediante barrido en el intervalo de 300 nm a 1000 nm, con un paso de banda de 1 nm. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

Un ciclo de sonicación consistió en la aplicación de dos pulsos de ultrasonidos de una duración de 30 segundos con períodos de descanso de otros 30 segundos. El tiempo total de sonicación fue de 1 minuto por ciclo. La amplitud se fijó en el 30 %. El número total de ciclos de sonicación aplicados fue 0, 1 o 2 (indicado en el texto).

3. Resultados y discusión.

3.1. Síntesis de nanocomposites de nanopartículas de oro y quitosano.

Las nanopartículas de oro recubiertas de citrato (AuNP) interactúan con el quitosano (CS) y como resultado de dicha interacción se obtienen nanocomposites (NC). En dichos NC, el CS actúa de andamio sobre el que se disponen las AuNP. En este capítulo, hemos intentado desarrollar un método mediante el cual se puedan sintetizar NC de tamaño controlado.

- Interacción lenta

La síntesis de NC se realizó en un período total de 9 días. El quitosano se adicionó de forma paulatina a una suspensión de AuNP con el fin de permitir que ambas especies interactuaran de forma gradual.

Inicialmente, las AuNP presentan principalmente un diámetro hidrodinámico de decenas de nanómetros (97.7%), aunque una pequeña porción de las AuNP se encuentran agregadas (2.3%). Al adicionar el biopolímero, disminuye la proporción de partículas de diámetro hidrodinámico en torno a decenas de nanómetros y aparece una población en la región de cientos de nanómetros (Tabla V-2). Esta nueva población muestra un diámetro hidrodinámico superior al de las AuNP e inferior al de CS, por lo que debe ser el resultado de la interacción entre ambas especies. Y se observa con la adición de pequeño volumen de la disolución del biopolímero (30 μL) y tras un corto tiempo de interacción (0.25h). Un incremento en el volumen de disolución de CS adicionado hasta 1030 μL y un aumento en el tiempo de incubación, hasta 187 h, dio como resultado la obtención de nanocomposites de aproximadamente 70 nm de diámetro hidrodinámico y la pérdida de AuNP libres. El aumento de volumen de CS adicionado hasta un volumen final de 2930 μL dio lugar a un aumento en el diámetro hidrodinámico de los nanocomposites obtenidos (Tabla V-2).

- Interacción rápida

Se repitió el protocolo de síntesis de los nanocomposites con la única diferencia de permitir la interacción de las especies reaccionantes durante unos pocos minutos. De forma que el proceso se completaba en aproximadamente 3.5 horas.

La distribución en intensidad obtenida por DLS (Figura V.1 y Tabla V-8 del anexo al capítulo IV y Tabla V-2) indicó que cuando se adiciona un volumen igual a 290 μL de la disolución de CS 10^{-5} g/mL, se obtenían NC que presentaban un tamaño similar al que se obtenía cuando se permitía la interacción durante horas. A diferencia de los resultados obtenidos en aquella ocasión, la población de AuNP libres, no disminuía su señal de forma tan significativa. Una posible explicación para este hecho es que al

disminuir el tiempo entre los eventos de adición de biopolímero, no se concediera el tiempo suficiente para que la interacción entre las diferentes especies de la suspensión se realizara como se realizó previamente. Por otra parte, si se adicionaba más cantidad de CS a la suspensión, la población de NC de cientos de nanómetros aumentaba su proporción.

Tabla V-2. Diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en las suspensiones de AuNP, CS 10^{-5} g/mL y en las suspensiones de AuNP tras adicionar el volumen, en μL , indicado.

		Intensidad		Número	
		Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
AuNP		14 \pm 5 4356 \pm 943	97.7 2.3	8 \pm 2	100
CS 10^{-5} g/mL		493 \pm 305 4453 \pm 1049 46 \pm 18	75.6 12.7 11.7	27 \pm 10 306 \pm 180	100 0
Volumen de disolución de CS 10^{-5} g/mL adicionado	Tiempo desde el inicio (h)	Intensidad		Número	
		Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
30 μL	0.25	18 \pm 5 411 \pm 88	57.4 42.6	12 \pm 3	100
310 μL	67	146 \pm 94 17 \pm 6 3691 \pm 1219	69.1 23.8 7.1	11 \pm 3	100
1030 μL	187	67 \pm 31 4815 \pm 816	97.5 2.5	27 \pm 10	100
1930 μL	190	245 \pm 138 4754 \pm 766	98.6 1.4	37 \pm 5 87 \pm 46	21 79
2930 μL	192	1639 \pm 349 959 \pm 97	68.4 31.6	1283 \pm 310	100

Existen diferencias importantes entre los resultados obtenidos al aplicar ambos métodos. Por una parte, los NC nunca presentaron un diámetro hidrodinámico mayor de cientos de nanómetros. Por otra parte, siempre aparecía una proporción de AuNP libres en los gráficos de DLS.

Para llevar a cabo la caracterización mediante otras técnicas y la caracterización de la estabilidad en función de las condiciones del sistema, utilizamos NC sintetizados mediante interacción rápida. Preparamos 5 suspensiones diferentes (Tabla V-1) que correspondían a diferentes estados a lo largo de la síntesis de los NC. Al final del proceso de síntesis, la distribución por intensidad indicó que los NC sintetizados tenían un diámetro hidrodinámico en torno a 100 nm.

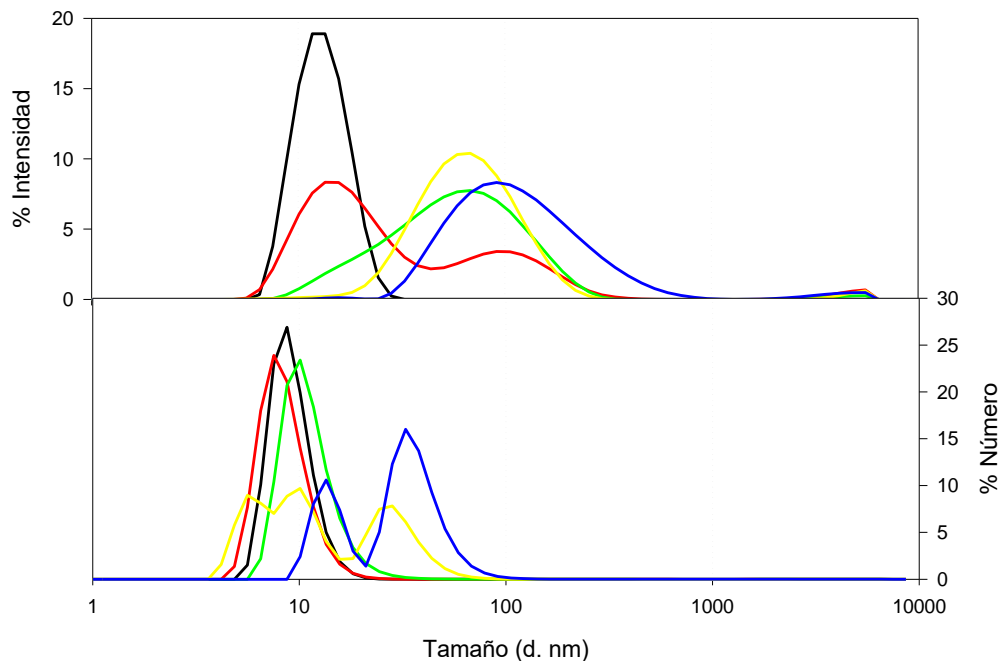


Figura V.1. Representación de los diámetros hidrodinámicos de los composites compuestos de AuNP y CS siguiendo una dinámica rápida de síntesis. Las líneas representan las AuNP a las que se adicionó 0 μL (negra), 290 μL (roja), 1030 μL (verde), 1930 μL (amarilla) o 2730 μL (azul) de CS 10^{-5} g/mL.

Las medidas de potencial Z indicaron que los NC presentaban potencial Z negativo en todas las proporciones analizadas (Tabla V-3), esto indicó que las AuNP estaban, de alguna manera, dispuestas sobre el CS y expuestas en la superficie. Cuando el volumen de disolución del biopolímero adicionado era igual o inferior a 246.5 μL , aparecía más de una población de NC, de acuerdo con los valores de potencial Z. Al aumentar el volumen de la disolución de CS en la muestra, la suspensión se tornó monodispersa con un potencial Z medio en torno a -25 mV, valor que se encontraba fuera del rango de inestabilidad de potencial Z. Como consecuencia, concluimos que las AuNP se disponían sobre el CS, y que el incremento de la presencia del polímero en la suspensión daba lugar a la formación de NC que presentaban una distribución monodispersa y presentaban valores de potencial Z que indican que eran estructuras estables, esto es, que no agregaban.

El análisis de las medidas de espectrofotometría en UV-Vis de los NC sintetizados (Figura V.2) indicó que un incremento en la proporción del biopolímero en la suspensión de NC daba lugar a un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia valores mayores. No obstante, no se observaba agregación de AuNP como podía interpretarse, de forma más precisa, a partir de los datos de longitud de onda de máxima absorbancia de los NC (Tabla V-4).

Tabla V-3. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de NC compuestos de AuNP y CS. Todas las muestras se iniciaron con 1 mL de AuNP y posteriormente se adicionó el volumen indicado de CS 10^{-5} g/mL.

Volumen adicionado	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad	
	(μL)	(mV)	($\mu\text{mcm/Vs}$)	(%)		(mS/cm)
20		-54 \pm 4	28.6	-4.2 \pm 0.3	28.6	0.422
		-126 \pm 9	27.3	-9.9 \pm 0.7	27.3	
		-83 \pm 5	24.2	-6.5 \pm 0.4	24.2	
100		-79 \pm 4	59.5	-6.2 \pm 0.3	59.5	0.365
		-102	29.0	-8.3 \pm 0.5	29.0	
		-143	4.8	-11.2 \pm 0.2	4.8	
246.5		-18 \pm 14	87.4	-1.4 \pm 1.1	87.4	0.339
		-102 \pm 6	7.7	-5.5 \pm 0.6	7.7	
		-96 \pm 5	2.3	-7.6 \pm 0.4	2.3	
652.5		-23 \pm 17	99.9	-1.8 \pm 1.4	99.9	0.298
		-104 \pm 4	0.1	-8.2 \pm 0.3	0.1	
		-15 \pm 4	27.9	-1.2 \pm 0.3	27.9	
975.9		-25 \pm 17	98.6	-2.0 \pm 1.3	98.6	0.285
		-81 \pm 2	0.5	-6.3 \pm 0.1	0.5	
		-95 \pm 5	0.5	-7.4 \pm 0.4	0.5	
1617.9		-24 \pm 7	100	-1.9 \pm 0.5	100	0.284
		-3 \pm 2	0	-0.2 \pm 0.1	0	

Los resultados de DLS, potencial Z y espectrofotometría UV-Vis indicaban que se obtenían NC de tamaño homogéneo mediante un método reproducible y aparentemente escalable.

Las estructuras obtenidas como resultado de la interacción de 1.5 mL de AuNP con 2.53 mL de CS 10^{-5} g/mL se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (Figura V.3). Para aumentar el contraste de la imagen y conseguir visualizar el quitosano, fue necesario tratar la muestra con acetato de uranilo al 2%. Este interaccionó de forma no específica con la muestra y se observó como una estructura grisácea amorfa sobre la que se pudo reconocer las AuNP, que aparecían como un punteado, adheridas a la superficie del biopolímero.

3.2. Estabilidad de los nanocomposites en función del tiempo.

El tamaño de los NC sintetizados se midió por DLS varios meses después de que fueran sintetizados. En la Figura V.4 se representa la distribución de diámetros hidrodinámicos de las suspensiones de NC sintetizados usando el método de interacción lenta de síntesis. Las curvas representadas corresponden a la dispersión de los NC en el momento de la síntesis y dos meses después de la misma. Durante dicho período, los NC se mantuvieron refrigerados. La distribución en intensidad de las partículas en la suspensión después de dos meses muestra una gran heterogeneidad. Este hecho indicó

que la interacción lenta rindió NC no estables que agregaron en las condiciones de almacenamiento.

Tabla V-4. Longitud de onda (λ) de máxima absorción de los NC compuestos de AuNP y CS. Todas las muestras se iniciaron con 1 cm^{-3} de AuNP y posteriormente se adicionó el volumen indicado de CS 10^{-5} g/mL.

Volumen adicionado (μL)	λ de máxima absorción (nm)
0	521.57
20	522.18
100	522.54
246.5	524.40
652.5	527.37
975.9	532.49
1617.9	547.37

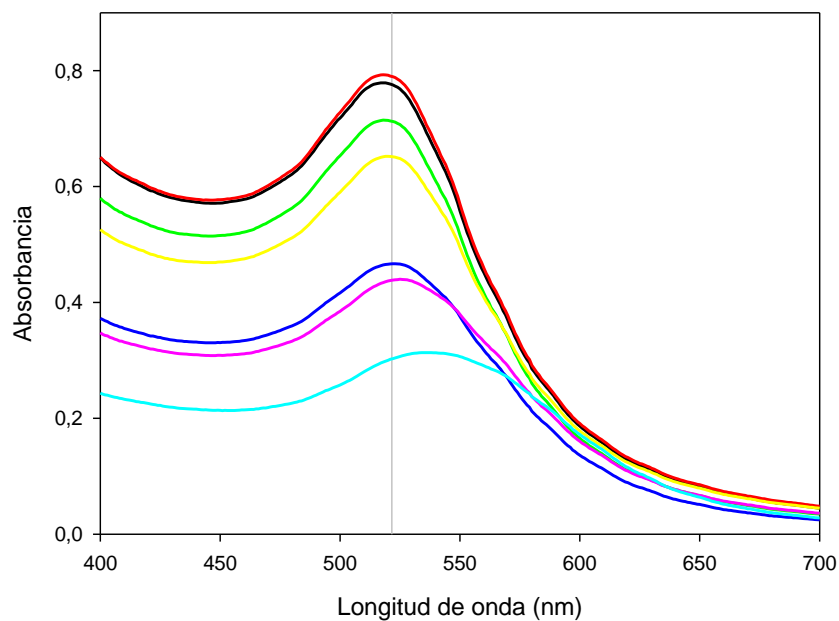


Figura V.2. Representación del espectro de absorción de los NC compuestos de AuNP y CS sintetizados mediante el método rápido de síntesis. Las curvas representan la absorción de AuNP solas (negra) y la de NC sintetizados con 20 μL (roja), 100 μL (verde), 246.5 μL (amarillo), 652.5 μL (azul), 975.9 μL (rosa) y 1617.9 μL (cian) de CS 10^{-5} g/mL. La línea gris vertical indica el máximo de absorción de las AuNP.

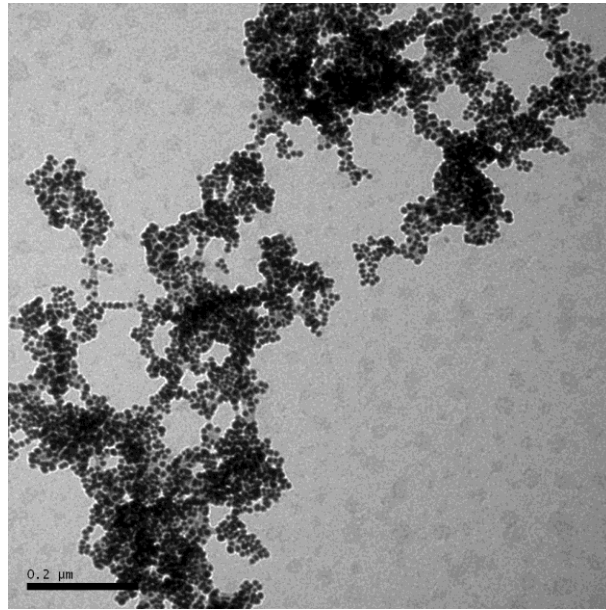


Figura V.3. Imágen de microscopía electrónica de transmisión de nanocomposites compuestos de quitosano y nanopartículas de oro. Para aumentar el contraste, la muestra fue tratada con acetato de uranilo al 2%. La barra de escala aparece en la esquina inferior izquierda y representa 0.2μm.

Respecto a los NC sintetizados permitiendo una interacción rápida entre AuNP y CS, la distribución en intensidad obtenida en el análisis de DLS de los NC en el momento de la síntesis (Figura V.5), mostró que estos tienen un diámetro hidrodinámico en el rango de las decenas a las centenas de nm. Y, de acuerdo a la distribución en número, presentaron una distribución multimodal con un diámetro hidrodinámico en el rango de las decenas de nm. Con el paso del tiempo, se pudo apreciar que el diámetro hidrodinámico de los NC aumentó hasta centrarse en las centenas de nm y la suspensión se homogenizó mostrando una distribución monomodal según el análisis en número. Estos resultados mostraron que existe una población en la suspensión de composites sintetizados que mantuvieron un tamaño nanométrico, al menos durante 4 meses tras la síntesis.

La medida de potencial Z de las muestras de NC a diferentes tiempos (Tabla V-5) mostró que los composites presentaron una carga negativa durante todo el tiempo en estudio. Sin embargo, el valor de potencial Z estaba fuera del rango de inestabilidad durante los dos primeros meses. Después, aunque el potencial Z continuaba siendo negativo, estaba en la región de inestabilidad. El hecho de que el potencial Z estuviera en el rango de inestabilidad indicó que las fuerzas electrostáticas repulsivas que mantenían a los NC separados en la suspensión se debilitaron y podría haber ocurrido fenómenos de agregación. Estos resultados apoyaron las existencia de una población en el rango micrométrico de diámetro hidrodinámico en el gráfico del DLS tras cuatro meses desde la síntesis de los NC (Figura V.5).

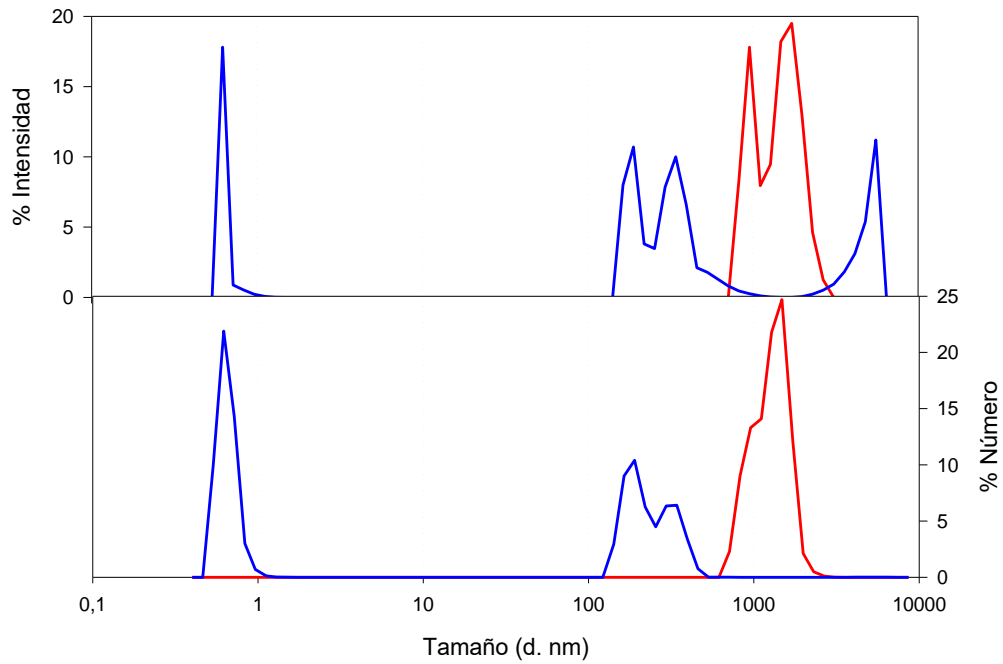


Figura V.4. Distribución de los composites sintetizados mediante el método lento de síntesis. Las distribuciones representadas corresponden al momento de la síntesis (rojo) y a dos meses más tarde (azul).

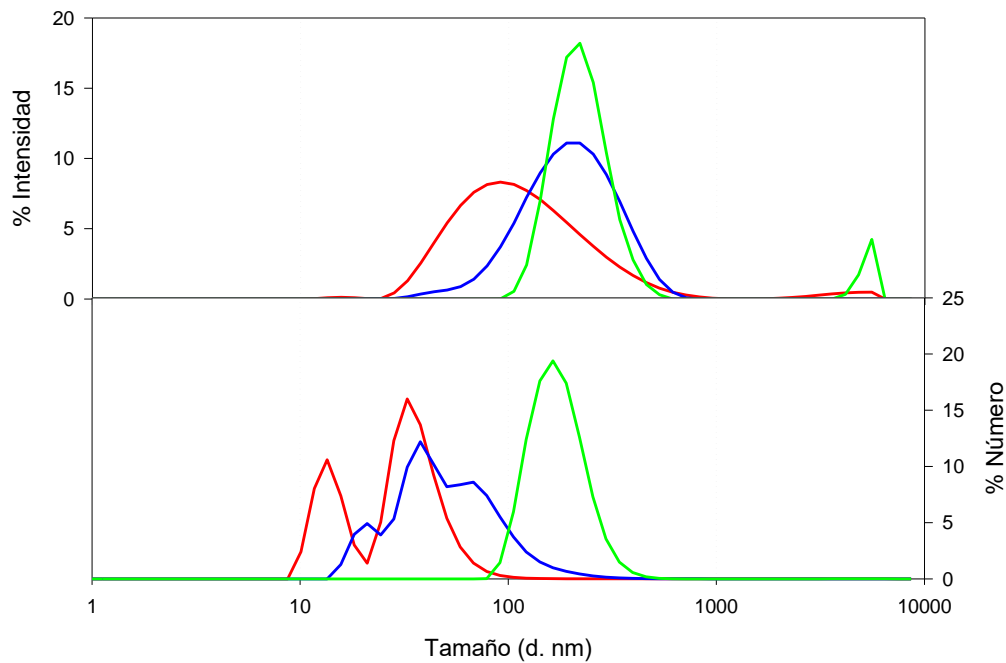


Figura V.5. Distribución de los nanocomposites sintetizados mediante el método rápido en el momento de la síntesis (rojo), dos meses después (azul) y cuatro meses después (verde).

Tabla V-5. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de NC compuestos de AuNP y CS a diferentes tiempos desde la síntesis.

Tiempo desde la síntesis	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad
	meses	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	
0	-24 \pm 7	100	-1.9 \pm 0.5	100	0.284
	-3 \pm 2	0	-0.2 \pm 0.1	0	
2	-24 \pm 5	100	-1.9 \pm 0.4	100	0.299
4	-8.8	99.6	-0.6 \pm 0.7	99.6	0.291
	-107 \pm 7	0.2	-8.4 \pm 0.6	0.2	
	-84 \pm 3	0.1	-6.6 \pm 0.2	0.1	

3.3. Estabilidad de los nanocomposites en función de la temperatura.

Para evaluar el efecto de la temperatura en el tamaño de los NC, se sintetizaron nanoestructuras compuestas de 1 mL de AuNP y 975.9 μL de disolución CS 10^{-5} g/mL. El diámetro hidrodinámico inicial fue 50 nm. Esas nanoestructuras eran comparables a las obtenidas a partir de 1.5 mL de AuNP y 1930 μL de la disolución del biopolímero, que aparece representada en amarillo en la Figura V.1

Los NC se expusieron a una serie de temperaturas ascendentes, desde 25 °C hasta 60 °C, y posteriormente a una serie de temperaturas descendentes, desde 60 °C hasta 25 °C. Para llevar a cabo este experimento, atemperamos la cámara de medición del DLS, y permitimos que la muestra se atemperara durante 3 minutos antes de realizar la medida. El software estaba configurado para que realizara el número de subruns necesario para cumplir con los criterios de calidad del programa. Finalmente, entre el inicio de cada medida paso un período de unos 12 a 17 minutos.

Respecto a la serie de temperaturas ascendentes, la distribución en intensidad mostró una población centrada ente los 35 y los 50 nm en todo el rango de temperaturas medidas. Dichas poblaciones representaban, al menos, el 90 % de las partículas en cada caso. Eventualmente, aparecía una segunda población en el rango micrométrico de diámetro hidrodinámico. Sin embargo, las poblaciones de tamaño micrométrico estaban ausentes en la distribución en número a cualquier temperatura, por lo que la proporción de estructuras más grandes debía ser baja (Figura V.6 y Tabla V-9 del anexo al capítulo V).

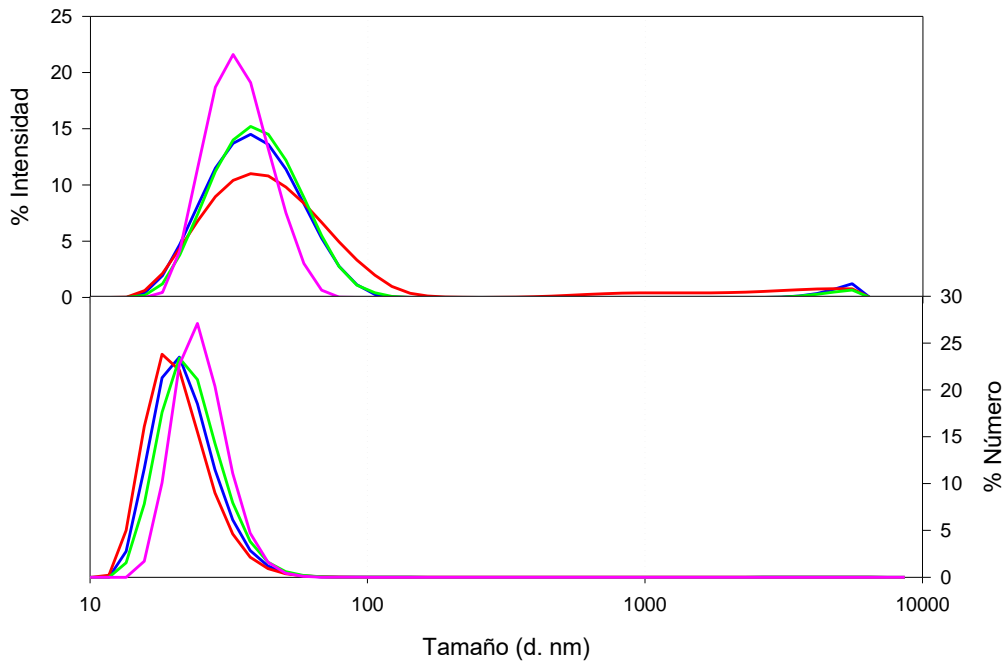


Figura V.6. Distribución de los NC compuestos de AuNP y CS expuestos a un conjunto ascendente de temperaturas: 25 °C (azul), 40 °C (rojo), 50 °C (verde) y 60 °C (rosa).

Las medidas de DLS de las nanoestructuras expuestas a un conjunto de temperaturas descendente (Figura V.7 y Tabla V-9 del anexo al capítulo IV) indicó que los NC no mostraron variación de tamaño significativa. Los resultados indican que las nanoestructuras recién sintetizadas presentaron un diámetro hidrodinámico de (41 ± 16) nm. Al aumentar la temperatura del medio en el que se encontraban, se registró una ligera disminución del diámetro hidrodinámico, hasta alcanzar un valor de (35 ± 9) nm. El descenso de la temperatura de la suspensión revertió el cambio en el diámetro hidrodinámico que volvió a alcanzar el valor de 42 ± 15 nm. No obstante, la distribución en número a 50 °C indica que existe una población de composites de tamaño inferior a diez nm, debido al tamaño que muestra, la explicación más plausible es que se deba a la presencia de porciones de cadenas de CS que quedaran sueltas y que posteriormente, tal como se ve en el resto de las temperaturas, esas partículas están ausentes, posiblemente debido a que estas partículas más pequeñas se combinaron de alguna manera con el resto de partículas de la suspensión.

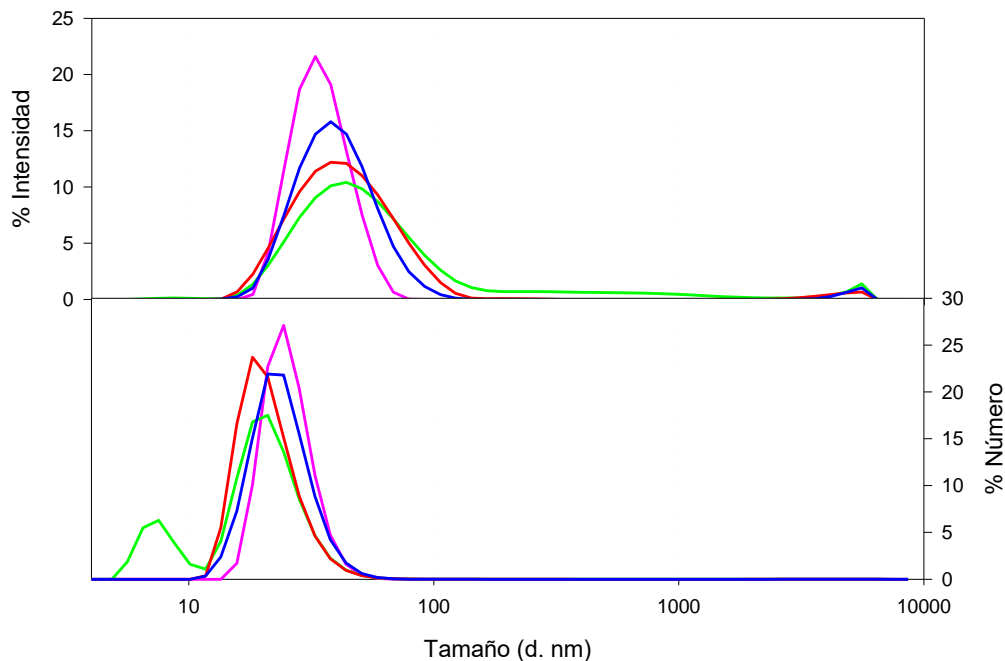


Figura V.7. Distribución de los NC compuestos de AuNP y CS expuestos a un conjunto descendente de temperaturas: 60 °C (rosa), 50 °C (verde), 40 °C (rojo) y 25 °C (azul).

3.4. Efecto de la sonicación sobre los nanocomposites de AuNP y CS.

Eventualmente, la síntesis de NC compuestos de CS y de AuNP rinde nanocomposites de un diámetro hidrodinámico superior a 300 nm, que si bien no representa una proporción elevada de la suspensión (Figura V.8 y Tabla V-10 del anexo al capítulo IV), están presentes. Y probablemente presentan una estructura similar a las estructuras previamente caracterizadas ya que el potencial Z de las nanoestructuras continúa siendo negativo (Tabla V-6), por lo que las partículas de AuNP deben estar localizadas en la superficie de las estructuras.

El espectro de absorbancia de las nanoestructuras presentes en la suspensión está representado en la Figura V.9. De acuerdo con la misma, el máximo de absorbancia se encontraba en 558 nm, por lo que las AuNP no estaban agregadas. La opción más plausible para explicar el resultado obtenido por DLS es que se hubiera producido la agregación de diversos NC para dar lugar a estructuras de diámetro hidrodinámico mayor.

Con el fin de separar los NC, aplicamos unos ciclos suaves de sonicación para no destruir las estructuras de interés. Cada evento de sonicación consistió en 2 ciclos de sonicación al 30% de amplitud de vibración de vástago, de 30 segundos cada uno alternado con 30 segundos de no sonicación. De acuerdo con las medidas de DLS (Figura V.8), tras cada evento de sonicación, la población de NC de mayor tamaño disminuyó y la población de menor diámetro hidrodinámico, aumentó su proporción en

la suspensión. Finalmente, tras dos ciclos de sonicación se obtuvo una distribución monodispersa de nanoestructuras que presenta las AuNP en la superficie, de acuerdo a las medidas de potencial Z (Tabla V-6) y cuyo máximo de absorbancia se desplazó ligeramente hacia valores inferiores, hasta 554 nm (Figura V.9). Los resultados obtenidos, indican que la sonicación, en las condiciones empleadas, no alteró la unión entre AuNP y CS. Y presenta la sonicación como una alternativa para la separación de nanocomposites que resultaran adheridos en el proceso de síntesis.

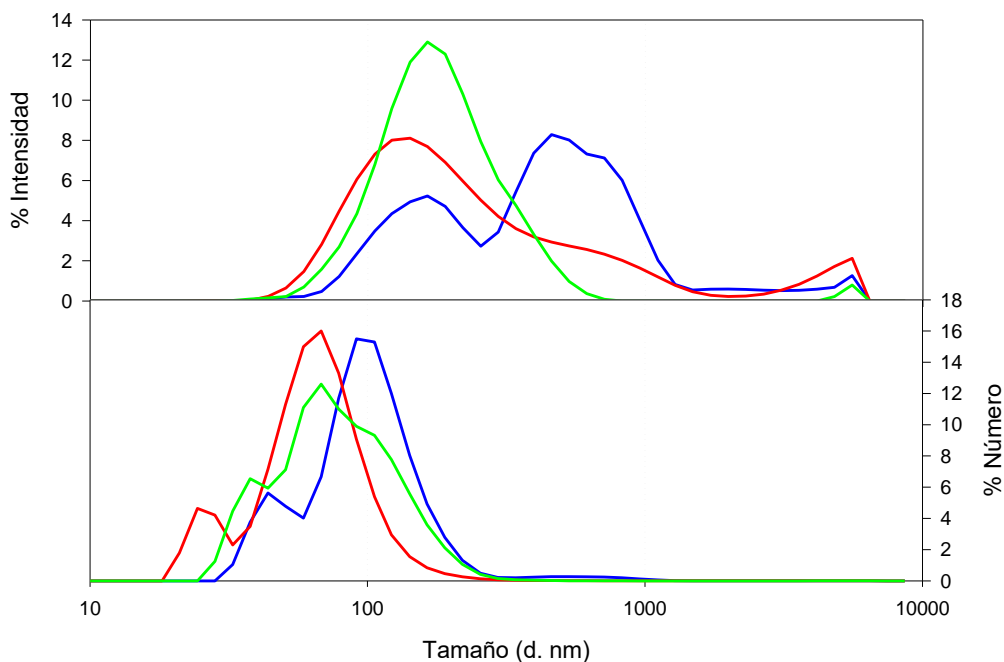


Figura V.8. Distribución de los NC compuestos de AuNP y CS antes (azul) y después de haber sido expuestos a un ciclo (rojo) o dos (verde) de sonicación.

Tabla V-6. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de NC compuestos de AuNP y CS antes y después de ser sometidos a uno o dos ciclos de sonicación.

Ciclos de sonicación	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	(mS/cm)
0	-20±3	100	-1.5±0.3	100	0.287
1	-17±4	100	-1.4±0.3	100	0.316
2	-17±3	100	-1.4±0.3	100	0.299

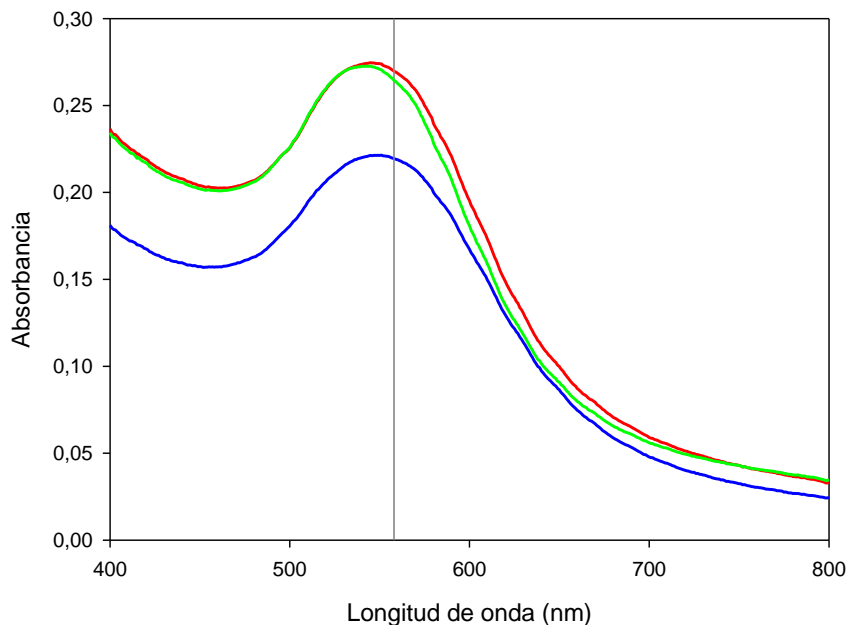


Figura V.9. Espectro de UV-Vis de los NC compuestos de AuNP y CS antes (azul) y después de uno (rojo) o dos (verde) ciclos de sonicación. La línea vertical marca $\lambda=558\text{nm}$.

3.5. Efecto de la liofilización sobre los nanocomposites de AuNP y CS.

Los NC se sometieron a liofilización con el fin de comprobar si este procedimiento era una alternativa de almacenamiento de las nanoestructuras. Con este fin, se usaron NC compuestos de 1 mL de AuNP y 2520 μL de CS 10^{-5} g/mL. Las nanoestructuras presentaban un diámetro hidrodinámico igual a 60 nm (Figura V.10 y Tabla V-11 del anexo al capítulo IV), un potencial Z igual a -22 mV (Tabla V-7) y su máximo de absorbancia se encontraba en 542 nm (Figura V.11).

Tras la liofilización, el liofilizado se resuspendió en agua miliQ. De acuerdo con el resultado obtenido en el DLS (Figura V.9), la distribución en intensidad indica que los NC han aumentado su diámetro hidrodinámico de forma significativa, encontrando ahora dos picos principales centrados en los 215 nm y los 950 nm. Respecto a la distribución en número, los NC presentes en la suspensión habrían triplicado su diámetro hidrodinámico, de modo que el nuevo valor se encuentra en torno a los 170 nm. El valor de potencial Z se encontró en la región de estabilidad (-31 mV) (Tabla V-7). Y el máximo de absorbancia se desplazó hasta 617 nm (Figura V.10), por lo que las AuNP están agregadas. Teniendo en cuenta todos los datos, la explicación más plausible es que durante la liofilización, los NC se acercaron a una distancia suficiente como para que las fuerzas atractivas entre las AuNP vencieran a las repulsivas y finalmente se produjera la agregación.

Tabla V-7. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de NC compuestos de AuNP y CS antes y después de ser sometidos a liofilización.

Liofilización	Potencial Z		Movilidad electroforética		Conductividad
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	(mS/cm)
antes	-22±13	99.9	-1.7±1.0	99.9	0.271
	-82±2	0.1	-6.4±0.1	0.1	
	-96±3	0.0	-7.6±0.2	0.0	
después	-31±4	100	-2.4±0.4	100	0.496

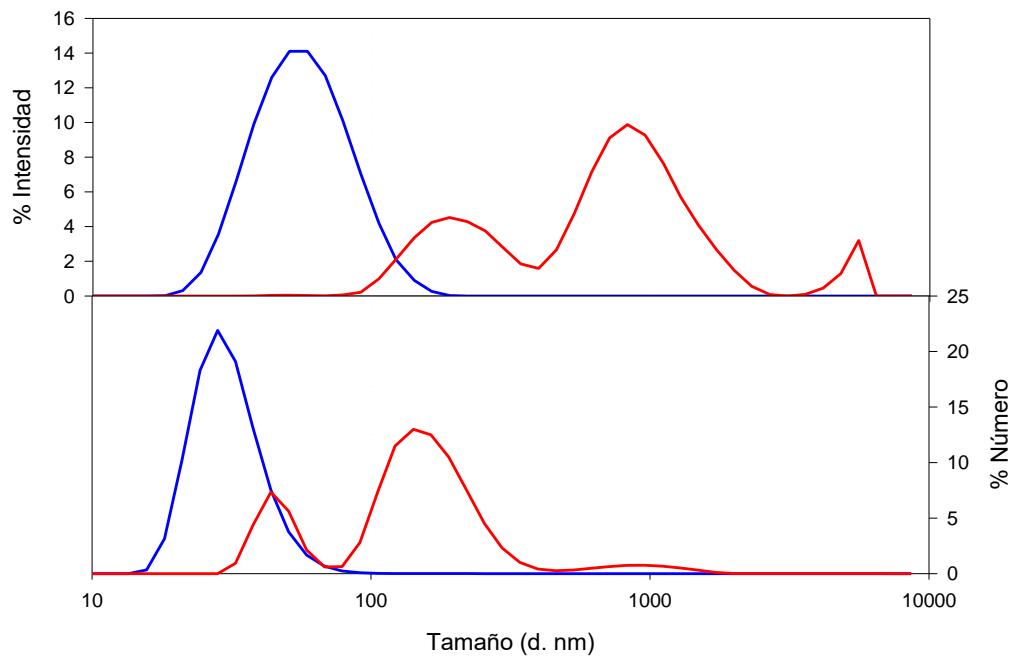


Figura V.10. Distribución de los NC compuestos de AuNP y CS antes (azul) y después (rojo) de la liofilización.

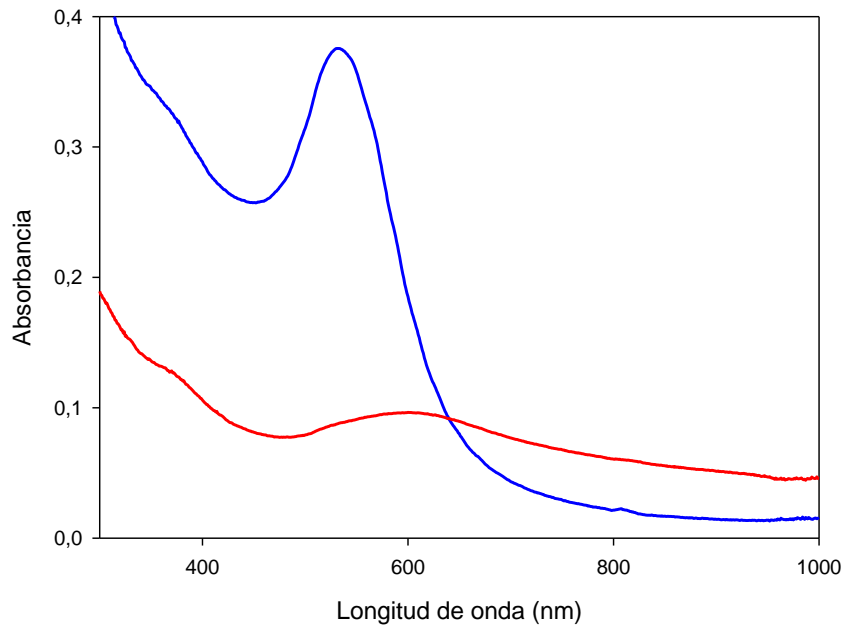


Figura V.11. Espectro de UV-Vis de los NC compuestos de AuNP y CS antes (azul) y después (rojo) de llevar a cabo la liofilización.

4. Conclusiones.

Hemos desarrollado un método para sintetizar NC compuestos de AuNP y CS por el cual obtenemos nanoestructuras de un diámetro hidrodinámico inferior a 100 nm que muestran gran estabilidad, en términos de no agregación, durante, al menos 4 meses. De acuerdo con los resultados de potencial Z obtenidos, el biopolímero el CS actúa de andamio sobre el cual se disponen las AuNP. Estas, de acuerdo a los resultados de espectrofotometría, no estaban agregadas. De modo que el biopolímero actuaba fijando las AuNP e impidiendo su agregación.

Los NC se mostraron estables, en cuanto a diámetro hidrodinámico, en un rango de temperatura amplio, concretamente entre 25 °C y 60 °C. Resisten la sonicación, de hecho, tras la aplicación de una sonicación suave, los NC siguen una distribución monodispersa de tamaños y su potencial Z indicó que las AuNP continúan estando inmobilizadas en la superficie del polímero y la medida del espectro de absorbancia indica que no hay agregación.

Por último, los NC no son resistentes a la liofilización, ya que durante el proceso, las nanoestructuras se acercan y las fuerzas de atracción vencen a las fuerzas electrostáticas de repulsión. Como resultado se produce la agregación de las nanoestructuras a través de la agregación de las AuNP expuestas en la superficie, como se deduce del desplazamiento del máximo de absorbancia del espectro UV-Vis a valores de longitud de onda mucho mayores. .

Anexo al capítulo V.

Tabla V-8. Diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en las suspensiones de NC compuestos de AuNP y CS 10^{-5} g/mL, tras adicionar el volumen, en μL , indicado

Volumen de disolución de CS 10^{-5} g/mL adicionado	Tiempo desde el inicio	Intensidad		Número	
		Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
150 μL	50 min	15 \pm 5	75	8 \pm 2	100
		176 \pm 83	22.4		
		4494 \pm 897	2.6		
390 μL	2 h 10 min	20 \pm 8	52.4	9 \pm 3	100
		84 \pm 41	43.9		
		4579 \pm 852	3.7		
1030 μL	2 h 55 min	70 \pm 48	99	11 \pm 4	100
		4359 \pm 936	1		
1930 μL	3 h 10 min	74 \pm 40	98.5	6 \pm 1	28.8
		4852 \pm 705	1.5	10 \pm 2	35.7
				29 \pm 10	35.5
2530 μL	4h	141 \pm 111	97.3	14 \pm 3	32.4
		4093 \pm 1068	2.4	38 \pm 3	67.6
		16 \pm 3	0.3		

Tabla V-9. Diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en las suspensiones de NC compuestos de AuNP, CS 10^{-5} g/mL al ser expuestos a las temperaturas indicadas.

Temperatura (°C)	Intensidad		Número	
	Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
25	41 \pm 16	97.6	23 \pm 6	100.0
	5014 \pm 634	2.4		
30	37 \pm 13	99.4	24 \pm 6	100.0
	5090 \pm 555	0.6		
40	47 \pm 23	91.3	22 \pm 6	100.0
	3448 \pm 1304	5.8		
	955 \pm 324	2.9		
50	42 \pm 16	98.5	24 \pm 7	100.0
	4893 \pm 680	1.5		
60	35 \pm 9	100.0	26 \pm 6	100.0
50	55 \pm 33	88.6	8 \pm 2	20.0
	688 \pm 515	8.1	22 \pm 9	80.0
	4825 \pm 875	2.8		
40	46 \pm 21	97.6	21 \pm 6	100.0
	4562 \pm 864	2.1		
	210 \pm 38	0.2		

30	46±19 4729±804	97.2 2.8	22±7	100.0
25	42±15 5066±579	98.0 2.0	24±7	100.0

Tabla V-10. Diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en las suspensiones de NC compuestos de AuNP y CS 10^{-5} g/mL tras diferente número de ciclos de sonicación.

	Intensidad		Número	
Número de ciclos de sonicación	Intensidad		Número	
	Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
0	587±243	60.8	47±8	79.9
	155±52	32.5	110±39	1.8
	4530±920	3.5	603±210	
1	282±280	92.7	27±4	12.7
	4372±1056	7.2	73±35	87.3
	28±3	0.0		
2	197±98	99.0	38±5	17.2
	5398±311	1.0	92±42	82.8

Tabla V-11. Diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en las suspensiones de NC compuestos de AuNP y CS 10^{-5} g/mL antes y después de ser liofilizadas.

	Intensidad		Número	
	Intensidad		Número	
	Diámetro hidrodinámico	%	Diámetro hidrodinámico	%
Previo a la liofilización	60±24	100.0	32±10	100.0
Tras la liofilización	948±385	65.6	46±8	20.8
	215±76	29.3	167±59	74.4
	5198±522	5.0	927±311	4.8

**Capítulo VI : QUITOSANO COMO AGENTE
ESTABILIZADOR DE NANOPARTÍCULAS CON
POTENCIAL Z NEGATIVO:
NANOPARTÍCULAS DE ORO Y
NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA.**

1. Introducción.

El campo de la nanomedicina ha experimentado avances significativos durante las últimas décadas. Causa y consecuencia de este hecho es que el diseño de sistemas de liberación de fármacos mejora la eficacia terapéutica de los fármacos y preserva las propiedades de las moléculas bioactivas. Un problema importante que presenta el uso de estos nanosistemas es su tendencia a agregar tras ser expuestos a condiciones fisiológicas. Por ello, actualmente se están dedicando muchos esfuerzos a conseguir la estabilización de los mismos.

Diversos tipos de nanopartículas en suspensión permanecen estables debido a la aparición de fuerzas electrostáticas de repulsión en su superficie (Zhou et al., 2009). Sin embargo, en condiciones de elevada fuerza iónica, se produce el apantallamiento de cargas en la superficie de las nanoestructuras y se produce la agregación de las mismas (Pamies et al., 2014; Zhao et al., 2015). Se ha sugerido el uso de polímeros biodegradables, y más concretamente de polisacáridos, como agentes estabilizadores (Emam & Ahmed, 2016; Vo et al., 2014) tanto para partículas metálicas (Di Carlo et al., 2012; Leiva et al., 2015; Rescignano et al., 2015) como para no metálicas (Dragan et al., 2009; Luo et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Las nanopartículas de fibroína de seda (SFN) (Jastrzebska et al., 2015; Mottaghitalab et al., 2015) y las nanopartículas de oro recubiertas de citrato (AuNP) (He et al., 2015; Hu et al., 2015) son materiales biodegradables y biocompatibles, que por sus características físicas, químicas y biológicas pueden ser procesadas para producir una gran variedad de estructuras. Para evitar la agregación de las AuNP, se han intentado sintetizar nanocomposites de oro y quitosano (CS) usando tanto precursores de oro (Jin et al., 2013; Shih et al., 2009) como nanopartículas de oro recubiertas con citrato (Collado-González et al., 2015; Prado-Gotor et al., 2014). Las SFN tiende a autoagregar en diferentes condiciones (Vepari & Kaplan, 2007; Zhao et al., 2015), por ello, diferentes grupos de investigación han estudiado estructuras compuestas de CS y SFN (Bhardwaj & Kundu, 2011; S. Wang et al., 2015). Sin embargo, no hay en la literatura trabajos sobre el estudio del papel estabilizador del CS sobre las SFN.

En los capítulos IV y V estudiamos la agregación de las AuNP en presencia de CS. Nuestra hipótesis de trabajo es que este biopolímero es capaz de estabilizar tanto nanopartículas pequeñas metálicas, como las AuNP, como nanopartículas más grandes como las SFN. Obteniendo como resultado nanocomposites (NC) que podrían ser usados como nanovehículos para la liberación controlada de fármacos y que las características finales de los NC formados dependen en gran medida de la proporción de CS usada para sintetizar los nanodispositivos.

El objetivo de este capítulo es demostrar la capacidad estabilizadora del CS sobre partículas metálicas, concretamente sobre AuNP y sobre no metálicas, concretamente sobre SFN.

2. Materiales y métodos.

Se prepararon disoluciones de CS y de glicol-CS con una concentración final igual a 10^{-3} g/mL, con pH igual a 3.5-4. Dicho pH se consiguió adicionando a la disolución ácido acético glacial. Se permitió la disolución del polímero durante 24 horas, posteriormente, se filtró utilizando para ello filtros de diámetro de poro igual a $0.45 \mu\text{m}$ y $0.22 \mu\text{m}$. A continuación, se prepararon las diluciones 10^{-4} g/mL, 10^{-5} g/mL, 10^{-6} g/mL, 10^{-7} g/mL en agua mili Q. El pH de las diluciones se ajustó a 3.5-4 con ácido acético glacial.

Con el fin de estudiar el efecto que la variación de las proporciones entre el CS y las AuNP tiene sobre los NC, se prepararon suspensiones de NC compuestos por diferentes proporciones de ambas especies a un pH final igual a 4. Para facilitar el análisis de los resultados, la composición de cada suspensión se expresa en términos de átomos de oro por moléculas de CS en la muestra. Ya que cada muestra contiene un volumen de 0.5 mL de AuNP, el contenido final de estas nanopartículas en la suspensión es de 2.85×10^{12} partículas. Prado-Grotor y colaboradores (2014) calcularon que el número medio de átomos de Au en una nanopartícula esférica de oro de 10 nm de diámetro es 30687. A partir del número de átomos estimados y del peso atómico del oro, cada muestra contiene 2.8774×10^{-5} g de oro.

Por otra parte, para estimar el número de moléculas de CS presentes en las diferentes muestras, si consideramos el peso molecular medio del CS con el que estamos trabajando, $250000 \text{ g mol}^{-1}$, obtenemos que cada molécula de CS tiene un peso medio de 4.2×10^{-19} g. A partir de esta estimación, si la concentración de la disolución de CS es 10^{-3} g/mL, en cada mL de disolución hay 2.4×10^{15} moléculas de CS.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, podemos describir las proporciones que hemos preparado a partir de AuNP y CS, en términos de número de partículas y de masa de cada especie. Para la suspensión de NC compuestos por 0.5 mL de AuNP y 1 mL de CS 10^{-3} g/mL, podemos aproximar la relación AuNP:CS a $6 \times 10^{-2}:1$ en términos de masa o $1:10^3$ en términos de número de partículas. Debido a la claridad de la expresión en términos de número de partículas, las diferentes proporciones se expresarán en estos términos. Así, las proporciones preparadas fueron AuNP:CS $1:10^3$, $1:10^2$, $1:10$ y $1:1$.

Para estudiar la estabilidad de los NC compuestos por AuNP:CS frente a la fuerza iónica del medio, se adicionó el volumen necesario de una disolución de KNO_3 1 M necesario para incrementar la fuerza iónica del medio hasta 0.15 M. Las suspensiones se analizaron por triplicado mediante DLS. El análisis, se continuó a lo largo del tiempo, de forma que se pudo estudiar la evolución de los agregados presentes en las distintas suspensiones. De esta forma, se realizó una primera medida al adicionar la sal, ese

momento se consideró $t = 0$. Cada medida duró entre 5 y 8 minutos. Posteriormente, se realizaron dos medidas más, una de ellas pasadas de 1 a 2 horas desde la adición de la sal, y la otra medida, tercera por tanto, se realizó pasadas 24 h.

Para estudiar la estabilidad de los NC compuestos de CS y SFN frente a la fuerza iónica del medio, se adicionó el volumen necesario de una disolución de KNO_3 0.1 M hasta incrementar la fuerza iónica hasta 0.024 M en la suspensión de NC. Las muestras se estudiaron por triplicado mediante DLS. El protocolo de medida se inició con la medida de la suspensión de SFN tras la sonicación. Se realizó una segunda medida cuando se adicionó el CS, esta medida se consideró $t = 0$ en aquellos casos en los que no se incrementó al fuerza iónica del medio. En aquellos casos en los que sí se incrementó la fuerza iónica, se realizó una tercera medida tras la adición de la sal. En estos casos, de fuerza iónica elevada, la tercera medida se consideró $t = 0$. En ambos casos, tanto en las suspensiones de fuerza iónica elevada como en las suspensiones de fuerza iónica 0, se realizó una medida de DLS después de 1 a 2 horas desde el $t = 0$ y otra pasadas 24 h desde el $t = 0$.

Para estudiar el efecto de usar diferentes proporciones entre quitosano o glicol-CS y fibroína de seda para sintetizar los nanocomposites, se prepararon suspensiones compuestas con estos dos elementos, CS o glicol-CS y SFN, a pH igual a 4. La composición de dichas suspensiones aparece en la Tabla VI-1. Partimos de una cantidad inicial de seda igual a 10^{-4} g. Las proporciones de CS:SFN ensayadas fueron 1:0.1, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.8, 1:1.6, 1:3.2, 1:6.35, 1:12.7, 1:25.4, 1:50.8, 1:203 y 1:813 mg:mg (en masa). En el caso de las proporciones glicol-CS:SFN las proporciones ensayadas se prepararon según las mismas proporciones que para el caso del CS pero el rango de proporciones se extendía desde 1:0.1 hasta 1:50.8, ambas incluidas. Para estudiar la estabilidad de los nanocomposites en condiciones de elevada fuerza iónica, se adicionó el volumen necesario de una disolución de KNO_3 0.1 M para alcanzar una fuerza iónica igual a 0.024M, 0.048M o 0.096M, indicado en cada caso. Se estudió el tamaño de los agregados en las muestras mediante la medida de la dispersión dinámica de luz (DLS). Las medidas de cada muestra se realizaron en serie. La primera medida corresponde a la muestra de fibroína de seda. La segunda medida de la serie correspondía a la suspensión en la que se adicionó el quitosano o el glicol-CS a la fibroína. Esta medida se correspondía a la medida a tiempo 0 en las medidas a las que no se adicionó sal. En aquellas muestras en las que se adicionó KNO_3 , se realizó una tercera medida en la serie. Dicha tercera medida correspondía al momento tras la adición de la sal. En estos casos, la tercera medida se consideró como tiempo 0. Tras las medidas a tiempo 0, se realizaron, al menos, dos medidas más a cada muestra, independientemente de si contenían o no sal. La primera de las medidas adicionales correspondía a la situación pasada de 1 a 2 horas desde el tiempo 0. La segunda correspondía al momento tras 24 horas.

Se realizaron las medidas de diámetro hidrodinámico mediante DLS utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Las medidas consistieron

en 3 medidas de 5 runs de 10 segundos cada uno sin tiempo de retraso entre medidas. En esas condiciones, cada medida duró entre un minuto y un minuto y medio. Cada curva en las figuras representa la media de las medidas realizadas. Hemos comprobado que este protocolo de análisis rinde resultados muy reproducibles en las distribuciones de intensidad y número. Se midió el potencial z usando el mismo dispositivo. En este caso, cada ensayo consistió en 6 medidas realizadas en modo automático.

Tabla VI-1. Composición de las muestras que contenían nanocomposites compuestos de quitosano y nanopartículas de fibroína de seda. Cada muestra se preparó con 1 mL de fibroína de seda a una concentración igual a 10^{-4} g/mL. Para mantener la misma composición, cada muestra correspondiente a la misma proporción de CS:SFN se preparó como se indica en la tabla y solo aquellas muestras en las que se estudiaba el efecto de la fuerza iónica, se adicionaba el volumen indicado de KNO_3 .

CS:SFN ó Glicol-CS:SFN (mg:mg)	Concentración de la disolución de CS o glicol-CS ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la disolución de CS o glicol-CS (μL)	KNO_3 0.1 M (μL)
1:0.1	10^3	1000	632
1:0.2	10^3	500	474
1:0.4	10^3	250	395
1:0.8	10^3	125	355
1:1.6	10^3	62.5	336
1:3.2	10^3	31.5	326
1:6.35	10^2	157	365
1:12.7	10^2	79	341
1:25.4	10	395	440
1:50.8	10	197	378
1:203	1	492.6	471.4
1:813	1	123	355

3. Resultados y discusión.

3.1. Nanocomposites de CS y AuNP

Las AuNP tienden a agregar cuando la fuerza iónica del medio se incrementa (Pamies et al., 2014). Sin embargo, en los capítulos IV y V quedó demostrado que las AuNP y el CS interaccionan entre ellos y como resultado se obtienen estructuras que denominamos nanocomposites (NC). Además, quedó demostrado el papel del CS evitando la agregación de las AuNP en condiciones de alta fuerza iónica. En este capítulo, intentamos encontrar la mejor proporción AuNP:CS para evitar la agregación de AuNP y conseguir la estabilidad en el tiempo obteniendo los NC más pequeños.

Al sintetizar NC con las distintas proporciones, indicadas en la sección material y métodos de este capítulo, se pueden obtener composites de diferentes tamaños, siempre en el rango nanométrico de diámetro hidrodinámico, en condiciones en las que no se incrementó la fuerza iónica del medio (Figura VI.1). Para comprobar la estabilidad de los NC en condiciones fisiológicas de fuerza iónica, se adicionó KNO_3 a la suspensión hasta que el valor de la I alcanzó un valor de 0.15 M. Este valor de fuerza iónica es ligeramente superior la de la sangre.

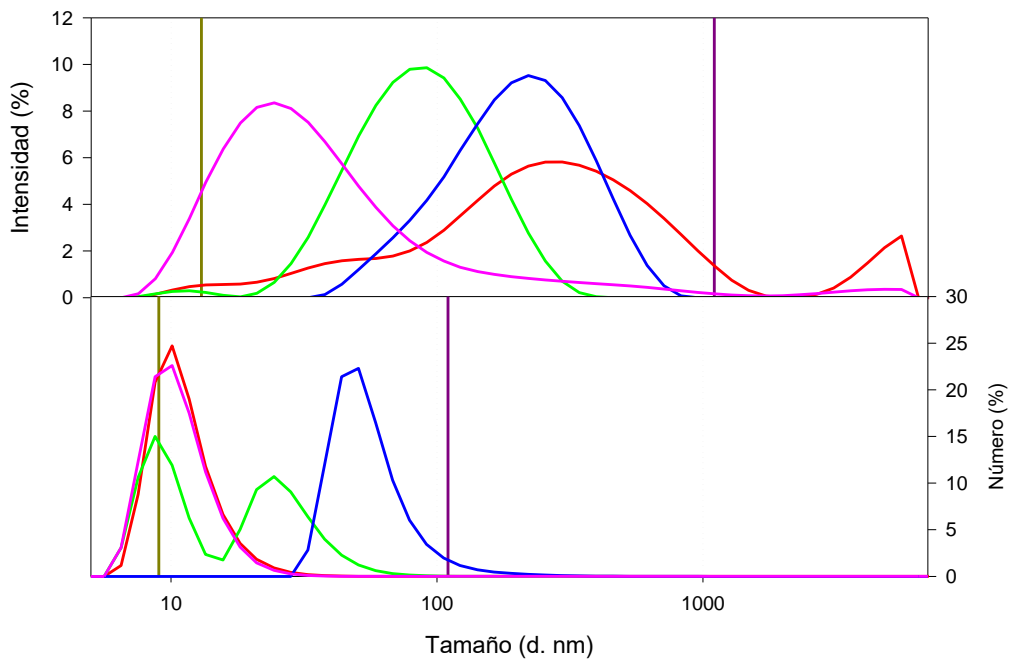


Figura VI.1. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los NC compuestos de AuNP y CS a $I = 0$ M con proporción AuNP:CS 1:10³ (rojo), 1:10² (verde), 1:10 (azul), 1:1 (rosa). Como control de tamaño se incluye una línea vertical violeta que representa el máximo para la distribución de CS y una línea vertical amarilla oscura que representa la distribución de AuNP.

En la Figura VI.2 se puede ver la evolución del diámetro hidrodinámico de los NC AuNP:CS en los instantes iniciales tras adicionar el KNO_3 . Puede apreciarse que la muestra con menor contenido en CS, que corresponde con aquella que presentaba proporción AuNP:CS 1:1, mostraba una fuerte agregación. Muy probablemente, era resultado de una muy baja presencia de CS en la muestra. Las muestras con mayor contenido en CS mostraron un comportamiento totalmente diferente. Concretamente, aquella muestra que estaba compuesta con una proporción AuNP:CS 1:10² casi no mostró un cambio en la distribución del diámetro hidrodinámico en intensidad de los NC. Y las muestras con proporción 1:10 y 1:10³ mostraron una mayor variación en la distribución de tamaños respecto a la situación de $I = 0$ M. Los NC en la muestra compuesta con la proporción AuNP:CS 1:10, redujeron su diámetro hidrodinámico de 230 nm en condiciones de $I = 0$ M hasta 130 nm cuando se adicionó la sal a la suspensión. Respecto a los NC presentes en la muestra compuesta con proporción AuNP:CS 1:10³, como era de esperar, cambiaron completamente su distribución de tamaño: en la suspensión con $I = 0$ M, se encontraron dos poblaciones en función de su

diámetro hidrodinámico, una de ellas se extendía desde 10 nm hasta 1000 nm y la segunda aparecía como un pequeño pico alrededor de los 5000 nm. Cuando se adicionó KNO_3 , la distribución de tamaños se hizo más estrecha y se localizó alrededor de los 200 nm. Este comportamiento recordaba a aquel observado previamente en condiciones similares (Collado-González et al., 2015). El diámetro hidrodinámico de los NC AuNP:CS en aquella ocasión era menor, encontrándose alrededor de los 100 nm. Una posible explicación es que la fuerza iónica de la suspensión en aquella ocasión fue mayor, 0.25M.

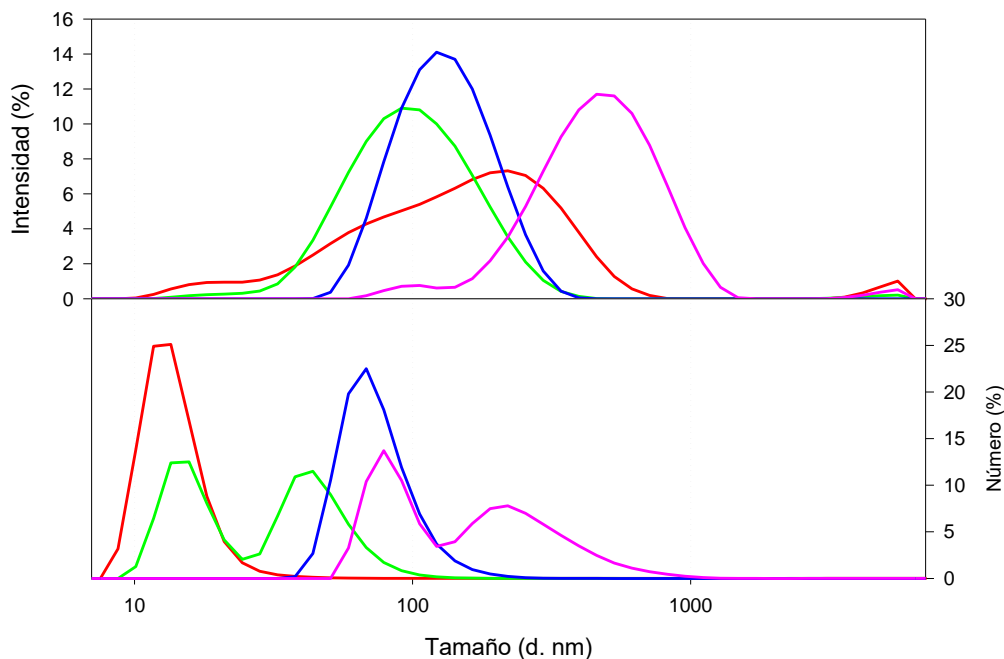


Figura VI.2. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los nanocomposites compuestos de AuNP y CS a $I = 0.15 \text{ M}$ y $t = 0 \text{ h}$ con proporción AuNP:CS 1:10³ (rojo), 1:10² (verde), 1:10 (azul) y 1:1 (rosa).

La medida de los NC presentes en las suspensiones se midió pasadas 24 horas. En ese período de tiempo, las muestras se mantuvieron a 4°C. La distribución del diámetro hidrodinámico de los NC se representa en la Figura VI.3. La muestra con mayor proporción de CS, que corresponde a la proporción AuNP:CS 1:10³, mostró dos poblaciones, una de ellas cercana a 200 nm y la segunda centrada alrededor de los 20 nm de diámetro hidrodinámico. Ese resultado era compatible con la hipótesis de que, a esa concentración, parte de las moléculas de CS, probablemente las más largas, tendían a enrollarse entre ellas, y la presencia de sal y de AuNP en el medio disminuía el diámetro hidrodinámico de los agregados y las moléculas individuales de CS, y como consecuencia, de los NC. En el otro extremo, las muestras compuestas con proporciones de AuNP:CS 1:1 no podían detectarse mediante DLS. La principal razón era la precipitación que habían sufrido los agregados. De esta forma, la hipótesis de ausencia de polímero que evitara la agregación de las AuNP se reforzaba. Respecto a las proporciones intermedias, el comportamiento estaba entre los extremos descritos para

los casos de proporción AuNP:CS $1:10^3$ y $1:1$. La distribución de los NC de la muestra con proporción AuNP:CS $1:10^2$ se desplazó ligeramente hacia valores menores de diámetro hidrodinámico, mostrando el máximo de distribución alrededor de los 80 nm. Sin embargo, dicha población mostró una distribución más amplia que 24 horas antes, revelando que la homogeneidad de la muestra se redujo al incrementar la I. Por último, el caso más interesante era el que correspondía a los NC presentes en la suspensión de proporción AuNP:CS $1:10$. Estos NC no mostraron cambio en la distribución de diámetro hidrodinámico pasadas 24 horas, mostrando una población estable alrededor de los 150 nm.

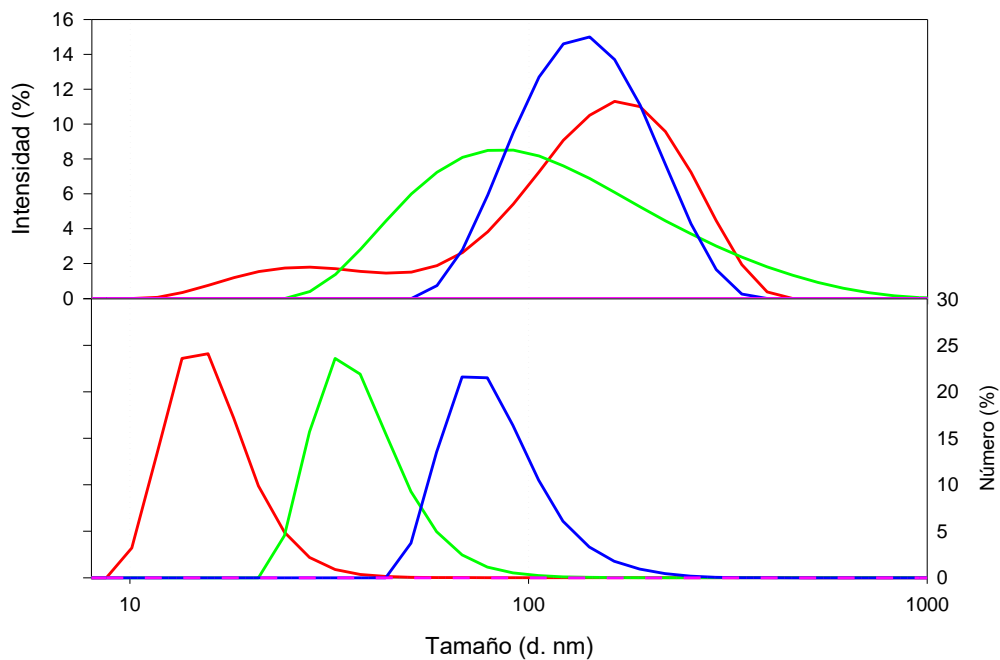


Figura VI.3. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los nanocompuestos compuestos de AuNP y CS a $I = 0.15$ M y $t = 24$ h con proporción AuNP:CS $1:10^3$ (rojo), $1:10^2$ (verde), $1:10$ (azul) y $1:1$ (rosa).

Respecto al potencial Z de los NC compuestos de AuNP y CS, aquellos a partir de la proporción AuNP:CS $1:10$ tenían un potencial Z alrededor de -25 mV. Ese valor de potencial Z se explicaba debido a la adsorción de las AuNP en la superficie de los agregados, geles y cadenas sueltas de CS. El potencial Z de los NC aumentaba conforme aumentaba la cantidad de CS en la suspensión. Así, la muestra con NC compuestos con la proporción AuNP:CS $1:10^3$ tenía un potencial Z positivo (Tabla VI-2).

En resumen, el CS interactuaba con las AuNP dando lugar a NC que eran estables en condiciones de fuerza iónica elevada. Sin embargo, aunque diferentes proporciones entre ambas especies daban lugar a diferentes tipos de NC, sólo aquellos obtenidos a través de una proporción AuNP:CS $1:10$ mostraban estabilidad, en términos de no agregación, durante las primeras 24 horas, en condiciones de elevada fuerza iónica.

Tabla VI-2. Valores de potencial Z de NC compuestos de CS y AuNP expuestos a $I = 0$ M. Cada muestra contenía 0.5 mL de AuNP. Posteriormente, se adicionó el volumen necesario de una disolución de CS hasta alcanzar la proporción indicada. El volumen final de la suspensión fue siempre 1.5 mL.

Relación AuNP:CS (AuNP = 1)	$I = 0$ M (mV)
10^3	57 ± 4
10^2	32 ± 6
10^1	-25

3.2. Nanocomposites de CS y SFN.

Para estudiar el posible efecto estabilizador del CS sobre las SFN, el punto de partida fue el estudio de los NC compuestos de CS y SFN en condiciones de $I = 0$ M. La síntesis de composites variando la proporción entre los componentes, CS y SFN, tal como se indica en la sección material y métodos de este capítulo dio como resultado la síntesis de composites que mostraban un diámetro hidrodinámico en el rango de los nm. En general, conforme disminuyó la presencia de CS en la muestra, el tamaño de los nanocomposites formados también disminuía (Figura VI.4). De forma que en aquellas muestras en las que la proporción CS:SFN era menor a 1:203 mg:mg, la interacción entre las especies dio lugar a nanocomposites. Este comportamiento, tiene como límite inferior, la proporción CS:SFN 1:0.4 mg:mg.

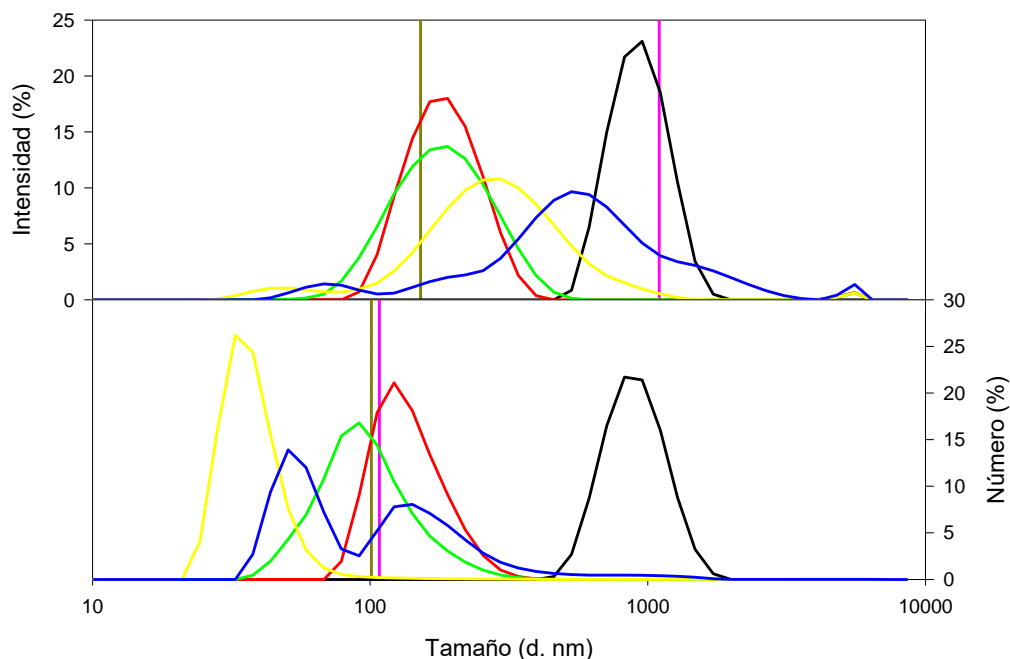


Figura VI.4. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los NC compuestos de CS y SFN a $I = 0$ M y $t = 0$ h con proporción CS:SFN 1:203 (negro), 1:50.8 (rojo), 1:12.7 (verde), 1:1.6 (amarillo) y 1:0.4 (azul) mg:mg. Como control de tamaño se incluye una línea vertical rosa que representa el máximo para la distribución de CS y una línea vertical amarilla oscura que representa el máximo en la distribución de SFN.

El estudio de estos NC compuestos de CS y SFN se completó con el análisis del potencial Z de los mismos. De forma que podemos conocer la estructura de los NC en términos de carga superficial de las estructuras. Los NC de todas las suspensiones mostraron un potencial Z positivo excepto aquellos casos en los que el contenido en CS era muy bajo, concretamente en la suspensión formada por la proporción CS:SFN 1:813 mg:mg (Tabla VI-3). En el resto de proporciones ensayadas, el potencial Z siempre fue positivo y el valor absoluto estaba fuera del intervalo de inestabilidad, salvo en el caso de proporción CS:SFN 1:203 mg:mg.

Tabla VI-3. Valores de potencial Z de NC compuestos de CS y SFN expuestos a $I = 0 \text{ M}$ o $I = 0.024 \text{ M}$. Cada muestra contenía 1mL de SFN 10^{-4} g/mL . Posteriormente, se adicionó el volumen necesario de una disolución de CS hasta alcanzar la proporción indicada. El volumen final de la suspensión nunca fue mayor de 1.25 mL. Por último, en el caso de muestras en las que se incrementó la I, se adicionó KNO_3 .

SFN en la relación CS:SFN (CS=1)	$I = 0 \text{ M}^*$	$I = 0.024 \text{ M}^*$	
∞ (no CS)	-30.0 ± 5.0	-24 ± 8	94.5%
		1 ± 2	55%
		-42 ± 4	7.9%
813	-19 ± 4	-27 ± 7	67.5%
		-6 ± 4	32.5%
203	11 ± 4	-18 ± 6	
50.8	46 ± 6	-3 ± 4	
25.4	24.8 ± 7.6	49.2 ± 4.9	
12.7	27 ± 7	95.2%	
	60.2 ± 3.1	4.8%	20 ± 2
6.35	44 ± 6	99.6%	
3.2	44.2 ± 7.6	43 ± 8	
1.6	54.7 ± 6.9	47 ± 7	
		48.7 ± 4.4	
0.8	67.5 ± 5.0	52 ± 11	65.5%
		10 ± 8	34%
0.4	72.2 ± 4.3	25 ± 5	
0.2	75.1 ± 4.5	27 ± 2	
0.1	76.3 ± 4.3	25 ± 2	
0	81.9 ± 4.9	53 ± 8	

* Cuando no se indica un porcentaje, el valor indicado representa más del 99%.

En una colaboración de nuestro grupo, se realizaron cálculos de blind docking para la interacción de CS y las SFN (Collado-González et al., 2017). Esos cálculos indicaron que existía una zona de la molécula de CS que interactuaba de forma preferente con una zona en la molécula de SFN. Además, se concluyó que las interacciones principales entre ambas moléculas, eran debidas a interacciones electrostáticas e interacciones por puentes de hidrógeno, principalmente.

La explicación más factible para los resultados de potencial Z y los de blind docking era que las SFN se localizaban en el interior de los NC y el CS se situaba en la parte más periférica, donde interactuaba con la superficie electrostática negativa de las SFN. En aquellos casos en los que la presencia de CS era muy baja, es decir en los que los NC mostraban un potencial Z negativo (CS:SFN 1:813 mg:mg) o un potencial Z en el intervalo de inestabilidad (CS:SFN 1:203 mg:mg), era probable que el bajo contenido en CS imposibilitara el recubrimiento completo de las SFN, y como consecuencia las repulsiones electrostáticas no eran suficientemente elevadas para evitar la formación de agregados de tamaño mayor, así, para la suspensión formada con la proporción CS:SFN 1:203 mg:mg (Figura VI.4) podía observarse una población de composites de tamaño micrométrico en el momento de la síntesis. En el caso de la proporción CS:SFN 1:813 mg:mg, era posible, además, que el contenido en CS no permitiera enmascarar el potencial Z negativo de las SFN. Además, en el momento de la adición del CS, se observaban microagregados que aumentaban de tamaño con el paso del tiempo. En otras palabras, en estos casos, el CS más que actuar envolviendo a las SFN y evitando su agregación, actuaba como puente entre las diferentes partículas de SFN, permitiendo la agregación de las mismas.

El estudio de blind docking referido anteriormente, indicó que cada monómero de SFN podía interactuar con cinco moléculas de CS. Es necesario tener en cuenta que para el modelo se utilizó un nonúmero de CS. Por lo que una variación en la concentración de CS en la suspensión podría afectar a la estabilización de las SFN, tal como se concluye a partir de los resultados experimentales.

La Tabla VI-4 muestra la distribución de tamaño de SFN en función de la I del medio. La I menor a 0.012 M no indujo la agregación de las SFN. Si la I se incrementaba hasta 0.012 M, se producía una ligera agregación. Sin embargo, a una fuerza iónica igual a 0.024 M, la agregación de las SFN era clara. En ese caso, pasada una hora desde la adición de nitrato potásico, la mayoría de las partículas presentes en la muestra mostraban un diámetro micrométrico. Pasadas 24 horas desde la adición de la sal, los agregados estaban fuera del rango de medidas del DLS. De modo que, los experimentos para testar el efecto estabilizante del CS sobre las SFN se realizaron a $I=0.024$ M debido a la fuerte agregación que estas nanopartículas experimentaban en esas condiciones. Además, a ese valor de I no se inducía un cambio en la distribución de tamaño del CS.

La Figura VI.5 muestra el tamaño de los NC obtenidos en las suspensiones formadas con CS y SFN, en las proporciones indicadas anteriormente, cuando la fuerza iónica del medio se incrementó hasta 0.024M. De acuerdo con esta figura, cuando la cantidad de CS en la muestra era igual o menor a la que se necesitaba para mantener la proporción CS:SFN 1:50.8 mg:mg, la cantidad de CS era tan baja que la presencia del polímero no evitaba la agregación de las SFN al valor de fuerza iónica alcanzado, a tiempo 0. El resto de las muestras evaluadas, compuestas con diferentes proporciones de CS y SFN, dieron como resultado una población de NC de unos cientos de nanómetros de tamaño, los cuales debían estar compuestos por CS y SFN ya que el análisis reveló la presencia

de una población de composites de tamaño mayor que el de las SFN y menor que el tamaño de las poblaciones observadas en una muestra de CS. A proporción CS:SFN 1:0.4 mg:mg, el análisis obtenido indicó la presencia de una población de decenas de nanómetros en todas las distribuciones. Muy probablemente, esas poblaciones fueran el resultado de la degradación de los composites presentes en la muestra.

Tabla VI-4. Comparativa de la distribución de tamaño e intensidad de las SFN en una suspensión tras incrementar la I.

	I = 0.006	I = 0.012	I = 0.024
Sin sal	178±69	162±51	174±69
t=0 h	180±71	181±63	309±142
t = 1 h	176±62	212±79	1742±390*
t = 24 h	185±68	268±124	2615±457

* En todos los casos, el valor representa >97% de la población salvo en este caso en el que representa el 91%

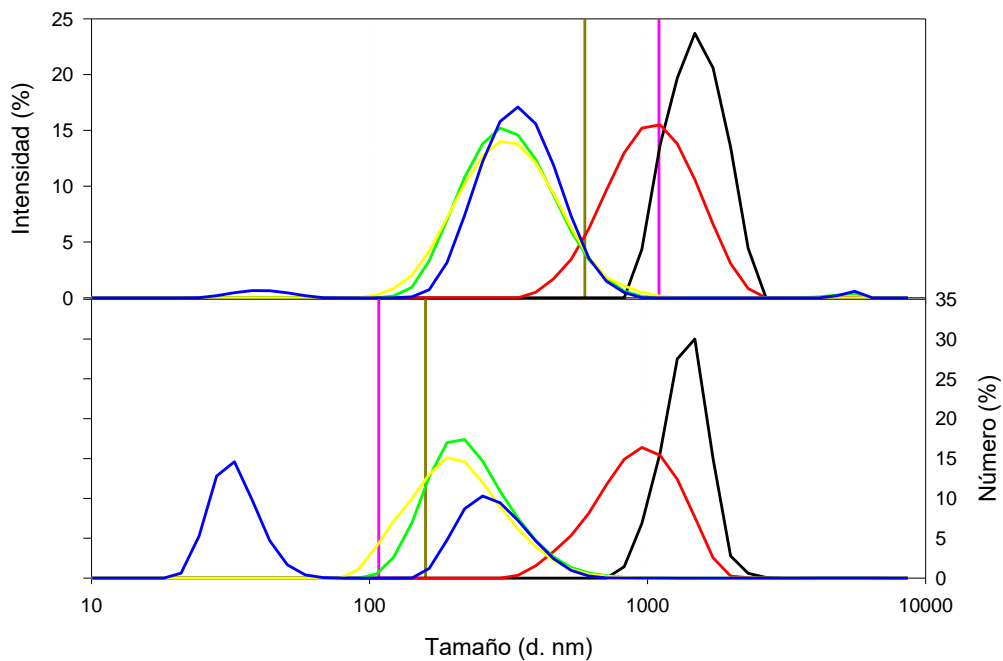


Figura VI.5. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los nanocomposites compuestos de CS y SFN a I = 0.024 M y t = 0 h con proporción CS:SFN 1:203 (negro), 1:50.8 (rojo), 1:12.7 (verde), 1:1.6 (amarillo) y 1:0.4 (azul) mg:mg. Como control de tamaño se incluye una línea vertical azul que representa el máximo para la distribución de CS y una línea vertical amarilla que representa el máximo en la distribución de SFN.

Para estudiar la estabilidad de los NC sintetizados, se midió el tamaño de los mismos 24 horas después de su síntesis. Los resultados, recogidos en la Figura VI.6, indicaron que la suspensión de las nanoestructuras compuestas por CS y SFN a una proporción 1:25.4 mg:mg, pasadas 24 horas no mostraba presencia de NC sino de microcomposites, debido a que la cantidad de CS presente en esta muestra fue tan reducida que no consiguió evitar la agregación de las SFN. De hecho, las suspensiones que contenían

composites formulados con menor cantidad del biopolímero, concretamente las suspensiones formuladas con CS:SFN 1:50.8, 1:203 y 1:813 mg:mg, no presentaban ningún pico pasadas 24 horas, ya que el tamaño de los composites presentes en estas suspensiones eran tan grandes que estaban fuera del límite de resolución del DLS. De hecho, dichos composites podían observarse a simple vista. Por otra parte, el análisis mediante DLS de las suspensiones que contenían mayor cantidad de CS, continuaban mostrando nanocomposites en su seno. Concretamente, solo las suspensiones formuladas con las proporciones CS:SFN 1:6.35 y 1:12.7 mg:mg mostraron una única población durante todo el tiempo de estudio. Además, la desviación estándar de estas poblaciones era baja. La distribución en intensidad mostraba un pico en 315 ± 34 nm de diámetro hidrodinámico para los NC en la suspensión de proporción 1:6.35 mg:mg y un pico en 344 ± 72 nm de diámetro hidrodinámico para los NC formulados con la proporción CS:SFN 1:12.7 mg:mg por lo que la homogeneidad de estas muestras fue mayor que la homogeneidad del resto de las muestras.

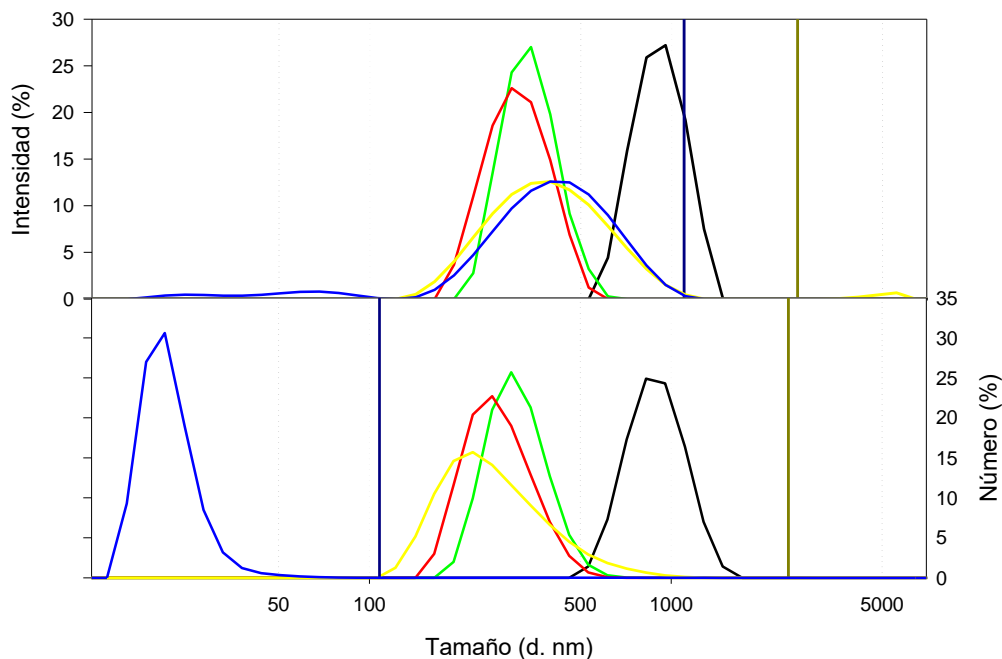


Figura VI.6. Distribución en intensidad y número del diámetro hidrodinámico de los nanocomposites compuestos de CS y SFN expuestos a $I = 0.024$ M durante 24 h con proporción CS:SFN 1:25.4 (negro), 1:12.7 (verde), 1:6.35 (rojo), 1:1.6 (amarillo) y 1:0.4 (azul) mg:mg. Como control de tamaño se incluye una línea vertical azul que representa el máximo para la distribución de CS y una línea vertical amarilla oscura que representa la distribución de SFN.

El valor del potencial Z de los composites expuestos a un incremento en la fuerza iónica igual a 0.024 M tras 24 horas está reflejado en la Tabla VI-2. De acuerdo con la información de dicha tabla, las muestras en las que la cantidad de SFN fue mucho mayor que la cantidad de CS, el potencial Z de los composites presentes en la muestra continuó siendo negativo, tal como fue en el momento de la síntesis. Se obtuvo el mismo resultado, en términos de no variación de la naturaleza del potencial Z tras la exposición a un aumento de fuerza iónica, cuando la cantidad de CS fue mucho mayor

que la cantidad de SFN. En estos casos, los NC siempre mostraron un potencial Z positivo. Sin embargo, la naturaleza del potencial Z de los NC podía variar de positivo a negativo indicando que había acontecido un cambio en la conformación de las nanoestructuras, las cuales tras una exposición de 24 horas a un aumento de fuerza iónica, presentaban partículas de SFN en la superficie. Este caso pudo verse en los composites compuestos con una proporción de CS:SFN 1:203 mg:mg, los cuales en el momento de la síntesis mostraron un potencial Z positivo pero en la región de inestabilidad, esto es en el rango entre -20 mV y +20 mV. También pudo observarse un cambio en la naturaleza del potencial Z si la cantidad de SFN disminuía. Por ejemplo, en la suspensión CS:SFN 1:50.8 mg:mg, el potencial Z en el momento de la síntesis era positivo y fuera de la región de inestabilidad y transcurridas 24 horas, el valor de potencial Z se tornó negativo y estaba en la región de inestabilidad. Como resultado de este cambio en el valor del potencial Z, las fuerzas repulsivas que mantenían separados los NC desaparecieron y se produjo la agregación de los mismos. De hecho, los composites presentes en esta suspensión al cabo de 24 horas de la exposición a una I incrementada eran tan grandes que estaban fuera del rango de detección del DLS. Con base en los resultados obtenidos, parecía que la región de proporciones de CS:SFN entre 1:203 mg:mg hasta 1:50.8 mg:mg era una región en la cual los NC obtenidos no eran estables frente al incremento de I aplicado. Al disminuir la cantidad de SFN en las suspensiones, se podían encontrar varias muestras en las cuales los NC mostraron un comportamiento estable frente al incremento de la I. Es decir, las nanoestructuras mostraron un potencial Z muy similar tras 24 horas de exposición a un incremento en la fuerza iónica. Este es el caso de las muestras que contenían una proporción de CS:SFN de 1:12.7 mg:mg a 1:1.6 mg:mg. El análisis mediante DLS reveló que los NC de esas muestras mostraron, además, un tamaño muy parecido al tamaño que mostraron en el momento de la síntesis. Sin embargo, una disminución en la cantidad de SFN en la suspensión de NC, rindió un valor de potencial Z muy diferente respecto a aquel que se obtuvo en el momento de la síntesis. Los análisis de DLS mostraron que aquellos nanodispositivos tenían un tamaño de decenas de nanómetros, resultado que es consistente con la hipótesis de que aquellas muestras no contenían nanocomposites sino únicamente CS. Así, combinando los resultados del análisis del potencial Z y los análisis de DLS, se podía interpretar que los NC que mostraban estabilidad frente al incremento de I aplicado, eran aquellos que estaban compuestos por las proporciones de CS:SFN en el rango de 1:12.7 mg:mg a 1:1.6 mg:mg.

En resumen, parece claro que el CS actuaba evitando la agregación de la SFN. Como resultado, el CS y las SFN interactuaban mediante enlaces intermoleculares y se formaban grandes NC, concretamente de cientos de nanómetros de diámetro hidrodinámico. También parece claro que dichos nanodispositivos tenían diferente estructura en función de la masa total de CS presente en la suspensión. Por lo tanto, cuanto menor fuera la presencia de CS en la muestra, menor era el potencial Z de las nanoestructuras obtenidas, lo cual indicaba que la SFN estaba más expuesta en la superficie. Sin embargo, el CS prevenía la agregación cuando se incrementaba la I del medio en aquellos casos en los que la proporción de CS:SFN estaba en el rango de 1:1.6

mg:mg a 1:12.7 mg:mg. Aunque, para obtener NC que mostraran una distribución más estrecha en términos de diámetro hidrodinámico, las proporciones CS:SFN debían estar entre 1:6.35 mg:mg y 1:12.7 mg:mg. Los nanodispositivos sintetizados de esta forma mostraban un potencial Z positivo, indicando que la SFN está en el interior de la estructura protegida por el CS que se encontraba en la superficie.

3.3. Nanocomposites de glicol-CS y SFN.

Las SFN por sus propiedades químicas y físicas, es muy interesante desde el punto de vista de la fabricación de estructuras utilizadas en el campo de la biomedicina. Sin embargo, su tendencia a agregar en medios fisiológicos limita su uso. Entre las posibles alternativas para conseguir estabilizar nanopartículas de SFN, surgieron el uso de los polímeros como el polietilenglicol (PEG), el poli(ácido láctico co-glicólico) (PLGA), la albúmina de suero (BSA) o el CS. Este último, por su naturaleza policatiónica es capaz de estabilizar nanopartículas que presenten carga negativa en su superficie. Sin embargo, en el caso de la estabilidad de las SFN, el CS permite obtener suspensiones de NC estables sólo en condiciones de fuerza iónica baja (0.024 M). Debido a otras características propias del CS como su biocompatibilidad, se ha propuesto el uso de un derivado del CS, el glicol-CS, para conseguir la estabilidad de las nanopartículas de fibroína de seda, conservando las propiedades del quitosano.

El glicol-CS presenta en su superficie, grupos amino y grupos glicol, de forma que el polímero adquiere carácter liófilo y por tanto presenta más hidrosolubilidad que su predecesor. No obstante, la interacción entre el glicol-CS y las SFN, al igual que en el caso del propio CS tiene lugar a través de interacciones electrostáticas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la proporción glicol-CS:SFN tiene un papel fundamental para evitar la agregación de la SFN. Al aumentar la I de la suspensión hasta 0.024 M (valor de referencia, puesto que es el valor de I al cual conseguimos estabilizar la SFN con CS), aquellas suspensiones en las que la proporción de glicol-CS:SFN era igual o inferior a 1:3.2, los NC mostraban una estabilidad, en términos de no agregación, en el momento de la exposición. Por el contrario, en aquellas suspensiones en las que la cantidad de glicol-CS era inferior, el polímero no consiguió estabilizar la SFN y se produjo la agregación en el momento del incremento de la fuerza iónica. El tiempo desde que se adiciona la sal hasta que se recoge la primera medida es de aproximadamente 3 minutos, por lo que la agregación en los casos más extremos, concretamente los que presentan proporción 1:50.8; 1:25.4 y 1:12.7 mg:mg, la agregación tiene lugar en menos de 3 minutos. Era interesante el caso de la proporción 1:6.35 mg:mg, en la que la agregación fue más lenta y aún podía verse una gran proporción de los composites en la región de tamaños nanométricos (Figura VI.7.).

Transcurridas 24 h, las suspensiones con proporciones entre 1:50.8 mg:mg y 1:6.35 mg:mg no presentaron estructuras nanométricas tal como se dedujo de la Figura VI.8. en la que puede apreciarse la ausencia de curva de distribución de tamaños registrada en

el DLS para las suspensiones de NC indicadas. El análisis de las curvas obtenidas permitió concluir que se había producido agregación en las proporciones entre 1:3.2 mg: y 1:0.8 mg:mg. Y solo las suspensiones con proporciones igual a 1:0.4 mg:mg o inferiores mostraban que la distribución de tamaños de las nanoestructuras se mantenía en la misma región en la que se registró 24 horas antes, cuando se incrementó la I.

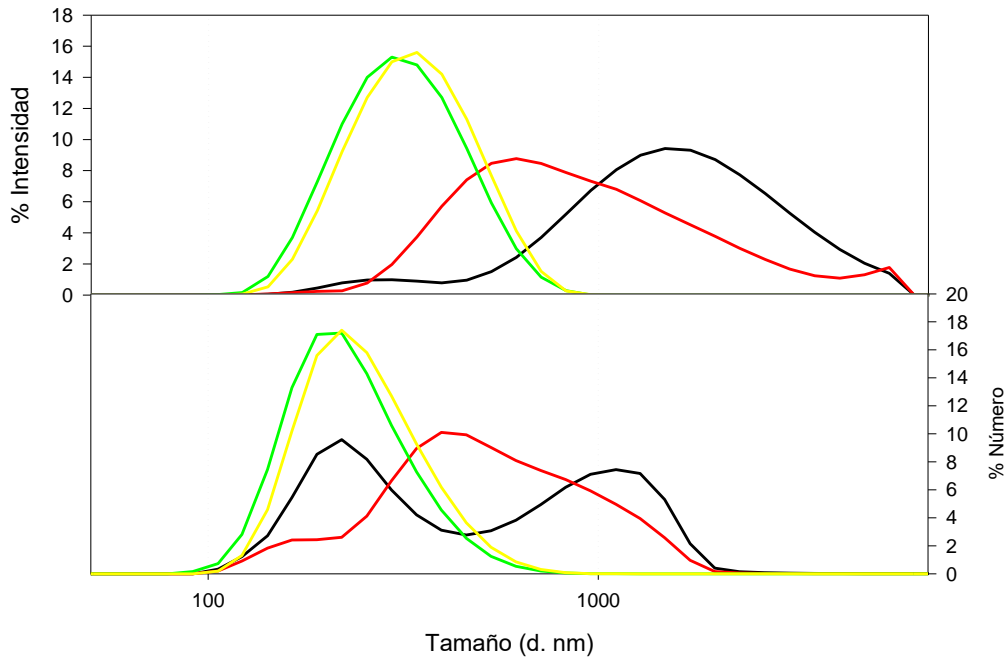


Figura VI.7. Distribución de diámetro hidrodinámico en intensidad y número de los NC compuestos por glicol CS:SFN expuestas a $I = 0.024 \text{ M}$ a $t = 0 \text{ h}$. Las diferentes proporciones representadas son glicol-CS:SFN 1:50.8 (negro), 1:6.35 (rojo), 1:0.8 (verde) y 1:0.1 (amarillo) mg:mg.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, incrementamos la fuerza iónica sólo en aquellos casos en los que los NC se mantuvieron estables durante las primeras 24 horas. La distribución de tamaños de los NC presentes en las diferentes suspensiones en el momento del incremento de la I indicó que el tamaño de los NC obtenidos era muy similar e independiente de la proporción de glicol-CS:SFN usado, como puede verse en la Figura VI.9.

Transcurridas 24 horas, las suspensiones de NC de proporciones 1:0.2 mg:mg y 1:0.1 mg:mg mostraron estabilidad, es decir, no agregaron (Figura VI.10). Sin embargo, en el caso de los NC presentes en la suspensión de proporción 1:0.4 mg:mg, encontramos ambos resultados, agregación y no agregación (Figura VI.10).

Al duplicar la I hasta alcanzar el valor de 0.096 M , el incremento de la I, produjo una ligera agregación en los NC compuestos con proporción 1:0.4 mg:mg en el momento del incremento de I (Figura VI.11), que se vio potenciada a las 24 horas (Figura VI.12). Sin embargo, en el caso de los NC compuestos con proporciones inferiores, en ambos casos no se observó agregación transcurrido el mismo período de tiempo (Figura VI.12)

Respecto al potencial Z de los NC, en todos los casos el potencial Z fue positivo (Tabla VI-5), lo cual indicó que el glicol-CS se situaba en la periferia de las estructuras formadas y la SFN en el interior.

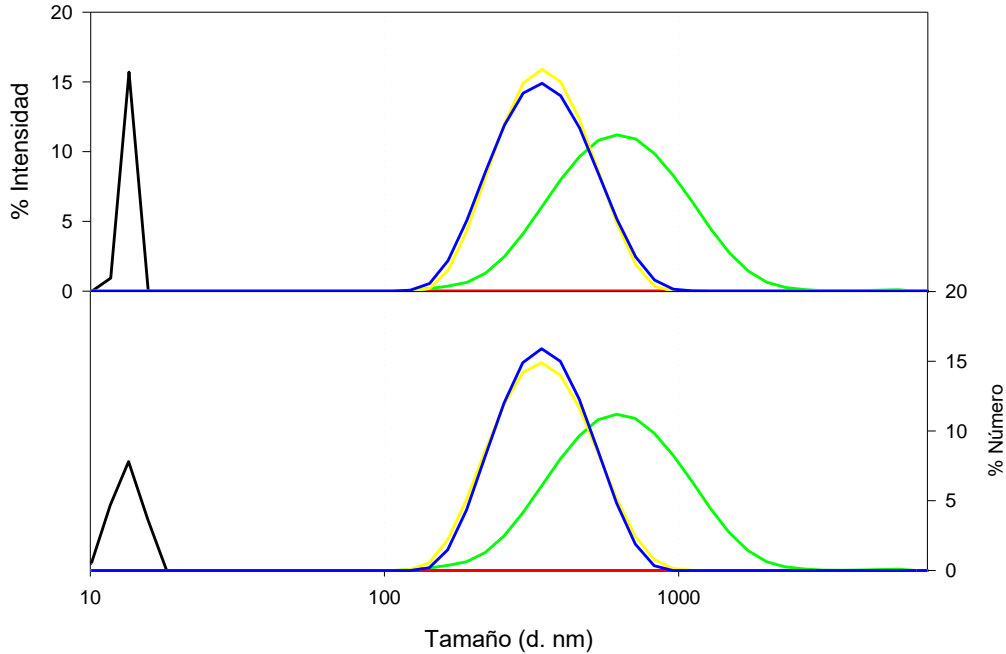


Figura VI.8. Distribución de diámetro hidrodinámico en intensidad y número de los NC compuestos por glicol-CS:SFN expuestos a $I = 0.024$ M, a $t = 24$ h. Las diferentes proporciones representadas son 1:50.8 (negro), 1:6.35 (rojo), 1:0.8 (verde), 1:0.4 (azul) y 1:0.1 (amarillo) mg:mg.

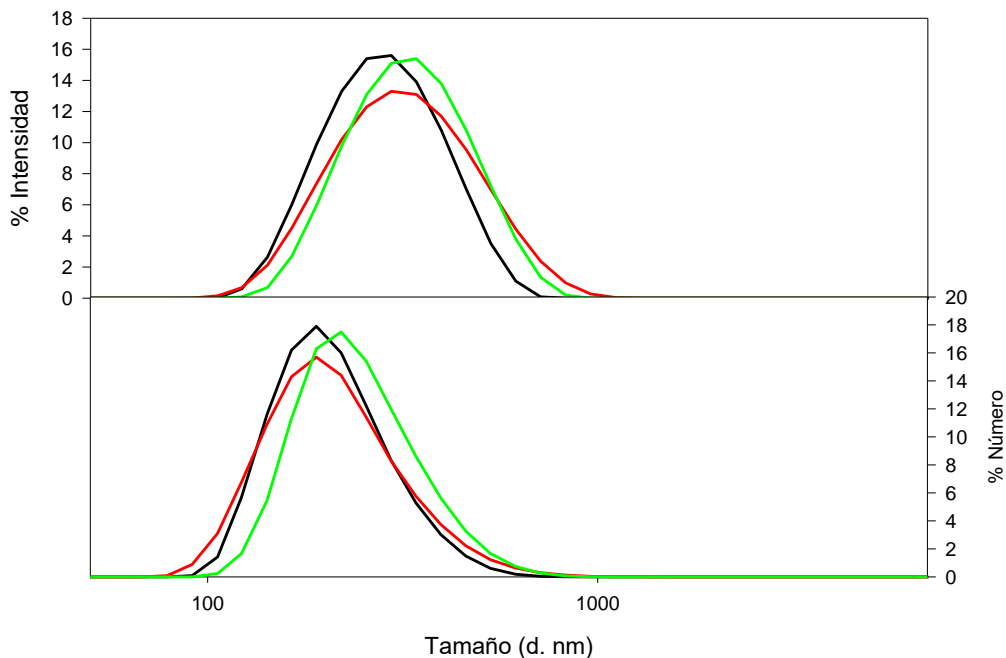


Figura VI.9. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad y en número de los NC compuestos por glicol-CS:SFN expuestos a $I = 0.048$ M a $t = 0$ h. Las diferentes proporciones testadas fueron 1:0.1 (negro), 1:0.2 (verde) y 1:0.4 (rojo).

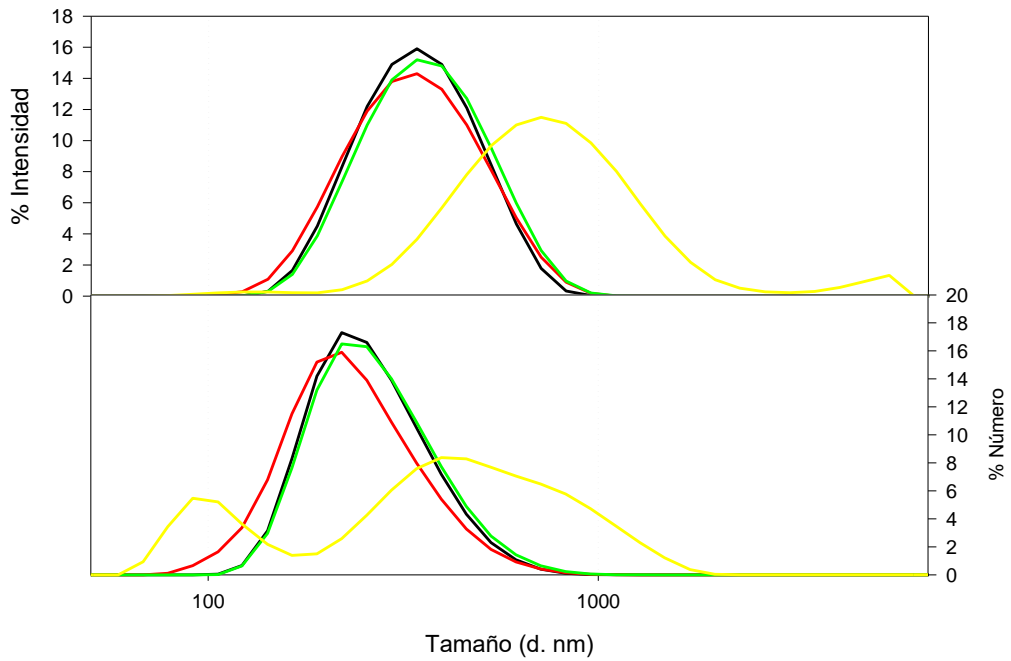


Figura VI.10. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad y en número de los NC compuestos por glicol-CS:SFN expuestos a $I = 0.048$ M a $t = 24$ h. Las diferentes proporciones testadas fueron 1:0.1 (negro), 1:0.2 (verde) y 1:0.4 (rojo y amarillo).

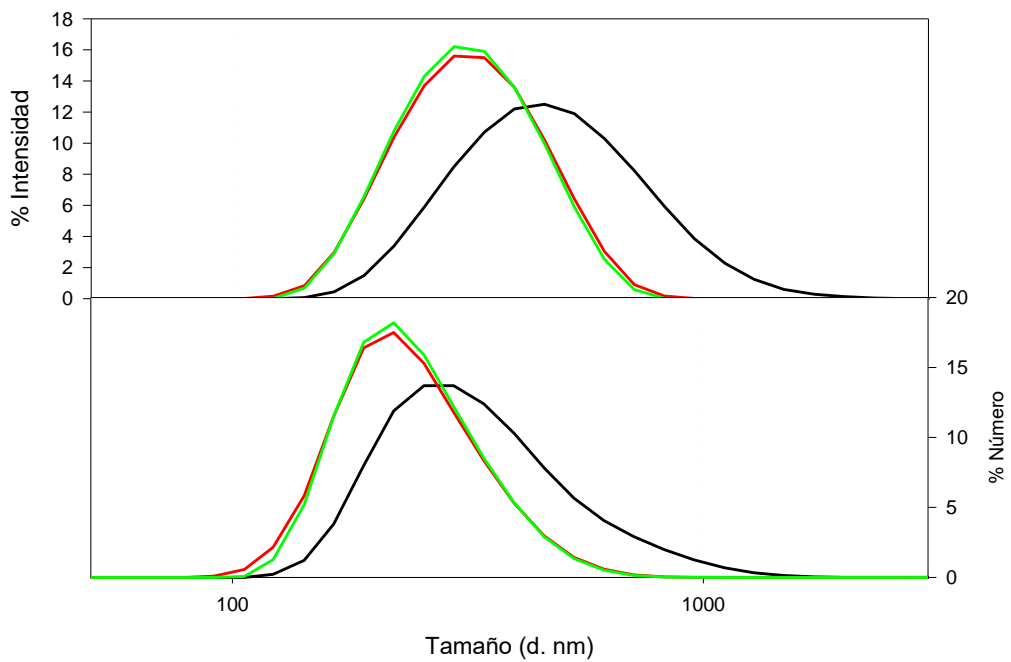


Figura VI.11. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad y número de los NC compuestos por glicol-CS:SFN expuestos a $I = 0.096$ M a $t = 0$ h. Las diferentes proporciones testadas fueron 1:0.1 (negro), 1:0.2 (verde) y 1:0.4 (rojo) mg:mg.

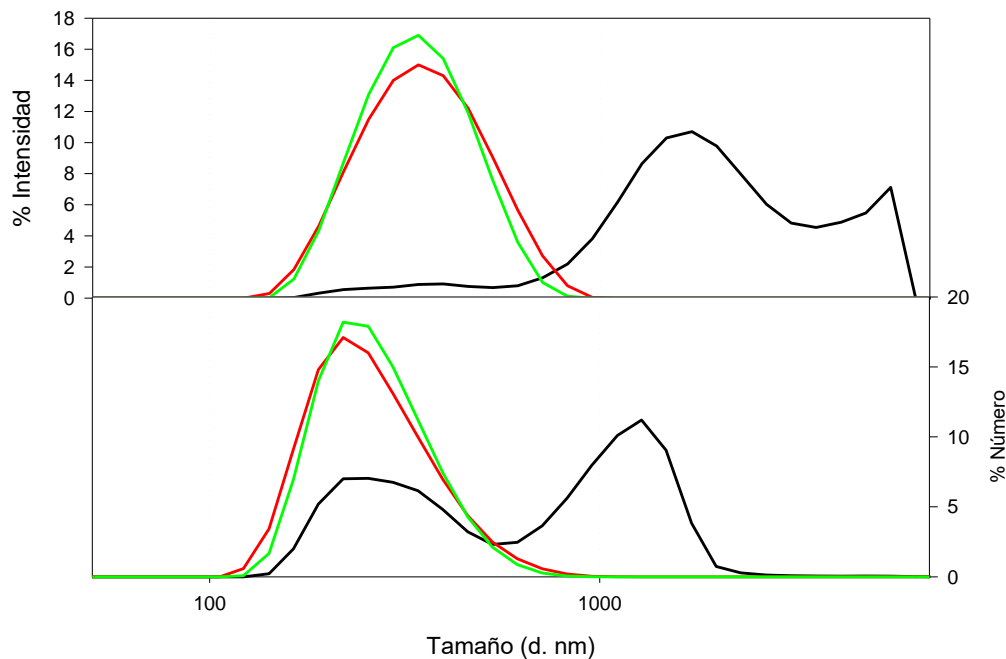


Figura VI.12. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad y número de los NC compuestos por glicol-CS:SFN expuestos a $I = 0.096 \text{ M}$ a $t = 24 \text{ h}$. Las diferentes proporciones testadas fueron 1:0.1 (negro), 1:0.2 (verde) y 1:0.1 (rojo) mg:mg.

Tabla VI-5. Potencial Z de los NC compuestos con diversas proporciones de glicol-CS y SFN.

Glicol-CS:SFN mg:mg	0.024 M	0.048 M	0.096 M
1:0.4	36±3	24±1	23±1
1:0.2	32±3	28±0	23±2
1:0.1	37±4	30±1	24±1

Para completar el estudio de la agregación de los NC en función de la I , nos planteamos permitir la interacción entre el glicol-CS y la SFN durante un período de 24 h antes de incrementar la I iónica del medio. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las Tabla VI-6 y Tabla VI-7. El resultado más llamativo fue que un incremento de la I hasta 0.096 M no producía la agregación de los NC presentes en una suspensión compuesta por glicol-CS:SFN 1:0.4 mg:mg en el momento del incremento de la I como ocurría en el caso en el que no se permitió la interacción de las especies reaccionantes durante más de 15 minutos aproximadamente, tiempo que tarda en recopilarse los datos de distribución de tamaños antes de adicionar la sal.

Tabla VI-6. Distribución de diámetros hidrodinámicos de los NC presentes en suspensiones con diversas proporciones de glicol-CS y SFN a una $I = 0.048 \text{ M}$.

I = 0.048M Glicol-CS:SFN	0 horas		24 horas	
	Intensidad	Número	Intensidad	Número
1:0.4	405±178	273±128	382±139	283±110
1:0.2	323±104	248±85	349±119	263±96
1:0.1	378±137	278±109	382±135 99.7%	289±108

Tabla VI-7. Distribución de diámetros hidrodinámicos de los NC presentes en suspensiones con diversas proporciones de glicol-CS y SFN a una I = 0.096 M.

I = 0.096M	0 horas		24 horas		
	Glicol-CS:SFN	Intensidad	Número	Intensidad	Número
	1:0.4	340±125	246±96	378±133	284±108
	1:0.2	325±118	235±89	346±110	271±92
	1:0.1	361±140	250±106	366±126	277±102

Respecto al valor de potencial Z de los NC obtenidos en el caso en el que se permitió la interacción durante un período largo de tiempo, en estos casos, el potencial Z era positivo (Tabla VI-8), igual que en el caso en el que la interacción se permitía durante un período corto de tiempo. Es interesante resaltar que los NC obtenidos mostraban características similares a los NC obtenidos por Wang y colaboradores (Wang et al., 2015), quienes consiguieron nanocomposites que presentaban un diámetro hidrodinámico aproximado de 200 nm y un potencial Z en el entorno de los +20 mV.

Tabla VI-8. Potencial Z de los NC presentes en suspensiones con diversas proporciones de glicol-CS y SFN igual a 0.048 M y 0.096 M.

Glicol-CS:SFN	0.048	0.096
1:0.4	No medido	23±1
1:0.2	26±1	23±1
1:0.1	27±2	24±1

Con el uso de glicol-CS, se consiguió la estabilización de la SFN, aunque para ello, se requería de la presencia de mayor cantidad de glicol-CS que de CS, ya que en el caso del polímero sin glicosilar, se conseguía una estabilización en rangos de proporciones desde 1:12.7 hasta 1:1.6. Además, podemos concluir que el glicol-CS ampliaba el rango de estabilidad frente I hasta, al menos, 0.096 M, cuando las proporciones utilizadas eran glicol-CS:SFN 1:0.2 mg:mg o menores.

4. Conclusiones.

El papel del CS como agente estabilizador para nanopartículas cargadas negativamente está demostrado, ya que este polímero previene la agregación que tiene lugar cuando la fuerza iónica del medio se incrementa. En este capítulo, hemos demostrado que la proporción de los dos componentes del sistema, el CS, por una parte, y las nanopartículas cargadas negativamente, bien representadas mediante las AuNP o mediante las SFN, y la concentración del CS en la suspensión tienen un papel relevante en los nanocomposites obtenidos, tanto en su tamaño como en su estabilidad. En ambos casos, AuNP o SFN, existe una proporción óptima entre el CS y el polianión que da como resultado la obtención de los nanocomposites más pequeños que muestran la mayor estabilidad frente a un incremento de fuerza iónica. En el caso de las SFN, el rango de I en el que el CS consigue evitar la agregación de SFN es pequeño, sin embargo, el uso de un derivado del CS, el glicol-CS, permite cuadruplicar el rango de I

en el que las SFN no agregan, aunque para ello, la proporción de glicol-CS:SFN es diferente a la proporción en el caso del uso del CS.,

Los resultados recogidos en este capítulo muestran dos formas en las cuales este resultado podría obtenerse: bien el CS actúa como una estructura en cuya superficie se adsorben nanopartículas de oro pequeñas cargadas negativamente o bien el CS actúa como moléculas que rodean a las nanopartículas de fibroína, principalmente mediante interacciones electrostáticas. En este caso, el efecto estabilizador del CS está limitado por el efecto de los iones de sal, los cuales disminuyen el efecto de las fuerzas electrostáticas repulsivas.

Capítulo VII : PAPEL CLAVE DEL QUITOSANO
EN EL TAMAÑO FINAL DE
NANOCOMPOSITES POLISACARÍDICOS
COMPLEJOS.

1. Introducción.

La diabetes mellitus es la sexta causa más común de muerte en el mundo (Fonte, Araújo, Reis, & Sarmiento, 2013; Sonia & Sharma, 2012). Sólo el 20% de la insulina administrada por vía subcutánea alcanza su diana de acción (Fonte et al., 2015) y la biodisponibilidad oral de la insulina es incluso menor, de hecho supone sólo del 1 al 2 % (Chen, Sonaje, Chen, & Sung, 2011; Sarmiento et al., 2007). El desarrollo de un sistema de liberación oral que proteja a la insulina de la degradación a lo largo del sistema digestivo y que permita mejorar la captación por parte de las células intestinales presenta gran interés (Sonia & Sharma, 2012).

Woitiski, Veiga, Ribeiro & Neufeld (2009) publicaron la síntesis de nanocomposites compuestos de quitosano (CS), alginato (ALG), sulfato de dextrano (DS), Poloxamer[®] 188, poly (etilenglicol) (PEG) 4000 y albúmina de suero bovino (BSA) para la liberación oral de insulina (Woitiski, Neufeld, Ribeiro, & Veiga, 2009). El método de Woitiski, que será considerado como el método de referencia a lo largo de este capítulo, permite obtener nanocomposites (NC) con un diámetro hidrodinámico alrededor de 300 nm. Sin embargo, varias horas después de que el proceso de síntesis termine, las nanoestructuras obtenidas agregan y la mayoría de las partículas alcanzan un tamaño micrométrico e incluso pueden observarse partículas milimétricas.

El ALG es un polisacárido lineal cuyos monómeros son el ácido manurónico (M) y su epímero en el C5, el ácido gulurónico (G), unidos mediante enlace β (1 \rightarrow 4). El ALG se ha utilizado en el desarrollo de nanocomposites debido a su capacidad para formar geles tras su interacción con iones dicatiónicos. Una suspensión de ALG en estado de pre-gel se puede estabilizar tras la adición de un polímero policatiónico (Li et al., 2008; Sonia & Sharma, 2012; Zhang et al., 2011). Los nanocomposites basados en ALG se han utilizado para la aplicación por vía oral de fármacos debido a que el ALG resiste el pH ácido del estómago, protegiendo el fármaco encapsulado y se degrada a pH básico en el intestino (Fonte et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2015, 2012; Zhang et al., 2011). Además, el ALG favorece la carga de la insulina en nanopartículas compuestas de CS (Goycoolea, Lollo, Remuñán-López, Quaglia, & Alonso, 2009).

El DS es un polianión polisacárido consistente en residuos de glucosa unidas por enlace α (1 \rightarrow 6) en la cadena principal con ramificaciones mediante enlaces α (1 \rightarrow 3). El DS tiene 2.3 cargas negativas por monómero (Chen et al., 2003) e interactúa con el CS mediante interacciones electrostáticas (Chaiyasan et al., 2013; Schatz, Domard, et al., 2004).

El poloxamer[®] 188 es una molécula anfifílica que presenta una región hidrofóbica constituida por propilen-óxido, rodeada por dos regiones hidrofílicas, constituidas por polietilen-óxido. El poloxamer[®] 188 forma micelas en disolventes hidrofílicos (Adhikari, Goliaei, Tsereteli, & Berkowitz, 2016; Domb, Kost, & Wiseman, 1997) y se

incorpora a geles por medio de uniones de hidrógeno (Calvo et al., 1997), donde actúa estabilizando las estructuras de las que forma parte por medio de interacciones estéricas, reduciendo de este modo la agregación (Woitiski et al., 2009). El PEG 4000 actúa estabilizando el nanosistema y mejora la penetración a través de las capas de mucus en el intestino (Chen et al., 2011).

La BSA es una proteína que previene la agregación y protege a la proteína cargada en el nanosistema de liberación del ataque ácido y de la degradación enzimática (Woitiski et al., 2009).

En este capítulo, describimos la producción de NC para la liberación oral de insulina que muestran estabilidad frente a la agregación. Para la síntesis de los nanodispositivos, se utilizó CS de diferente peso molecular (MW) y a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos, muestran que el tamaño de los nanocomposites depende más de la concentración de CS que del MW de dicho polímero.

2. Materiales y métodos.

El alginato de sodio procedente de algas pardas (A2158), el CS de bajo peso molecular (LMW) (448869-250G) y CS de peso molecular medio (MMW) (448877-250G) y la BSA (A1933-25G) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemie (Francia).

El sal de sulfato de dextrano de *Leuconostoc* spp. (5000 Da) y la poli(vinilpirrolidona) K 90 (PVP K90) se adquirieron de Fluka (Suiza); el poloxamer[®] 188 (Kolliphor 188) fue suministrado por BASF (Alemania); el PEG 4000 fue adquirido de Fischer Scientific (Reino Unido); el cloruro de calcio fue adquirido de Riedel-de-Haën (Alemania); el ácido láctico 90% fue adquirido de VWR BDH Prolabo (Francia); el ácido clorhídrico 37% y el hidróxido de sodio fueron adquiridos de Merck KGaA (Alemania); y la insulina humana recombinante 100IU/mL Actrapid[®] fue adquirida de Novo Nordisk A/S (Dinamarca).

Las disoluciones stock fueron preparadas en agua ultrapura. El CS se disolvió en ácido láctico al 0.5 % (v/v) y se filtró aplicando vacío a través de papel de filtro Millipore #2, cuyo diámetro de poro es 0.7 μm . Las membranas de diálisis SnakeSkin[®] de 10000 MWCO (de sus siglas en inglés Molecular Weight Cut off, límite de peso molecular filtrado) (membranas de celulosa regenerada) se adquirieron de Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Los tubos con membrana Vivaspin 20 de 100000 MWCO PES para la ultracentrifugación se adquirieron de Sartorius. Las membranas de diálisis Spectra/Por[®] de 100000 MWCO para los ensayos de liberación fueron adquiridos de Biotech CE Tubing.

- Disoluciones stock.

En el primer paso de la síntesis de NC, se preparó una disolución, que llamaremos A, de composición final ALG 6×10^{-4} g/mL, DS 5000 Da 2×10^{-4} g/mL y poloxamer[®] 188 4×10^{-4} g/mL e insulina 6×10^{-5} g/mL en agua mili Q se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 4.9 con HCl 0.1 M. Se preparó de forma paralela una disolución similar que no contenía insulina para la síntesis de NC sin cargar.

Se preparó una disolución de cloruro cálcico 2×10^{-3} g/mL.

Se disolvió CS, tanto CS LMW como CS MMW a una concentración final de 10^{-3} g/mL. La solubilidad del polímero se favoreció añadiendo ácido láctico 0.5% (v/v) y manteniendo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el pH de la disolución se subió hasta un valor de 4.6 con NaOH 1 M. A continuación, la disolución se filtró a través de papel Millipore #2, aplicando vacío. Luego, las disoluciones se diluyeron hasta alcanzar una concentración final igual a 10^{-5} g/mL y 10^{-7} g/mL con agua miliQ y agitando durante 24 h. Pasado ese tiempo, se observó un descenso del pH y por ello, se reajustó dicho parámetro hasta 4.6.

En el momento de la síntesis de los NC, se adicionó 3.5×10^{-3} g/mL PEG 4000 a la disolución correspondiente de CS, y se mantuvo en agitación durante 24 h. A continuación, se reajustó el pH de la disolución, de nuevo, a 4.6. Curiosamente, observamos que, para las disoluciones que contenían CS a concentración 10^{-5} g/mL, el pH se incrementó hasta 4.8. En esos casos, el pH se ajustó con no más de una gota de HCl diluido. Para las disoluciones que contenían CS a concentración final igual a 10^{-7} g/mL, el pH disminuyó hasta 3.9, y, el pH fue reajustado con 2 gotas de NaOH diluido. La disolución que contenía CS y PEG 4000 será referida como B.

Se preparó una disolución de BSA 10^{-2} g/mL que se mantuvo en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el pH se ajustó a 4.6 con HCl 0.1 M.

Todas las disoluciones se mantuvieron a 4 °C hasta que se utilizaron para la síntesis de los NC.

- Preparación de los nanocomposites.

Se adicionó gota a gota 7.5 mL de la disolución de cloruro de calcio a 117.5 mL de la disolución A. Después, se adicionó gota a gota 25 mL de la disolución B compuesta bien por 10^{-5} g/mL o 10^{-7} g/mL de bien CS MMW o CS LMW. Por último, se adicionaron gota a gota 25 mL de BSA a la suspensión previamente compuesta por la unión de las disoluciones A y B. Las dispersiones de NC se concentraron mediante diálisis frente a PVP K90 durante 24 horas a 4 °C usando membranas de celulosa regenerada con un MWCO de 10000 Da.

- Medidas

Se midió el diámetro hidrodinámico mediante DLS. En el caso de las medidas de CS, cada ensayo consistió en 100 medidas. En el caso de las medidas de NC, cada ensayo consistió en 6 medidas. En ambos casos, el número de runs de cada medida fue determinado por el software para alcanzar el criterio de calidad. Cada run duró 10 segundos sin retraso entre las medidas. El diámetro hidrodinámico de los NC se midió inmediatamente después de la síntesis y 21 días después. Cada curva representada en las figuras corresponde a la media de las medidas realizadas. Hemos comprobado que este protocolo da resultados muy reproducibles en las distribuciones de intensidad y número.

Para las medidas del potencial Z, cada ensayo consistió en 3 medidas en régimen automático del software.

Para determinar la eficiencia de encapsulación, la suspensión de nanocomposites se ultrafiltró usando vivaspin 20 100000 MWCO PES mediante centrifugación a 6000 g durante 60 minutos a 4 °C. El filtrado recogido se diluyó con un factor 1:2 en alcohol absoluto y se midió por triplicado mediante HPLC.

De forma simultánea, la misma suspensión de NC se diluyó en un factor 1:6 en fluido intestinal simulado (FIS) sin pancreatina (ASP31-NF26) y se agitó en un agitador orbital durante 180 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se tomó una muestra y se diluyó en un factor 1:2 en alcohol absoluto, se centrifugó durante 10 minutos a 13500 g a temperatura ambiente. Tras filtrar el sobrenadante usando filtros con tamaño de poro igual a 0.22 µm, se midió por triplicado mediante HPLC. La eficiencia de encapsulación es la diferencia entre la cantidad inicial de insulina y la cantidad de insulina en el sobrenadante de la suspensión de los nanocomposites.

Para la determinar el perfil de liberación de insulina en fluidos digestivos simulados sin enzimas, se dializó un volumen de 15 mL de una suspensión de NC. Inicialmente, la diálisis se realizó frente a 45 mL de fluido gástrico simulado (FGS) sin pepsina (USP31-NF36) a 37 °C durante 120 minutos en agitación. A continuación, frente a 45 mL de FIS sin pancreatina (USP31-NF26) durante 180 minutos. Se tomaron alícuotas del fluido en el que se estaba realizando la diálisis, a tiempos predeterminados. El volumen sustraído fue reemplazado por volumen del fluido simulado correspondiente a temperatura. Para la determinación de la insulina liberada de los NC, las muestras se diluyeron en un factor de 1:2 en etanol absoluto, se centrifugaron a 13500 g durante 15 minutos y, posteriormente, se analizó la concentración de insulina mediante HPLC, dicho procedimiento se realizó por triplicado.

Se estudió el contenido de insulina usando un sistema HPLC LC-2010 (Shymadzu Co., Japan) equipado con una bomba cuaternaria, un detector UV, que se fijó a 214 nm, una columna de fase reversa X-Terra RP 18 de 5 µm, 4.6 x 250 mm (Waters Cs., USA), y una precolumna Purospher STAR RP-18, 5µm, 4 x 4 mm (Merck KGa, Alemania). La

fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y una disolución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (B) operados en gradiente a una velocidad de flujo igual a 1.0 mL/min fijado a 30:70 (A:B), después se cambió a una proporción 40:60 (A:B) durante 5 minutos para la elución de la muestra, y después se cambió a una proporción 30:70 (A:B) durante 1 minuto para la elución. Los cronogramas se recogieron tras la realización de las medidas y después se analizó el área bajo el pico de la curva mediante un integrador automático. El método fue validado y se determinó la linealidad en el rango 1.4 – 112 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9998$).

Se determinó la estabilidad de la muestra mediante el uso del dispositivo LUMiSizer[®] 611/610 photometric pulsed NIR-LED, que usa luz de longitud de onda 870 nm (LUM GmbH, Alemania). Las medidas se desarrollaron a 25 °C en una celda rectangular de poliamida con un paso óptico de 10 mm y un tapón PP (110-135XX). Las muestras se centrifugaron a 1056 RCA hasta registrar 200 perfiles de transmitancia, tomando un perfil cada 60 segundos. Después, la aceleración de centrifugación aumentó hasta los 1878 RCA hasta que se registraron 300 perfiles, tomando un perfil cada 90 segundos. El software calculó un índice de inestabilidad en base a la clarificación (incremento en la transmisión de la luz debido a la separación de fases ocasionada por la sedimentación de las partículas) a un tiempo de separación determinado, dividido entre la máxima clarificación. Este índice toma valores entre 0 (más estable) y 1 (más inestable). De esta forma, se consiguió comparar la agregación y la velocidad de sedimentación de NC centrifugados en el mismo evento de centrifugación. Para el cálculo del índice de inestabilidad fue necesario elegir una región de la celda de medida en la cual se apreciara inestabilidad en la secuencia de perfiles de transmitancia. Para realizar el análisis, se fijó el período de tiempo en el cual los cambios en la inestabilidad en el tiempo fueran lineales para cada muestra.

El dispositivo LUMiSizer[®] permitió analizar el tamaño de las partículas. Para este propósito, se escogieron tres posiciones de la región de la celda en la cual los cambios en los perfiles fueran más prominentes y se apreciara mayor inestabilidad del sistema. Como resultado, el software rindió como resultado los valores estadísticos del tamaño de las partículas presentes en la suspensión expresados como media armónica en nm y varios porcentajes de distribución del tamaño de las partículas.

El software de LUMiSizer[®] nos permitió medir la velocidad de sedimentación de las partículas en $\mu\text{m/s}$. Para ello, fue necesario fijar una región en la celda en la zona donde los cambios detectados fueran más significativos. Entonces, se debía elegir un intervalo de tiempo en el que la migración de las partículas fuera lineal y el software calculó la velocidad de migración de las partículas en la región para el período de tiempo seleccionado.

3. Resultados y discusión

Woitiski y colaboradores (2009) desarrollaron un sistema compuesto de CS y ALG que contenía también Poloxamer[®] 188, PEG 4000, DS y BSA como estabilizadores contra la agregación y potenciadores de la carga del fármaco. El sistema que desarrollaron mostró una buena eficiencia de encapsulación de insulina (*Woitiski, Veiga, Ribeiro, & Neufeld, 2009*). Sin embargo, tras el proceso de síntesis, se producía agregación de los NC obtenidos y como resultado se obtenían microcomposites.

En este capítulo, hemos introducido tres cambios principales al método desarrollado por *Woitiski* y colaboradores para mejorar los NC obtenidos. Hemos estudiado la cantidad óptima de CS en el sistema para conseguir nanoestructuras. Los resultados obtenidos indicaron que la reducción de la concentración de CS, sin importar el MW del polímero, daba lugar a la obtención de composites de tamaño nanométrico.

Debido a la diferente naturaleza electrostática de los polímeros usados (Tabla VII-1), las cadenas de polielectrolitos de carga opuesta se atraen y se unen en el proceso de síntesis de NC atrapando fármacos hidrofílicos en el proceso. Una vez obtenidas las nanoestructuras, la BSA que se encontraba en la superficie de los NC debería prevenir la agregación de los mismos. Sin embargo, a pH 5.1, la interacción BSA-BSA permitía la aproximación de las estructuras en las que la proeína estaba adsorbida (*Valle-Delgado et al., 2004*), como resultado se producía la agregación de las estructuras completas. Por lo que el primer cambio introducido en la formulación consistió en bajar el pH de la disolución de BSA hasta 4.6 con lo que el potencial Z aumentó ligeramente hasta 10 ± 3 mV y no se observó agregación de las estructuras.

El segundo cambio implicó la eliminación del tampón fosfato en la formulación. Este hecho se justificó por nuestro conocimiento previo de que el incremento de la fuerza iónica del medio conducía a la reducción o incluso la eliminación de las fuerzas electrostáticas que mantenían a los NC separados, y como resultado se producía la agregación de los mismos (*Collado-González et al., 2015; Pamies et al., 2014*).

El tercer cambio en la metodología consistió en el cambio en la concentración de CS. En este caso se redujo la concentración del polímero en la suspensión final ya que, tal como se ha publicado recientemente, este parámetro es importante para obtener NC de menor tamaño (*Collado-González et al., 2017; Mukhopadhyay et al., 2012; Woitiski et al., 2009*). Por tanto, prestamos especial atención a este aspecto.

En el sistema de referencia, para la síntesis de NC se utilizó CS en disolución a concentración igual a 7×10^{-4} g/mL. De acuerdo con los resultados publicados por *Collado-González* y colaboradores (*Collado-González et al., 2015, 2017*), una disolución con la concentración indicada anteriormente presentaría una importante proporción de cadenas de CS enredadas entre sí. La distribución de tamaños en la disolución de CS LMW a concentración igual a 7×10^{-4} g/mL reveló la presencia de una

población de estructuras en la región de decenas de nanómetros (Figura VII.1). Aunque existía una segunda población en la región de las centenas de nanómetros en la distribución en intensidad. La distribución en número indicó que la cantidad de esas partículas era muy pequeña. Una tercera población de partículas muy grandes se observó también en la distribución en intensidad, pero fue despreciable en término de número de partículas.

Tabla VII-1. Potencial Z de las especies poliméricas implicadas en la síntesis de los NC.

Especie polimérica	pH	potencial ζ (mV)
Alginato 6×10^{-4} g/mL	4.9	-52±6 89.7 % 3±4 7.2 % -11±3 3 %
Dextran sulfato 2×10^{-4} g/mL	4.9	-54±8 81.2 % -119±5 5.4 % -100±4 5.2 %
Poloxamer® 188 4×10^{-4} g/mL	4.9	-41±6 69.9 % -22±5 30.1 %
CS LMW 7×10^{-4} g/mL	4.6	42±8*
CS LMW 1×10^{-5} g/mL	4.6	35±6 76.8% 8±6 23.2%
CS MMW 1×10^{-5} g/mL	4.6	35±8 70.6% 58±2 11.0% 69± 3.13%
PEG 4000 3.5×10^{-3} g/mL	4.6	29±7 83.3 % 5±4 16.7 %
BSA 1×10^{-2} g/mL	5.1	2±5*
BSA 1×10^{-2} g/mL	4.6	10±3*

* Cuando no se indica porcentaje, el porcentaje es igual o mayor al 99%

Las disoluciones usadas en la nueva metodología tenían la misma concentración que la utilizada por *Collado-González* y colaboradores (*Collado-González et al.*, 2015, 2017), concretamente 10^{-5} g/mL y 10^{-7} g/mL. De acuerdo con la Figura VII.1, el CS LMW 10^{-5} g/mL mostró dos poblaciones en el rango de tamaño de decenas y centenas de nanómetros respectivamente. Además, la distribución fue más estrecha que en la disolución de CS LMW 7×10^{-4} g/mL.

Para evaluar el efecto del peso molecular del polielectrolito, se prepararon NC con CS MMW. De acuerdo con la Figura VII.1, la distribución de CS MMW 10^{-5} g/mL es similar a la distribución de CS LMW a la mayor concentración medida. Sin embargo, la distribución en número se adapta mejor a la distribución de CS LMW a la misma concentración.

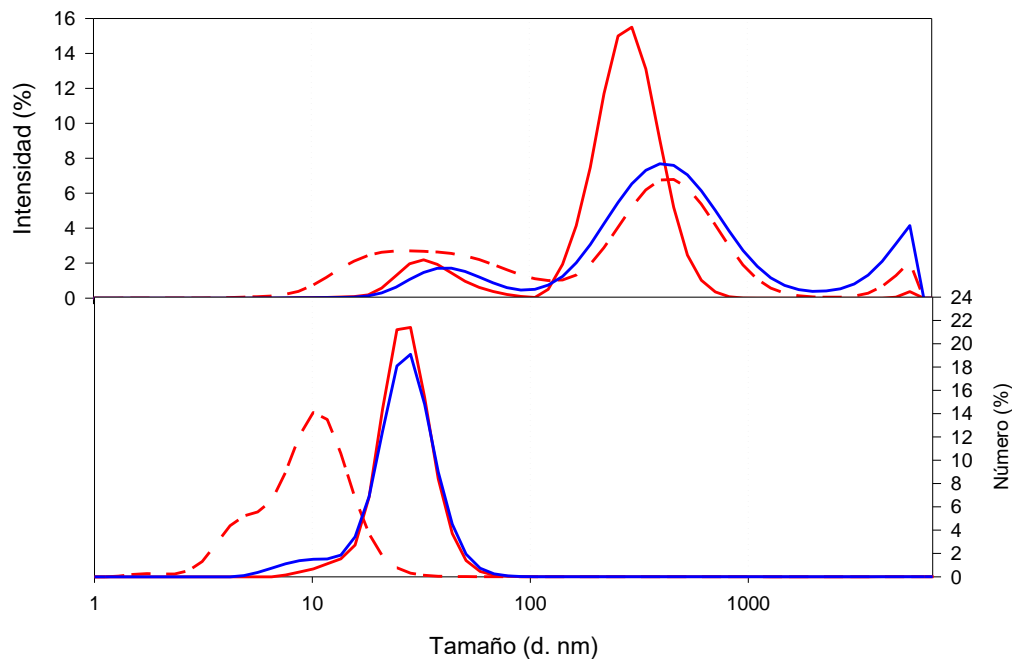


Figura VII.1. Comparación del diámetro hidrodinámico de los agregados de CS en disolución a pH 4.6. Las curvas representadas corresponden a CS LMW 7×10^{-4} g/mL (línea roja discontinua), 10^{-5} g/mL (línea roja continua) y CS MMW 10^{-5} g/mL (línea azul continua)

El protocolo de síntesis se mantuvo, y con ello, los volúmenes de las disoluciones. Por lo que la variación en la concentración de CS supuso una disminución del biopolímero total en la síntesis de los NC. De 17.5 mg en el método de referencia a bien 250 μ g, bien 2.5 μ g, en los nuevos métodos. Estas variaciones representaron una disminución en un factor de 70 a 7000, respectivamente.

De acuerdo con la Figura VII.2 y la Tabla VII-2, que representan la distribución de tamaño que contenía 250 μ g de bien CS LMW o CS MMW, cualquiera de los casos rindieron poblaciones amplias centradas en el rango de los cientos de nanómetros. Concretamente fue 300 nm para CS LMW y 500 nm para CS MMW. Cuando la cantidad del polímero se redujo a 2.5 μ g tanto de CS LMW como de CS MMW, las poblaciones presentes se desplazaron hacia valores mayores de diámetro hidrodinámico, de nuevo en la misma región de tamaños para ambos casos, específicamente, 900 nm. Se encontraban diferencias comparando los resultados de las estructuras obtenidas mediante los nuevos protocolos y las obtenidas mediante la metodología de referencia. Mientras con los primeros no hubo una cantidad significativamente alta de partículas mayores de 1 μ m, el sistema de referencia rindió una población principal de nanocomposites de 300 nm pero también una cantidad significativa de microcomposites en el orden de 1500 μ m y 4300 μ m.

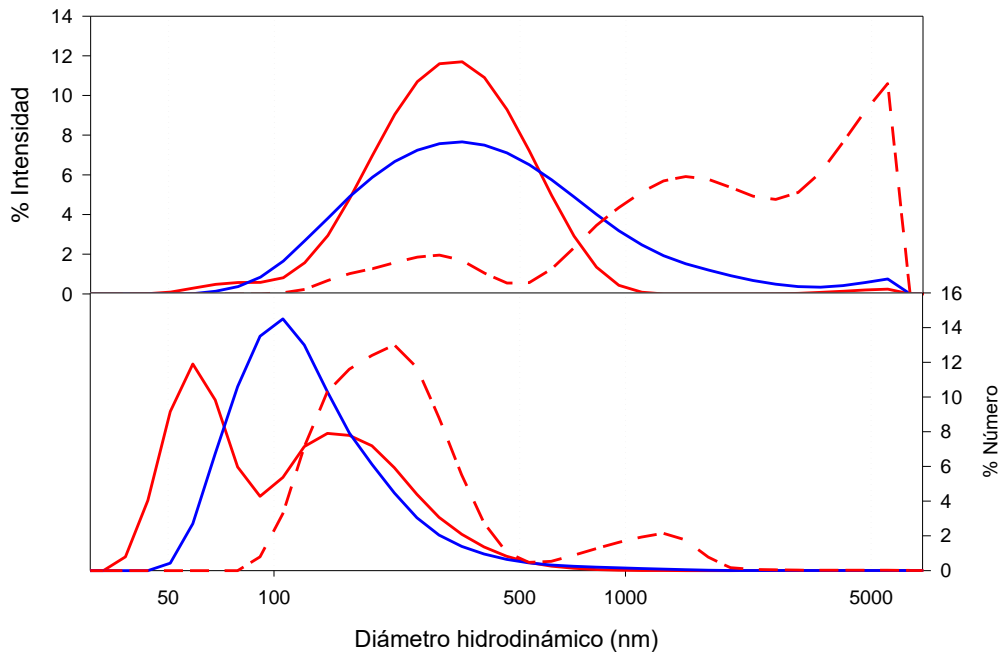


Figura VII.2. Comparación del diámetro hidrodinámico de los NC en función del tipo y concentración de CS utilizado para la síntesis de los composites. Los NC preparados con CS LMW según el protocolo de *Woitiski* y colaboradores se representa con una línea roja discontinua. Los NC compuestos según la nueva metodología preparados con 250 µg de CS LMW aparecen representados con una línea continua roja y los preparados con 250 µg de CS MMW aparecen representados con una línea continua azul.

Tabla VII-2. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad de los NC compuestos mediante el protocolo de *Woitiski* y colaboradores (2009) y NC preparados mediante la nueva metodología en la cual se utilizó CS LMW o MMW. La masa total de CS en cada lote se indica en la tabla. Los resultados corresponden a la media de 6 medidas.

	Diámetro hidrodinámico (nm)
Protocolo de <i>Woitiski</i> y colaboradores; LMW CS 17.5 mg	1526±611 47.5%
	4264±989 41.3%
	267±85 11.3%
CS LMW 250 µg	345±163*
CS LMW 2.5 µg	875±600*
CS MMW 250 µg	517±483*
CS MMW 2.5 µg	863±502*

* Cuando no se indica porcentaje, el porcentaje indicado representa el 98% de las partículas de la muestra o una proporción mayor.

De acuerdo con las medidas de potencial Z, los NC sintetizados presentaban una carga negativa (Tabla VII-3). Nuestra hipótesis fue que el CS actuaba como un pegamento entre las diferentes estructuras formadas por ALG, DS, poloxamer® 188, e insulina. De ese modo, el potencial Z de los nanocomposites reveló la presencia de los polímeros cargados negativamente en la superficie. Ya que el ALG resiste el pH ácido sin

degradarse, la disposición del mismo en la superficie de la estructura obtenida podría evitar la degradación del CS en el ambiente ácido en el estómago. Sin embargo, puesto que la BSA se adiciona en la última etapa del proceso de síntesis, cuando los NC ya están formados, y no se observa un pico en el rango de las decenas de nanómetros en el análisis de DLS cuando se analizan las nanoestructuras finales, la proteína debería estar adherida a la superficie de las mismas. La BSA en disolución mostró una carga positiva a pH 4.6 (Tabla VII-1) pero cuando se adicionó a los NC, el carácter positivo de la proteína no modificó el potencial Z negativo de las estructuras finales formadas. Es importante observar que el potencial Z de los NC formados reveló que estas estructuras eran estables, ya que estaban fuera del rango de inestabilidad.

Tabla VII-3. Potencial Z de los NC sintetizados mediante el método de Woitiski o mediante el nuevo método propuesto en este capítulo. La cantidad total de CS usada en cada formulación se indica en la propia tabla. Los resultados corresponden a la media de 6 muestras.

	potential Z (mV)
Método de referencia, CS LMW 17.5 mg	-28±9
CS LMW 250 µg	-28±5
CS LMW 2.5 µg	-30±11
CS MMW 250 µg	-31±5
CS MMW 2.5 µg	-33±10

El tamaño de los NC presentes en las muestras permaneció casi sin cambios desde la síntesis hasta 21 días mantenidos a 4 °C (Figura VII.3).

La migración de los NC preparados con 2.5 µg o 250 µg de CS LMW o de CS MMW se representan en la Figura VII.4 y permitió el estudio del índice de inestabilidad, del tamaño hidrodinámico y de la velocidad de sedimentación de las nanoestructuras.

El índice de inestabilidad es un parámetro relativo que se usa para comparar la estabilidad de diferentes suspensiones que se han sometido al mismo ciclo de centrifugación. En este caso se entiende por estabilidad la ausencia de cambio en el tamaño de las partículas. De acuerdo con el análisis de las partículas sometidas a este experimento (Tabla VII-4), los NC con mayor contenido en CS (250 µg), independientemente del MW del polímero, mostraron mayor estabilidad que aquellos que contenían una cantidad menor de CS (2.5 µg). Los diámetros hidrodinámicos de las nanoestructuras analizadas con el sistema LUMiSizer[®] fueron bastante similares a los determinados al analizar las muestras con DLS. Los resultados obtenidos indicaron nuevamente que los NC obtenidos con menor cantidad de CS presentaban mayor diámetro hidrodinámico que aquellos compuestos con mayor cantidad de CS.

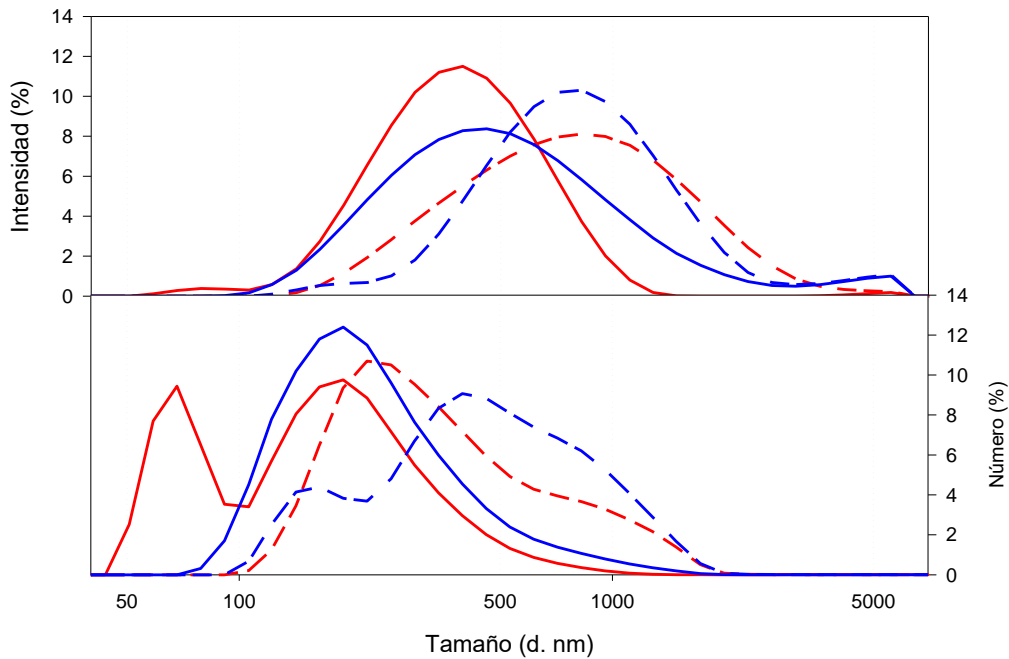


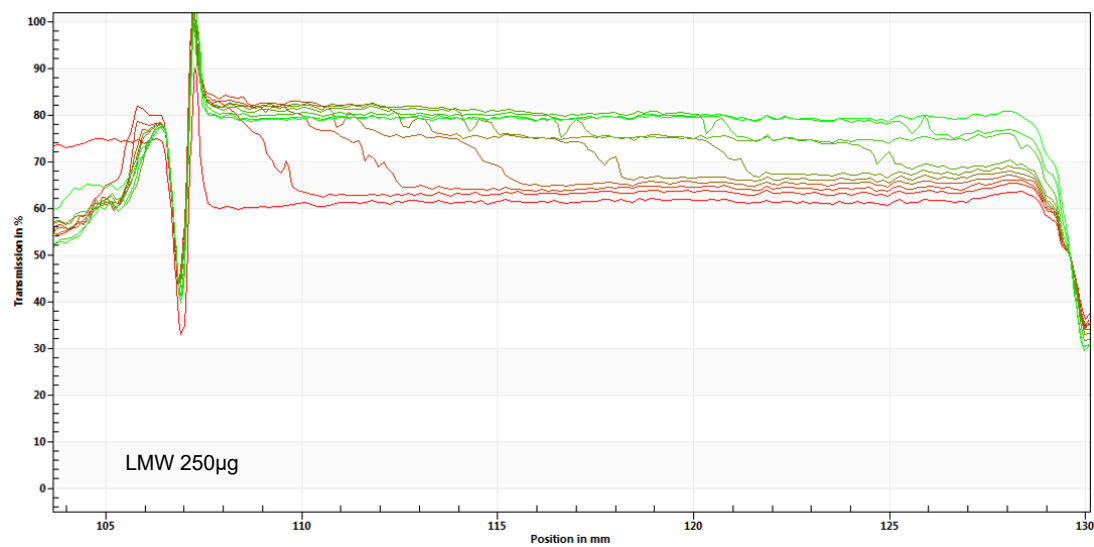
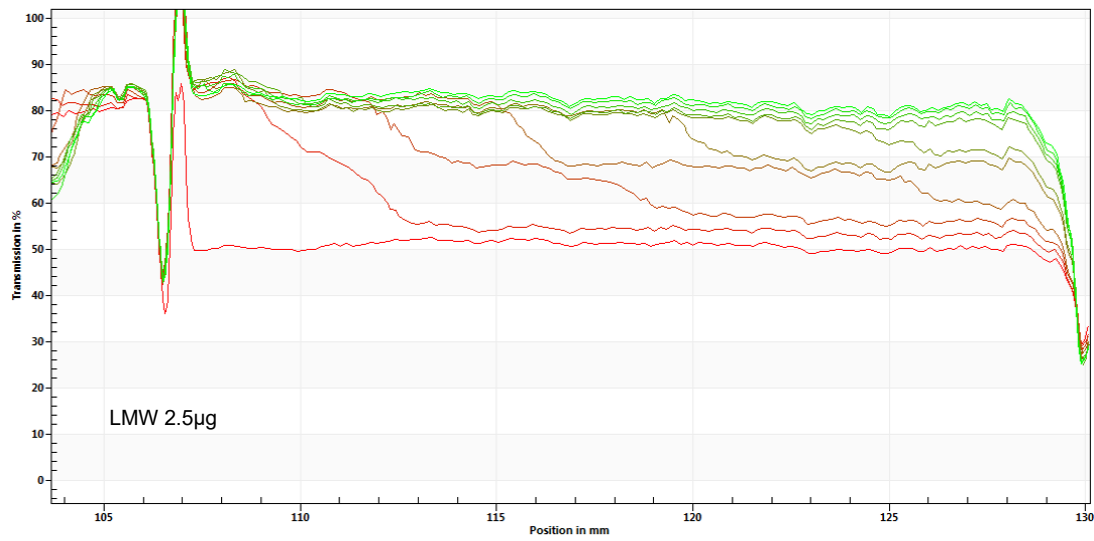
Figura VII.3. Comparación del diámetro hidrodinámico de los NC en función del tipo y concentración de CS usado para la síntesis de los composites preparados con la metodología propuesta. Los NC preparados con 250 µg de CS LMW aparecen representados con una línea continua roja, y los preparados con 2.5 µg de CS LMW aparecen representados con una línea roja discontinua. Los preparados con 250 µg de CS MMW aparecen representados con una línea continua azul y los preparados con 2.5 µg de CS MMW aparecen representados con una línea discontinua azul.

Tabla VII-4. Índice de inestabilidad y distribución del tamaño de partícula de los nanocomposites preparados. El análisis se realizó en el LUMiSizer®. El índice de inestabilidad y la extensión son parámetros adimensionales.

Muestra	Índice de inestabilidad	Media (nm)	Extensión (x90-x10)/x50
CS LMW 250 µg	0.155	485.4	0.7741
CS LMW 2.5 µg	0.560	857.3	0.7879
CS MMW 250 µg	0.125	465.4	0.7004
CS MMW 2.5 µg	0.625	924.1	0.7980

El análisis de la velocidad de migración dio lugar a 4 valores en el caso de los NC con mayor contenido en CS y a 2 valores en aquellos casos en los que la cantidad de CS era menor. Como resultado, se podía asumir que las nanoestructuras compuestas con 250 µg de CS mostraron 4 poblaciones tras ser expuestas a estrés. Dichas poblaciones deberían ser muy similares ya que la velocidad de migración también era similar. También se puede asumir que en el caso de los NC preparados con una cantidad de CS igual a 2.5 µg, sólo se encontraron 2 poblaciones tras la exposición al estrés. En este caso, los nanodispositivos no fueron similares entre ellos ya que las velocidades de

sedimentación no eran similares entre sí (Figura VII.5 y Tabla VII-5). Estos resultados reforzaron las poblaciones anchas que encontramos en el análisis en DLS.



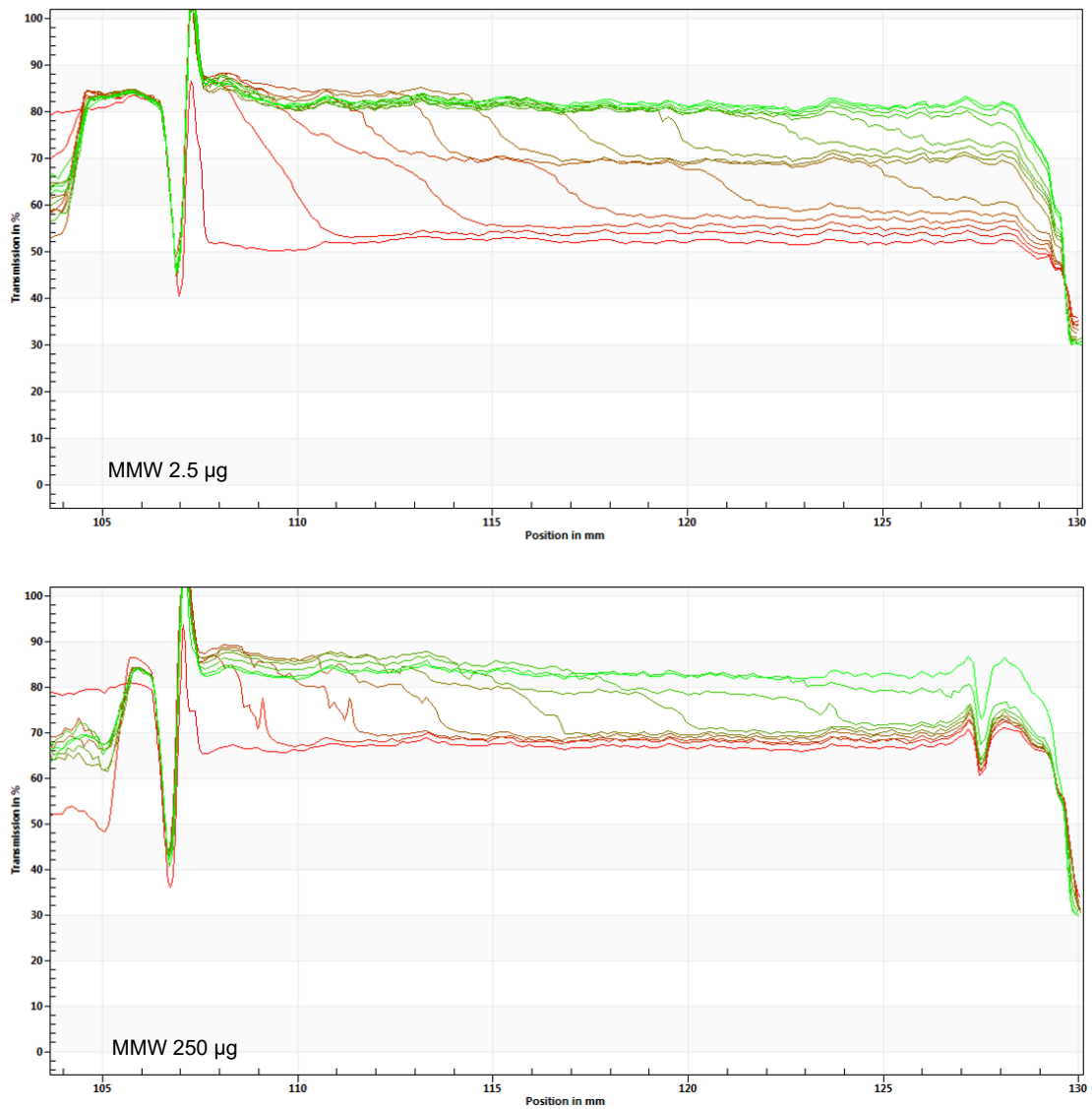


Figura VII.4. Representación de la transmitancia de luz a través de las muestras de nanocomposites preparados con 2.5 µg o 250 µg de CS LMW o con 2.5 µg ó 250 µg de CS MMW. Cada línea representa un perfil de transmitancia en distintos instantes del experimento. Los perfiles iniciales se representan en rojo y corresponde a un valor aproximado de 80 %. Conforme la centrifugación avanza, el color se torna verdoso, de modo que el último perfil se representa en verde.

Tabla VII-5. Velocidad de sedimentación de los nanocomposites analizados mediante LUMiSizer.

Muestra	CS LMW 250 µg	CS LMW 2.5 µg	CS MMW 250 µg	CS MMW 2.5 µg
Velocidad µm/s	1.246±0.019	11.370±0.462	1.190±0.059	13.300±0.866
	2.264±0.060	6.063±0.433	1.942±0.066	7.349±0.546
	2.332±0.058		2.121±0.065	

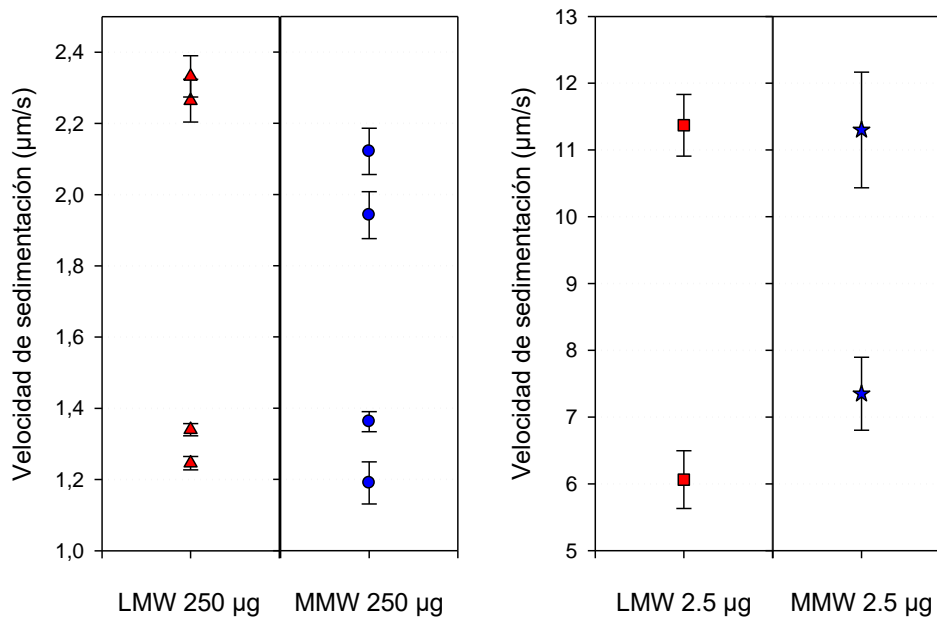


Figura VII.5. Velocidad de sedimentación de los nanocomposites sintetizados. Este parámetro se analizó mediante LUMiSizer tras la centrifugación de las muestras como se indica en la sección Métodos.

A partir de los principios físicos de la centrifugación podemos establecer una relación cuadrática entre la velocidad de sedimentación y el radio de la partícula que sedimenta (ver página 54; Ecuación II.77). Nuestros resultados experimentales, recogidos en la Tabla VII-5 y Figura VII.5 se ajustan bien a esta descripción. De forma concreta, los NC que contenían 2.5 µg de CS mostraron una velocidad de sedimentación 10 veces mayor que los nanocomposites con mayor contenido en CS (Figura VII.5).

En resumen, de acuerdo con los resultados del análisis del LUMiSizer[®], los NC obtenidos con 250 µg de CS dieron lugar a poblaciones muy similares de nanoestructuras, las cuales eran menores, en términos de diámetro hidrodinámico, y presentaban una velocidad de migración menor, lo que se puede traducir como mayor estabilidad que aquellos obtenidos con un contenido en CS de 2.5 µg. Este resultado se obtuvo independientemente del MW del CS usado.

Los resultados obtenidos recuerdan a los obtenidos por *Collado-González* y colaboradores (2017). En el que los autores encontraron una proporción adecuada entre AuNP:CS y CS:SFN para obtener una población de NC con una distribución óptima de diámetro hidrodinámico en cada sistema (capítulo VI). En ambos casos, las nanoestructuras se obtuvieron como resultado de la interacción electrostática de los polielectrolitos. Si la proporción en el sistema de bien el CS, bien el polianión, en cada caso, era bajo, se obtenían agregados grandes. Sólo un estrecho rango de proporciones entre ambas especies dio como resultado la obtención de nanocomposites con tamaño estable, en términos de no agregación.

Recapitulando, el sistema de referencia, que se preparó con CS LMW a una concentración igual a 7×10^{-4} g/mL rindió NC, microcomposites y composites milimétricos que no podían ser detectados mediante DLS. Al reducir la concentración de la disolución de CS utilizada hasta 10^{-7} g/mL, se obtuvo una población amplia que se extendía desde las decenas de nanómetros hasta las micras de diámetro hidrodinámico. En una situación intermedia encontramos el caso en el que la síntesis se llevó a cabo con una disolución de CS de concentración igual a 10^{-5} g/mL, en este último caso, los NC obtenidos mostraban un tamaño en el rango nanométrico de tamaño.

Los perfiles de liberación de insulina de cada tipo de NC preparado parecen bastante similares entre ellos (Figura VII.6). La insulina estaba presente en un muy bajo nivel a tiempo 0 en el sobrenadante, indicando que las nanoestructuras presentaban una buena eficiencia de encapsulación. La incubación de los NC en el FGS sin pepsina durante 2 horas dio lugar a una baja liberación de insulina retenida en los nanodispositivos. Concretamente un 42% y un 34% en el caso de los preparados con 250 μ g o 2.5 μ g de CS LMW, respectivamente. Y 39% y 36% en el caso de las nanoestructuras preparadas con 250 μ g o 2.5 μ g de CS MMW, respectivamente. A continuación, los NC se transfirieron a FIS sin pancreatina, y se incubaron hasta completar 24 horas de experimentación. Durante las 3 primeras horas en FIS, la liberación de insulina fue aproximadamente del 80% en cada caso. Específicamente 81% y 79% en el caso de NC preparados con 250 μ g o 2.5 μ g de CS LMW, respectivamente. Y 82% y 82% en el caso de los preparados con 250 μ g o 2.5 μ g de CS MMW, respectivamente. Los cálculos de la cantidad de insulina liberada se realizaron usando el valor de máxima insulina liberada a 24 horas como control de referencia para cada tipo de NC.

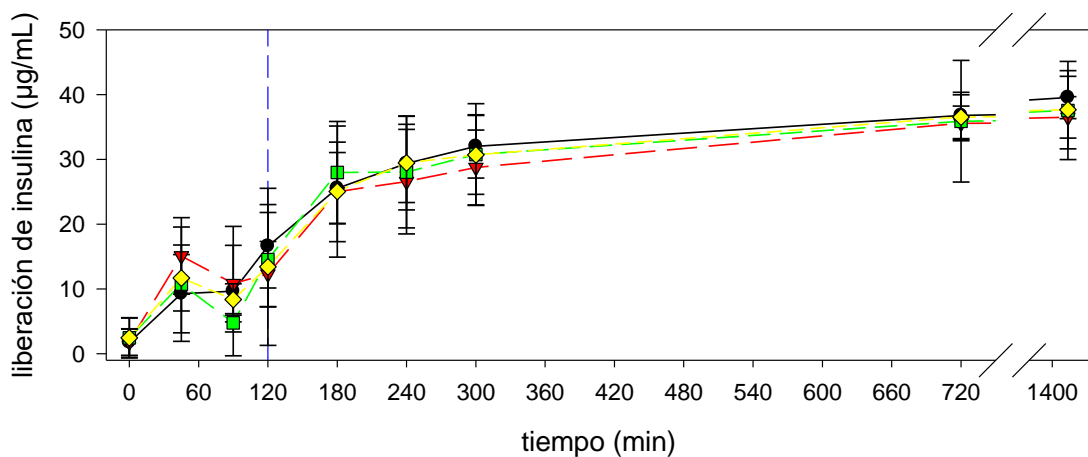


Figura VII.6. Liberación de insulina desde los NC preparados con 250 μ g (círculos y línea negra) o 2.5 μ g (triángulos y línea roja) de CS LMW o 250 μ g (cuadrados y línea verde) o 2.5 μ g (rombos y línea amarilla) de CS MMW. La línea vertical azul representa el cambio de FGS a FIS. El experimento se desarrolló como se indica en la sección de métodos de este capítulo.

Para estudiar la morfología de las nanoestructuras, éstas se analizaron mediante SEM. Como se observa en la Figura VII.7, los NC presentaban forma redondeada en todos los casos.

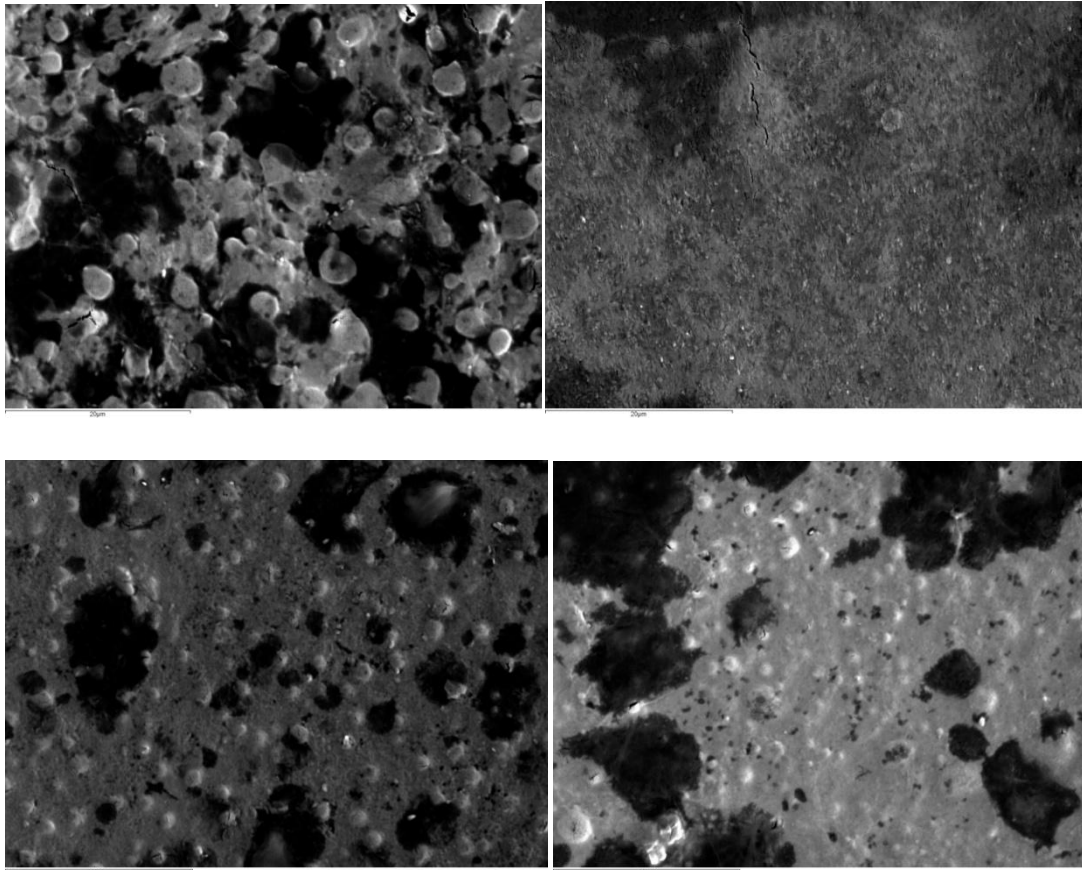


Figura VII.7. Imágenes de SEM de los NC preparados con 250 μg (izquierda arriba) o 2.5 μg (derecha arriba) de CS LMW o 250 μg (izquierda abajo) ó 2.5 μg (derecha abajo) de CS MMW. Todas las imágenes se tomaron con una magnificación de 2000x. La barra de escala aparece en la parte inferior izquierda de cada imagen y representa 20 μm .

4. Conclusiones.

En este capítulo mostramos la síntesis de unos sistemas de liberación de fármaco mejorados tras producir NC y estudiar la influencia de la concentración de CS en el tamaño de los mismos. Las nanoestructuras formuladas con baja cantidad de CS, concretamente 2.5 μg , presentaban mayor diámetro hidrodinámico que aquellos formulados con una cantidad mayor, concretamente 250 μg de CS, independientemente del MW del polímero. Al disminuir 100 veces la cantidad de polímero que forma parte de las nanoestructuras se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico en un factor de 2.5 en el caso de CS LMW y en un factor de 1.7 en el caso de CS MMW.

Los NC formulados con 2.5 μg o con 250 μg de CS, independientemente del MW del mismo, no mostraron agregación ni a lo largo del tiempo, ni al ser expuestos a centrifugación, lo que podría traducirse en alta estabilidad de las nanoestructuras.

Capítulo VIII : ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

1. Introducción.

Los sistemas de liberación de fármacos a menudo muestran agregación cuando se exponen a condiciones fisiológicas. Por ello es muy importante encontrar métodos de estabilización de las nanoestructuras en dichas condiciones. A lo largo del desarrollo de este trabajo hemos utilizado el CS de MMW para sintetizar nanocomposites (NC) con los que hemos conseguido estabilizar bien nanopartículas de oro recubiertas de citrato (AuNP) o bien nanopartículas de fibroína de seda (SFN). En este capítulo abordamos el siguiente paso en el desarrollo de nanosistemas de liberación de fármacos, que consiste en el estudio del efecto citotóxico de las nanoestructuras formadas.

Entre las propiedades extrínsecas de un estudio de toxicidad, encontramos las características propias del estudio con el que se pretende comprobar la biocompatibilidad de los nanosistemas. Así, en el caso de un estudio de citotoxicidad, existen discrepancias en los resultados de citotoxicidad para un sistema nanoparticulado en función de la línea celular utilizada para llevar a cabo dichos ensayos. También existen discrepancias entre los resultados obtenidos con líneas celulares y con ensayos *in vivo* realizados con animales de experimentación.

Si bien los ensayos de citotoxicidad se aplican extensamente en la literatura la información que aportan está sesgada como consecuencia de la simplificación del sistema. Así, se ha comprobado en estudios *in vivo*, con ratas, que el uso de nanopartículas de oro que no presentaron citotoxicidad frente a células HeLa, fueron letales para los animales como consecuencia del daño en el hígado, bazo y los pulmones (Chen, Hung, Liao, & Huang, 2009).

Por otro lado, los líquidos iónicos (IL) son, normalmente, sales formadas por un anión orgánico y un catión inorgánico. Son líquidos en una temperatura inferior a los 100 °C (Ghandi, 2014) y se utilizan en gran variedad de tecnologías y aplicaciones, por ejemplo en la síntesis de medicamentos, alimentos y plásticos o en procesos analíticos (Hayes, Warr, & Atkin, 2015; Keskin, Kayrak-Talay, Akman, & Hortaçsu, 2007) debido a sus propiedades químicas: su estabilidad química y térmica, su alta conductividad iónica (Lu, Yan, & Texter, 2009) y su baja presión de vapor, esta última propiedad les otorga el calificativo de disolventes verdes.

Por sus propiedades generales, los IL pueden ser fácilmente recuperados tras su uso, por ejemplo mediante técnicas de destilación en vacío. Además, reciben la calificación de disolventes de diseño debido a que sus propiedades pueden ser moduladas modificando la composición del anión, del catión o de ambos iones.

Existen diversos métodos para la obtención de las SFN. Los métodos tradicionales implican la utilización de disoluciones de sales inorgánicas (Asakura, Watanabe, Uchida, & Minagawa, 1984) o disoluciones hidroalcohólicas (Ajisawa, 1997) con las

que se obtenían suspensiones de fibroína no estable, que podía agregar y precipitar en los procesos de destilación necesarios para conseguir la concentración deseada de SFN. Como alternativa, para proteger las nanopartículas de procesos de agregación, se utilizaban disolventes orgánicos (Rockwood et al., 2011). Recientemente se ha descrito en la literatura un procedimiento que implica el uso de IL y de ultrasonidos para la obtención de SFN en un procedimiento más corto con el que, además, se consigue SFN con mejores propiedades mecánicas (Lozano-Pérez et al., 2015).

En la literatura aparecen gran variedad de ensayos en los que se evalúa la toxicidad de diversos líquidos iónicos utilizando diferentes modelos biológicos como la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Pinto, Costa, Lima, & Saraiva, 2012; Stolte et al., 2003; Ventura et al., 2014), algas verdes como *Pseudokirchneriella subcapitata* (Pretti et al., 2011), plantas acuáticas como *Lemna minor* (Zhang, Li, Chen, & Wang, 2013), invertebrados como *Daphnia magna* e vertebrados como *Danio rerio* (Pretti et al., 2011). De forma general, los resultados de los ensayos de toxicidad indicaron que el valor de EC_{50} , esto es la concentración del compuesto que produce la muerte del 50% de la población en estudio, de los IL monocatiónicos es menor que para los dicatiónicos, por lo que presentan mayor toxicidad que los segundos (Figura VIII.1). De acuerdo al valor de la EC_{50} , los IL dicatiónicos, presentan una toxicidad parecida a la de los disolventes orgánicos. Teniendo en cuenta los valores de toxicidad y las propiedades que presentan, los mejores disolventes son los IL dicatiónicos, al menos en los sistemas estudiados. No obstante, es importante también llevar a cabo estudios de citotoxicidad de los IL sobre diferentes tipos celulares, de modo que podamos estudiar la idoneidad del uso de los mismos en el desarrollo de productos farmacológicos.

Los objetivos de este capítulo son:

1. Estudiar la citotoxicidad de diversos IL dicatiónicos con el fin de encontrar líquidos iónicos de baja citotoxicidad para ser utilizados en la estabilización de las SFN y para evitar un efecto citotóxico en el caso de que tras la purificación de las SFN queden restos de dichos disolventes.
2. Estudiar la citotoxicidad de los sistemas nanométricos formulados, a saber, CS MMW, SFN, CS:SFN, AuNP y AuNP:CS.

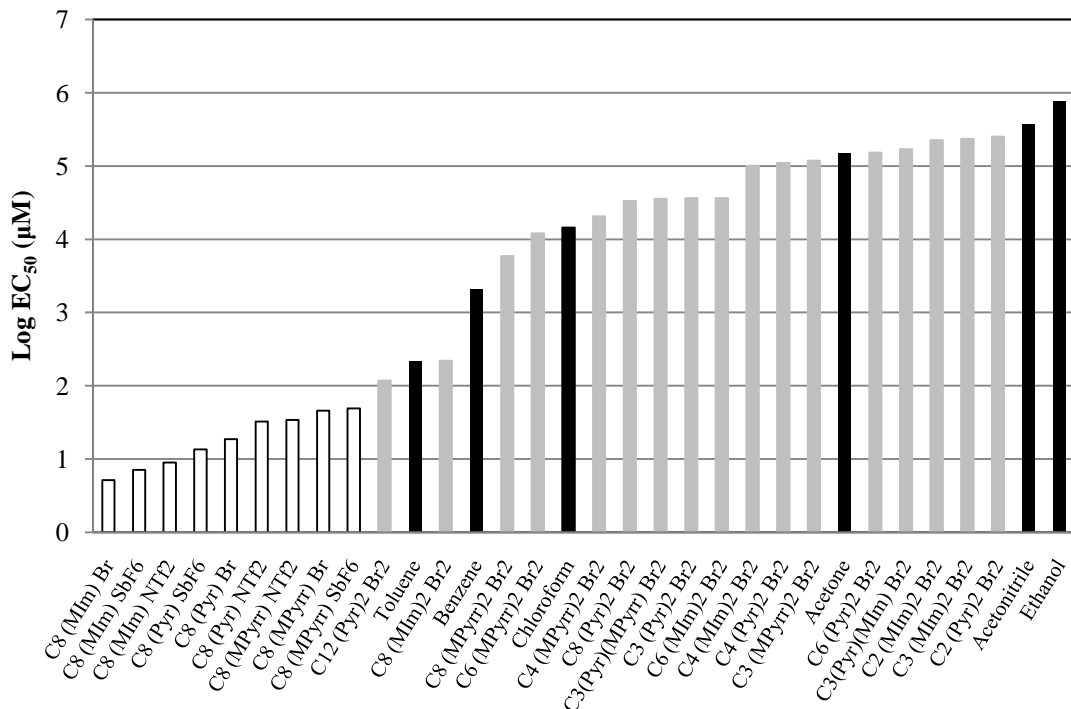


Figura VIII.1. Comparativa de los valores Log EC₅₀ de líquidos iónicos monocatiónicos (barras blancas) o dicationicos (barras grises) y disolventes orgánicos (barras negras). Tomado de (García Montalbán, 2016)

2. Materiales y métodos.

- Estudios de citotoxicidad

Para llevar a cabo el estudio de citotoxicidad, se aplicó el ensayo de reducción de una sal de tetrazolio (MTT) llevada a cabo por un cultivo celular (Mosmann, 1983). (Para más detalles, ver página 62).

Para determinar la densidad celular necesaria para desarrollar los estudios de citotoxicidad, se realizó una curva de crecimiento de las células HeLa en placas de 96 pocillos. Con este fin, se sembraron diferentes densidades celulares, concretamente 2500, 3000, 3500, 4000 y 4500 células por pocillo. Se realizó el análisis de reducción de MTT a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Para desarrollar los ensayos de citotoxicidad, se sembraron las células HeLa en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 3000 células por pocillo. 24 horas después de la siembra se cambió el medio de cultivo por medio al que se adicionó el IL o el nanosistema en estudio. El rango de concentraciones de IL aplicadas se extendió entre 10^{-3} M y 10^{-1} M en el caso de los líquidos iónicos C₄ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MPyrr)₂ Br₂, C₈ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MIm)₂ Br₂, y 10^{-3} M y 3×10^{-2} M en el caso de los líquidos iónicos C₄ (Pyr)₂ Br₂, C₆ (Pyr)₂ Br₂, C₈ (Pyr)₂ Br₂, C₄ (MIm)₂ Br₂ y C₈ (MIm)₂ Br₂. En el caso del estudio de la citotoxicidad del CS, se aplicaron las concentraciones (5.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2.0×10^{-4} , 2.5×10^{-4} y 3.0×10^{-4}) g/mL. En el caso de las AuNP se estudió el

efecto citotóxico de las concentraciones (2.9×10^{11} , 5.7×10^{11} , 8.6×10^{11} , 1.1×10^{11} , 1.4×10^{11} y 1.7×10^{11}) partículas/mL. Por último en el caso de las nanopartículas de SFN, se estudió el efecto citotóxico de las concentraciones (5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 1.5×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 2.5×10^{-5} y 3.0×10^{-5}) g/mL. En el caso de los NC compuestos por AuNP:CS 1:10 partícula:partícula o los NC compuestos por CS:SFN 1:1.6 mg:mg, se adicionaron volúmenes iguales a (5×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1.5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 2.5×10^{-1} o 3×10^{-1}) mL de una suspensión de nanocomposites por cada mL de medio de cultivo. Se realizaron tres ensayos independientes con seis réplicas por tratamiento en todos los casos estudiados excepto en el caso de las nanopartículas de oro y los NC compuestos de AuNP:CS, los resultados mostrados para estos sistemas corresponden a un único experimento realizado por triplicado. En todos los casos se incubaron las células en un incubador a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % HR. Se realizaron medidas de la viabilidad celular mediante MTT a las 24 h, 48 h y 72 h de la adición del sistema en estudio.

Se realizaron controles de proliferación en función de la osmolalidad del medio. Definiendo osmolalidad como el incremento de la presión osmótica debido al incremento en la concentración de solutos en el medio y tiene unidades de mmol/Kg. Para la realización de dichos controles, se adicionó sacarosa al medio de cultivo hasta que la osmolalidad del mismo alcanzó un valor de 400, 500 o 600 mmol/Kg. De forma que se pudiera descartar un efecto citotóxico ocasionado por la elevada osmolalidad del medio. Las condiciones de incubación y de ensayo fueron iguales a las descritas previamente.

- Ensayos de microscopía confocal

Para marcar las SFN con FITC, se adicionó lentamente 10 mL de una disolución de FITC en DMSO a concentración 10^{-2} g/mL a 10 mL de una suspensión de SFN 10^{-3} g/mL. Se mantuvo en agitación protegido de la luz y a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, para eliminar el exceso del fluoróforo que no había interactuado con las SFN, se centrifugó la suspensión a 13400 g durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. A continuación se adicionó agua MilliQ y se repitió el proceso de lavado hasta que el sobrenadante no mostró fluorescencia. A continuación se liofilizó la suspensión para obtener las SFN-FITC.

Las células MCF7 se sembraron a una densidad celular igual a 10^4 células por cm² en portas de vidrio de 4 pocillos. Tras 24 h de incubación, para permitir la adhesión de las células a la superficie del porta, se cambió el medio de cultivo y se adicionó SFN-FITC y se incubó durante 72 horas. A continuación se realizó la fijación de las células con glutaraldehído 2.5% durante 6 minutos. Posteriormente se retiró el fijador y se lavó con PBS. Para permeabilizar las membranas celulares, se aplicó una disolución de Tween 20 al 2% durante 5 minutos. Una vez retirado el Tween 20 se lavaron nuevamente los pocillos con PBS y a continuación se incubó con una disolución de DAPI 1/500 durante 3 minutos. Nuevamente se lavaron los pocillos con PBS al retirar el DAPI. A continuación se desmoldaron las placas de cultivo celular, quedándonos sólo con el porta que tenía las células marcadas en la superficie. Se realizó el montaje de las

muestras con glicerol 80% y se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Heidelberg, Germany) con el objetivo PL APO 40X/1.3 AN.

- Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en la comparación de los resultados de absorbancia de cada situación en estudio frente a su control de proliferación. Para analizar la variabilidad en las varianzas de los grupos muestrales, se aplicó el test Kruskal-Wallis. La hipótesis nula de este test afirma que las medianas de las poblaciones son iguales ($H_0: \theta_1 = \theta_2 = \theta_3$) y la hipótesis alternativa afirma que existe diferencia de, al menos, un par de medianas de las poblaciones en estudio ($H_1: \theta_1 \neq \theta_2 \neq \theta_3$) (Sheshkin, 2004). Al rechazar la H_0 y aceptar la H_1 , se aplicó el test de Tukey HSD, para comprobar qué poblaciones mostraban diferencias significativas con el control. En este test, la $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ y la $H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Utts & Heckard, 2012). La diferencia se calificó de significativa cuando $p < 0.05$. Dicho resultado indicó que la probabilidad de equívoco al rechazar la H_0 era de un 5%. Para realizar el estudio estadístico se utilizó el programa SigmaPlot 12.5.

3. Resultados y discusión.

3.1. Estudio previo a los ensayos de citotoxicidad

La proliferación de un cultivo celular presenta varias etapas (Figura VIII.2). Para llevar a cabo un análisis de citotoxicidad, es necesario que el cultivo celular se encuentre en fase exponencial de crecimiento. En dicha etapa, el aumento de absorbancia debida a la reducción del MTT es proporcional al número de células presentes en el cultivo. Sin embargo, si el cultivo se encuentra en fase estacionaria, no se observarán diferencias en la absorbancia a lo largo del tiempo. Por ello, es muy importante determinar el número de células que debemos sembrar para que el aumento de absorbancia a lo largo del tiempo sea exponencial. La curva de crecimiento de células HeLa reveló que una densidad celular de 3000 células/pocillo permitía seguir el crecimiento celular del cultivo sin alcanzar la fase estacionaria de crecimiento durante las primeras 96 horas de cultivo (Figura VIII.3).

Existen varios factores importantes que es necesario considerar antes de realizar un ensayo de citotoxicidad. Entre ellos, la concentración del compuesto a ensayar en el medio de cultivo es un parámetro crítico. Si la concentración es extremadamente baja será imposible determinar un efecto citotóxico puesto que no se podrá determinar variación en la proliferación del cultivo, mientras que en el caso contrario, si la concentración es muy alta, puede ocurrir que no se consiga determinar el grado de citotoxicidad sino únicamente la muerte de las células del cultivo. Otro factor, no menos importante, es la dilución del propio medio de cultivo al adicionar un volumen de disolución. Dicha adición puede conllevar un cambio en la osmolalidad y fuerza iónica del medio de cultivo e implica una dilución de los nutrientes del medio. Por tanto, puede

conllevar una variación de la tonicidad de la célula y pueden ocurrir procesos de plasmólisis o de turgencia, desembocando ambos procesos en la muerte celular. La dilución de los nutrientes podría desembocar en una situación en la que el aporte nutricional del medio fuera insuficiente para cubrir los requerimientos nutricionales óptimos para el correcto desarrollo fisiológico celular. De nuevo, podría desembocar en la muerte celular en un proceso totalmente independiente de la toxicidad del compuesto que se está analizando.

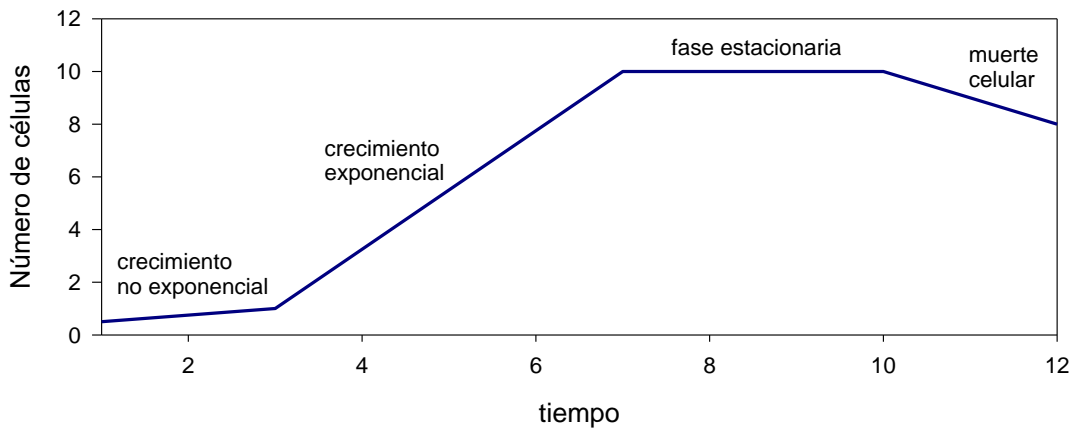


Figura VIII.2. Etapas de la proliferación de un cultivo celular.

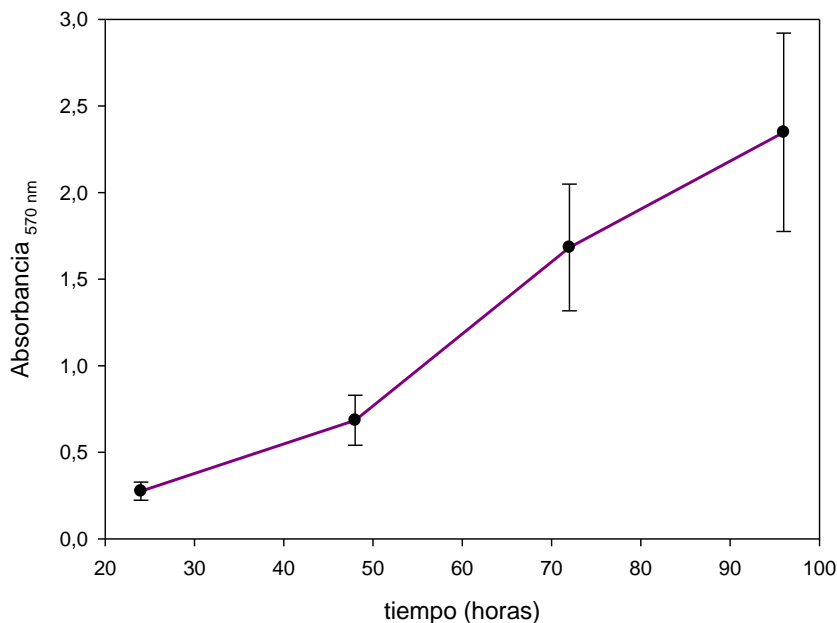


Figura VIII.3. Curva de crecimiento de células HeLa a (24, 48, 72 y 96) h. Se sembraron 3000 células/pocillo.

Es muy importante tener en cuenta, además, el tiempo de duplicación de las células en cultivo. En el caso de las células HeLa, el tiempo de duplicación es (28.6 ± 2.8) h (Wang et al., 2010). Para poder analizar el efecto de un compuesto sobre la proliferación celular, es necesario permitir que el cultivo proliferen. Por tanto, las

medidas de reducción de la sal deben hacerse a tiempos mayores del tiempo de duplicación. En este capítulo, los tiempos a los que se realizan las medidas de reducción son 24, 48 y 72 h desde la aplicación del sistema en estudio. De modo que teniendo en cuenta el tiempo de duplicación, entre la primera y la última medida de absorbancia, en condiciones óptimas, habría pasado más de dos generaciones.

Se realizó un ensayo de proliferación control de dilución en el que se adicionó un 30% de agua mili Q autoclavada al medio de cultivo MEM. Dicho control de proliferación mostró una proliferación semejante a la que mostraba el cultivo celular en condiciones estándar (Figura VIII.4). El análisis estadístico de los datos de absorbancia, reveló que no existían diferencias significativas entre ambas condiciones, a pesar de que el cultivo al que se había diluido el medio presentó una disminución en el valor de absorbancia a todos los tiempos de medida (Tabla VIII-1). Por tanto, se concluyó que la dilución aplicada al medio de cultivo no tenía un efecto tóxico sobre la proliferación celular. Así pues, la máxima dilución a aplicar en el medio de cultivo se fijó en un 30%.

Tabla VIII-1. Porcentajes de absorbancia del cultivo con medio diluido respecto al cultivo en condiciones estándar (100%).

	24 h	48h	72 h
% Absorbancia	80	72	83

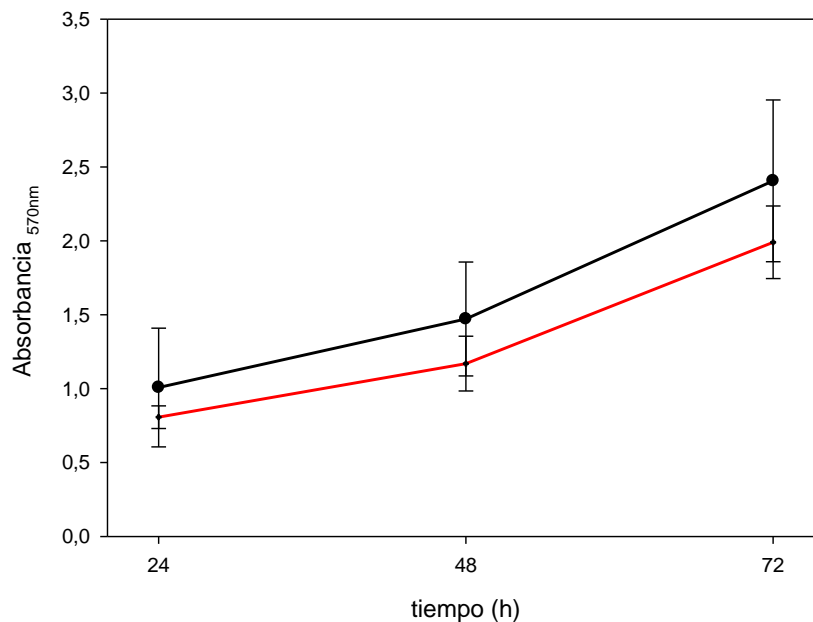


Figura VIII.4. Proliferación de células HeLa en condiciones de cultivo celular estándar (negro) y en condiciones de medio diluido (rojo).

Se realizó un ensayo control de proliferación en función de la osmolalidad del medio. El medio MEM completo, presentó una osmolalidad igual a 291 mmol/Kg. De acuerdo con los resultados registrados (Figura VIII.5), la proliferación de un cultivo que presentaba una osmolalidad igual a 400 mmol/Kg mostraba la misma tasa de

proliferación que un cultivo con medio completo. Sin embargo, si la osmolalidad del medio se incrementaba hasta 500 mmol/Kg, la tasa de proliferación disminuía significativamente, y si la osmolalidad del medio se incrementaba hasta 600 mmol/Kg, el cultivo celular no mostraba proliferación. Por lo que se fijó el valor de osmolalidad máximo en 400 mmol/Kg para realizar los ensayos de citotoxicidad.

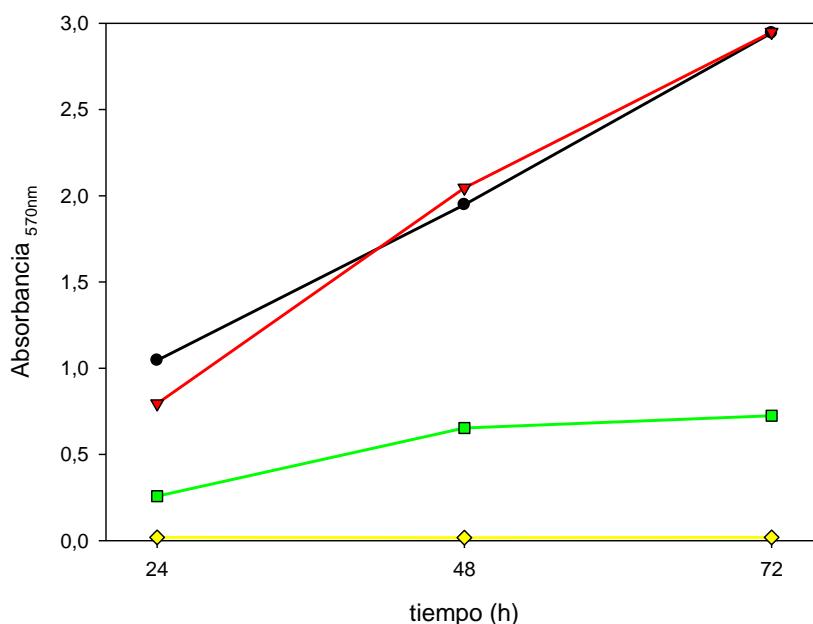


Figura VIII.5. Proliferación de un cultivo de células HeLa en función de la osmolalidad del medio: 291 mmol/Kg (negro), 400 mmol/Kg (rojo), 500 mmol/Kg (verde) y 600 mmol/Kg (amarillo).

3.2. Citotoxicidad de líquidos iónicos

Los IL se consideran disolventes de diseño ya que sus propiedades se pueden modular en función de los iones constituyentes. Entre dichas propiedades, encontramos el nivel de toxicidad de los mismos. Realizamos estudios de citotoxicidad de los IL utilizando como modelo células HeLa debido a que estas células se han utilizado extensamente en estudios de citotoxicidad. En este estudio incluimos IL dicatiónicos formulados con imidazolio, pirrolidonio o piridinio en los que variamos la longitud de la cadena lateral, que podía estar compuesta por 4, 6 u 8 carbonos. En todos los casos, los aniones consistían en dos iones bromuro (Figura VIII.6).

La Tabla VIII-2 recoge los valores de osmolalidad (mmol/Kg) del medio de cultivo completo tras la adición al mismo de cada uno de los líquidos iónicos utilizados a concentración igual a 0.03 M. Claramente la osmolalidad se vio incrementada al adicionar cualquiera de los líquidos iónicos en ensayo. Sin embargo, en todos los casos la osmolalidad era inferior a 400 mmol/Kg, por lo que la proliferación del cultivo de células HeLa no se debería ver afectada por la presencia de los diferentes IL.

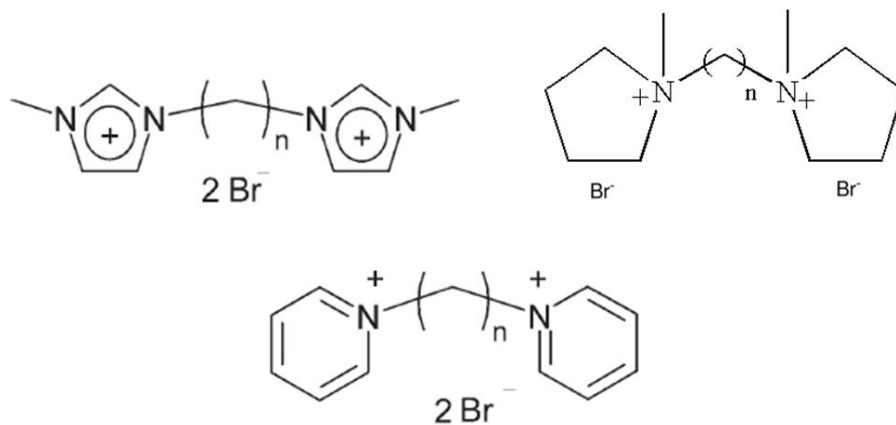


Figura VIII.6. Estructura de los líquidos iónicos dicatiónicos formulados con imidazolio (izquierda arriba), pirrolidonio (derecha arriba) o piridínio (abajo).

Tabla VIII-2. Osmolalidad del medio de cultivo MEM una vez adicionado el líquido iónico correspondiente a concentración igual a 0.03 M.

Longitud de la cadena lateral	(MPyrr) ₂ Br ₂	(Pyr) ₂ Br ₂	(MIm) ₂ Br ₂
C ₄	385	355	345
C ₆	343	312	379
C ₈	363	313	356

Se realizaron los ensayos de citotoxicidad a 24 h, 48 h y 72 h, y se calculó el valor de EC₅₀ para cada uno de los IL testados. Los resultados obtenidos indicaron que existía una relación directa entre la longitud de la cadena lateral del líquido iónico y la toxicidad del mismo (Tabla VIII-3 y Tabla VIII-4). De forma que a mayor longitud de cadena, mayor toxicidad, menor valor de EC₅₀. Por otra parte, a una longitud de cadena dada, los líquidos iónicos que contenían imidazolio eran más tóxicos que los que contenían piridinio y estos a su vez, más tóxicos que los que contenían pirrolidónio en su estructura. Estos resultados se encontraron al estudiar la toxicidad sobre la bacteria *Vibrio fischeri* (García Montalbán, 2016)

Tabla VIII-3. Valores de EC₅₀ para células HeLa tratadas con diferentes líquidos iónicos durante 48 h. Los valores indican la concentración en M.

48 horas	C ₄	C ₆	C ₈
C _n (Mim) ₂ (Br) ₂	0,022±0,004	0,006±0,003	0,003±0,002
C _n (Pyr) ₂ (Br) ₂	0,022±0,004	0,012±0,003	0,008±0,006
C _n (MPyrr) ₂ (Br) ₂	0,015±0,004	0,015±0,005	0,007±0,004

Tabla VIII-4. Valores de EC50 para células HeLa tratadas con diferentes líquidos iónicos durante 72 horas. Los valores indican la concentración en M.

72 horas	C ₄	C ₆	C ₈
C _n (Mim) ₂ (Br) ₂	0,012±0,003	0,004±0,003	0,0004±0,0002
C _n (Pyr) ₂ (Br) ₂	0,012±0,003	0,0062±0,0004	0,0014±0,0014
C _n (MPyrr) ₂ (Br) ₂	0,013±0,002	0,009±0,001	0,005±0,004

3.3. Ensayos de citotoxicidad de nanoestructuras

- Estudio de osmolalidad de las nanoestructuras

Se midió la osmolalidad del medio de cultivo tras adicionar el máximo contenido en nanopartículas o NC a ensayar al medio de cultivo (Tabla VIII-5). Los resultados indicaron una reducción en el valor de osmolalidad tras adicionar cualquier tipo de sistema nanométrico. Este resultado indicó que los componentes del medio estaban interaccionando con las nanoestructuras. De forma que dicha interacción redujo la concentración de elementos en suspensión en el medio.

Tabla VIII-5. Valores de osmolalidad (en mmol/Kg) del medio de cultivo (MEM) en las distintas condiciones ensayadas.

Sistema adicionado al medio	Variación respecto al medio completo	Osmolalidad (mmol/Kg)
EMEM	Referencia	287
EMEM diluido	Dilución 30% con agua mili Q autoclavada	217
CS MMW	c= 3x10 ⁻⁴ g/mL	283
SFN	c= 3x10 ⁻⁵ g/mL	218
AuNP	c= 1.7x10 ¹² partículas/mL	219
CS:SFN 1:1.6 mg:mg	Dilución 30 %	217
AuNP:CS 1:10 partícula:partícula	Dilución 30%	219

- Citotoxicidad del CS MMW.

El análisis de citotoxicidad del CS MMW sobre células HeLa reveló que el polímero a las concentraciones ensayadas no tenía un efecto antiproliferativo (Figura VIII.7). Un análisis comparativo de los datos de absorbancia de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de CS frente a la proliferación del control de dilución, indicó que la presencia del polímero no produjo una variación significativa en la proliferación del cultivo en las primeras 24 h de tratamiento. Transcurridas 48 horas, sólo las menores concentraciones ensayadas del biopolímero mostraron una proliferación significativamente inferior a la que mostró el cultivo control (p<0.05). A 72 h, se encontraron diferencias significativas entre la proliferación del control de dilución y las

diferentes concentraciones ensayadas. En dicho momento, proliferación del cultivo en presencia del máximo contenido en CS ensayado, llegó a representar un 64% respecto del control de proliferación (Tabla VIII-6).

Tabla VIII-6. Porcentaje de absorbancia del medio de las condiciones ensayadas respecto al control de dilución en función de la concentración de CS. Las diferencias significativas se indican como Nd = no diferente y * para $p < 0.05$.

Concentración de CS ($\times 10^{-4}$ g/mL)	24 h	48h	72 h
0.5	76.8 Nd	64.9*	78.2 Nd
1	81.8 Nd	65.9*	71.7*
1.5	82.6 Nd	67.3 Nd	70.5*
2	83.6 Nd	75.2 Nd	78.9 Nd
2.5	98.2 Nd	71.3 Nd	71.5 Nd
3	98.0 Nd	68.8 Nd	64.1*

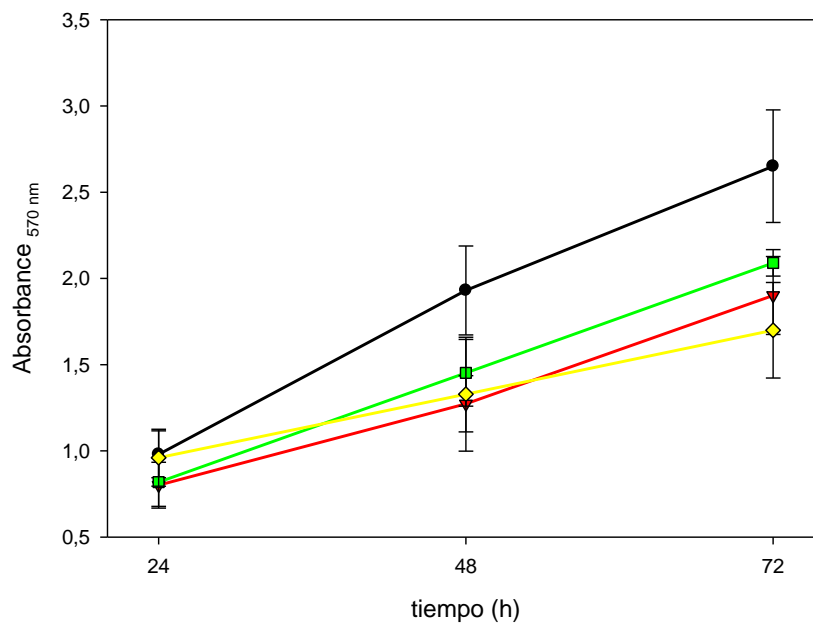


Figura VIII.7. Proliferación de células HeLa expuestas a CS MMW. Las curvas corresponden a la proliferación control (círculos negros), o a una concentración de CS igual a 1×10^{-4} g/mL (triángulos rojos), 2×10^{-4} g/mL (cuadrados verdes) ó 3×10^{-4} g/mL (rombos amarillos).

- Estudio de agregación de SFN en condiciones de cultivo celular

Se midió la estabilidad en términos de evolución del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de SFN en el medio de cultivo a fin de evitar la obtención de agregados de dichas nanopartículas en el medio de cultivo.

Los componentes del medio de cultivo MEM presentaban un diámetro en el rango entre pocos nm y cientos de nm (línea negra de la Figura VIII.8). De forma paralela, se preparó una suspensión de SFN 10^{-4} g/mL, las nanopartículas mostraron un diámetro hidrodinámico en torno a 180 nm. A continuación se diluyeron las SFN en MEM hasta alcanzar una concentración igual a (9.1×10^{-6} , 1.7×10^{-5} y 2.3×10^{-5}) g/mL. Las diluciones de concentración 9.1×10^{-6} , 1.7×10^{-5} g/mL presentaron una población de diámetro hidrodinámico centrada en los 200 nm. Dicha población era el resultado de la interacción de las SFN con las partículas del medio ya que las poblaciones que se encontraron inicialmente en el MEM redujeron su proporción y las partículas de SFN aumentaron ligeramente su diámetro hidrodinámico (Figura VIII.8). Esta hipótesis encaja con la reducción de osmolalidad del medio de cultivo al adicionar la proteína (Tabla VIII-5). La interacción de un sistema particulado con las partículas del medio ha sido previamente documentado (Hühn et al., 2013). En el caso de la dilución de SFN en MEM a concentración 2.3×10^{-5} g/mL, se encontró que la población de SFN había disminuido su diámetro hasta situarse alrededor de 135 nm (Figura VIII.8). Y el correlograma de esta última suspensión (Figura VIII.9) mostraba que existían agregados en el seno de la suspensión que no se representaban en el gráfico.

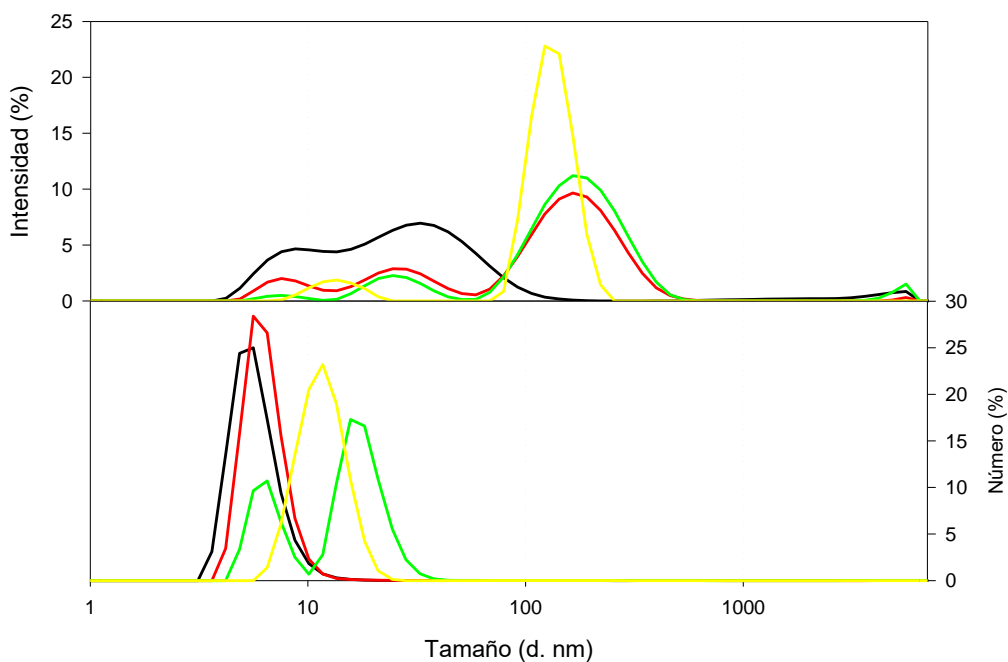


Figura VIII.8. Distribución de diámetros hidrodinámicos en intensidad y número de las SFN en MEM a $t = 0$ h. En la figura se representa la distribución de las partículas presentes en el MEM (negro), y en las suspensiones de SFN en MEM a concentración 9.1×10^{-6} g/mL (rojo), 1.7×10^{-5} g/mL (verde) y 2.3×10^{-5} g/mL (amarillo).

La evolución en el tiempo mostró que las SFN no agregaron, al menos durante 96 h (Figura VIII.10) la causa más probable para este resultado fue la baja concentración a la que se encontraban y la interacción de las mismas con los elementos del suero. A 96 h, el correlograma de la suspensión más concentrada (Figura VIII.9) no indicaba la presencia de agregados no representados en la distribución en intensidad y en número.

La hipótesis más plausible para explicar estos resultados fue que los agregados de SFN que se formaron en los primeros instantes precipitaran, mientras una proporción de las SFN se mantenía en suspensión. Con base en los resultados obtenidos, la mayor concentración adicionada al cultivo celular fue 3×10^{-5} g/mL.

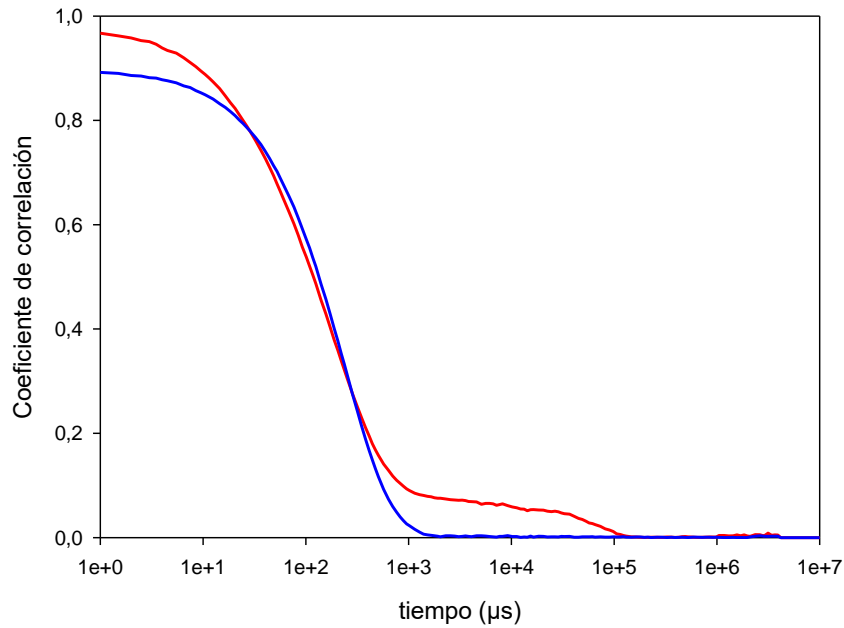


Figura VIII.9. Correlograma de la suspensión de SFN 2.3×10^{-5} g/mL en EMEM a t = 0 h (rojo) y t = 96 h (azul).

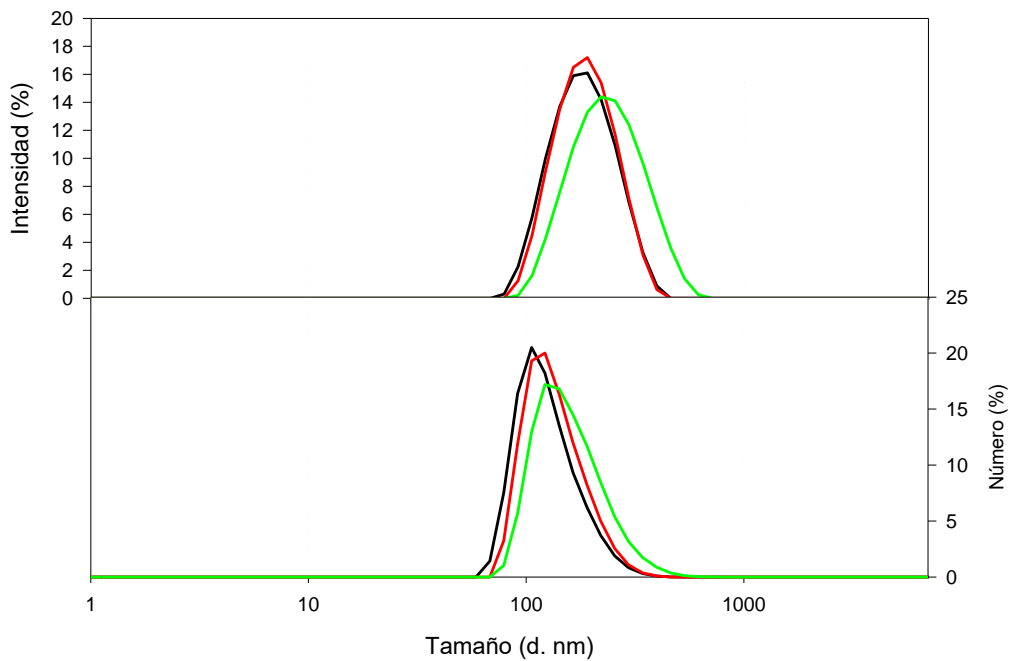


Figura VIII.10. Distribución de diámetro hidrodinámico en intensidad y número de las SFN en EMEM a t = 96 h. En la figura se representa la distribución de tamaño de las partículas presentes en la suspensión de SFN en MEM a concentración 9.1×10^{-6} g/mL (negro), 1.7×10^{-5} g/mL (rojo) y 2.3×10^{-5} g/mL (verde).

- Citotoxicidad de SFN

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de SFN mostraron que la fibroína de seda no presentaba un efecto antiproliferativo frente a células HeLa en el tiempo ensayado (Figura VIII.11). Este resultado reafirmó el carácter biocompatible de esta proteína que ha sido extensamente documentado en la literatura (Altman et al., 2003; Leal-Egaña & Scheibel, 2010; Numata & Kaplan, 2010). Sin embargo, aunque son menos numerosas, también se han hallado publicaciones en las que se atribuye un efecto antiproliferativo a la fibroína de la seda. En algunas de esas publicaciones atribuyeron el efecto antiproliferativo a la presencia en la disolución de sericina, otra proteína presente en el capullo de la seda, que estaría presente como resultado de un deficiente proceso de degomado de la fibroína (Altman et al., 2003). Por otra parte, Kundu y colaboradores atribuyeron un efecto antiproliferativo a las SFN (Kundu, Chung, Kim, Tae, & Kundu, 2010). Los autores indicaron una disminución de la viabilidad celular que era mayor cuanto mayor era la concentración de SFN hasta alcanzar la concentración de 2×10^{-4} g/mL, a partir de la cual la viabilidad no continuó disminuyendo. Es posible que nuestros resultados fueran diferentes de los hallados por Kundu y colaboradores (2010) debido a la alta concentración aplicada por aquel grupo. La fibroína de la seda se ha aplicado en otros formatos, así Yan y colaboradores (2016) desarrollaron unos hidrogeles que utilizaron como andamios para el cultivo celular (Yan et al., 2016). Los autores indicaron que tras 7 días, la fibroína de la seda varió su conformación de amorfa a fibrilar. Sin embargo observaron una disminución de la viabilidad celular y de la actividad metabólica de células HeLa desde el primer día de ensayo. En este caso, la variación en la viabilidad celular pudo deberse al aislamiento celular del medio que producía el material sintetizado por el grupo.

El análisis de la proliferación de las células HeLa en presencia de SFN, indicó que los cultivos a los que se adicionó fibroína a una concentración igual o superior a 2.5×10^{-5} g/mL mostraron una diferencia significativa a 24 h en la proliferación respecto al cultivo control de dilución. Dicha diferencia significativa se observó también a 48 h y 72 h (Tabla VIII-7). Resultados similares a los obtenidos aparecen en la literatura en una publicación de 2010, en la que sus autores indicaron que el uso de fibras de fibroína de seda aunque producía una marcada disminución de la proliferación del cultivo celular respecto a la situación libre de fibroína, permitió la proliferación del mismo durante 15 días (Hakimi et al., 2010). Nuestros resultados indicaron que el aumento de absorbancia a 570 nm del cultivo en presencia de SFN representó un porcentaje cada vez menor conforme se incrementaba la concentración de las SFN en el medio. Llegando a ser el 50% aproximadamente respecto al control de dilución, para la máxima concentración ensayada (Tabla VIII-7).

- Internalización de SFN

Para comprobar que las SFN eran capaces de internalizarse en las células, se utilizó un cultivo de células MCF7. Se adicionó al medio de cultivo SFN marcada con FITC, un

fluoróforo que emite en color verde. Posteriormente se incubaron los cultivos para permitir la internalización y tras fijarlas, se marcaron con DAPI, un agente intercalante del ADN, que emite fluorescencia en azul. Las imágenes de microscopía confocal (Figura VIII.12), mostraron que las SFN-FITC se encuentra en el interior de la célula, ya que la señal verde se encuentra localizada en una zona de las imágenes mientras que el fondo se ve sin señal y el núcleo de las células aparece marcado en azul. Concluimos, por tanto, que las SFN-FITC son capaces de ser internalizadas por las células MCF7.

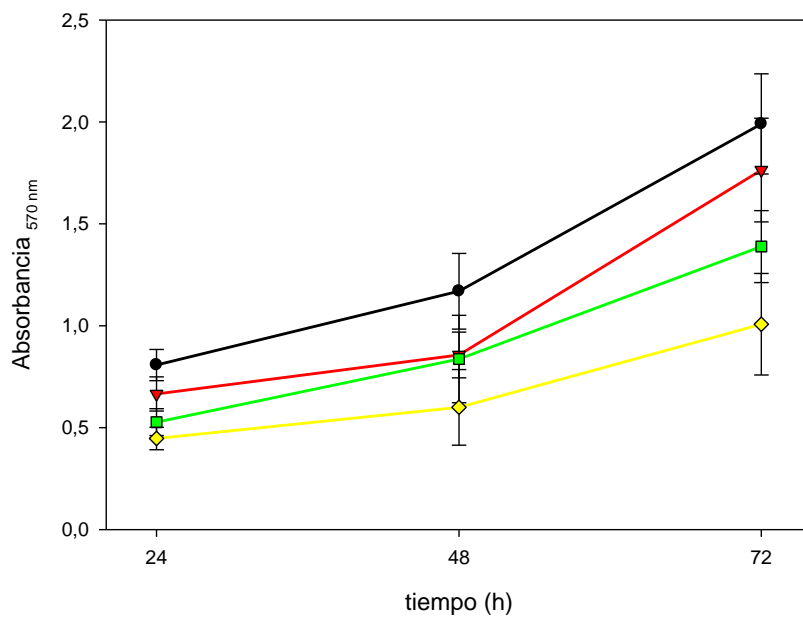


Figura VIII.11. Proliferación de células HeLa expuestas a SFN. Las curvas representan control de dilución (círculos negros), 10^{-5} g/mL (triángulos rojos), 2×10^{-5} g/mL (cuadrados verdes) y 3×10^{-5} g/mL (rombos amarillos).

Tabla VIII-7. Porcentajes de absorbancia del medio respecto al control en función de la concentración de SFN. Las diferencias significativas respecto al control de dilución se indican como Nd = no diferente y * para $p < 0.05$.

Concentración SFN ($\times 10^{-5}$ g/mL)	24 h	48h	72 h
0.5	82.2 Nd	77.3 Nd	84.5 Nd
1	82.4 Nd	73.3 Nd	88.6 Nd
1.5	71.1 Nd	68.3 Nd	74.3*
2	65.3 Nd	71.5 Nd	69.8*
2.5	60.0*	61.6*	61.4*
3	55.3*	51.3*	50.6*

- Citotoxicidad de nanocomposites de CS:SFN

Los NC se sintetizaron con una proporción CS:SFN 1:1.6 mg:mg. Y se adicionaron al medio de cultivo en condiciones en las que el contenido en SFN de los NC fuera equivalente a las concentraciones de SFN testadas previamente (Tabla VIII-8).

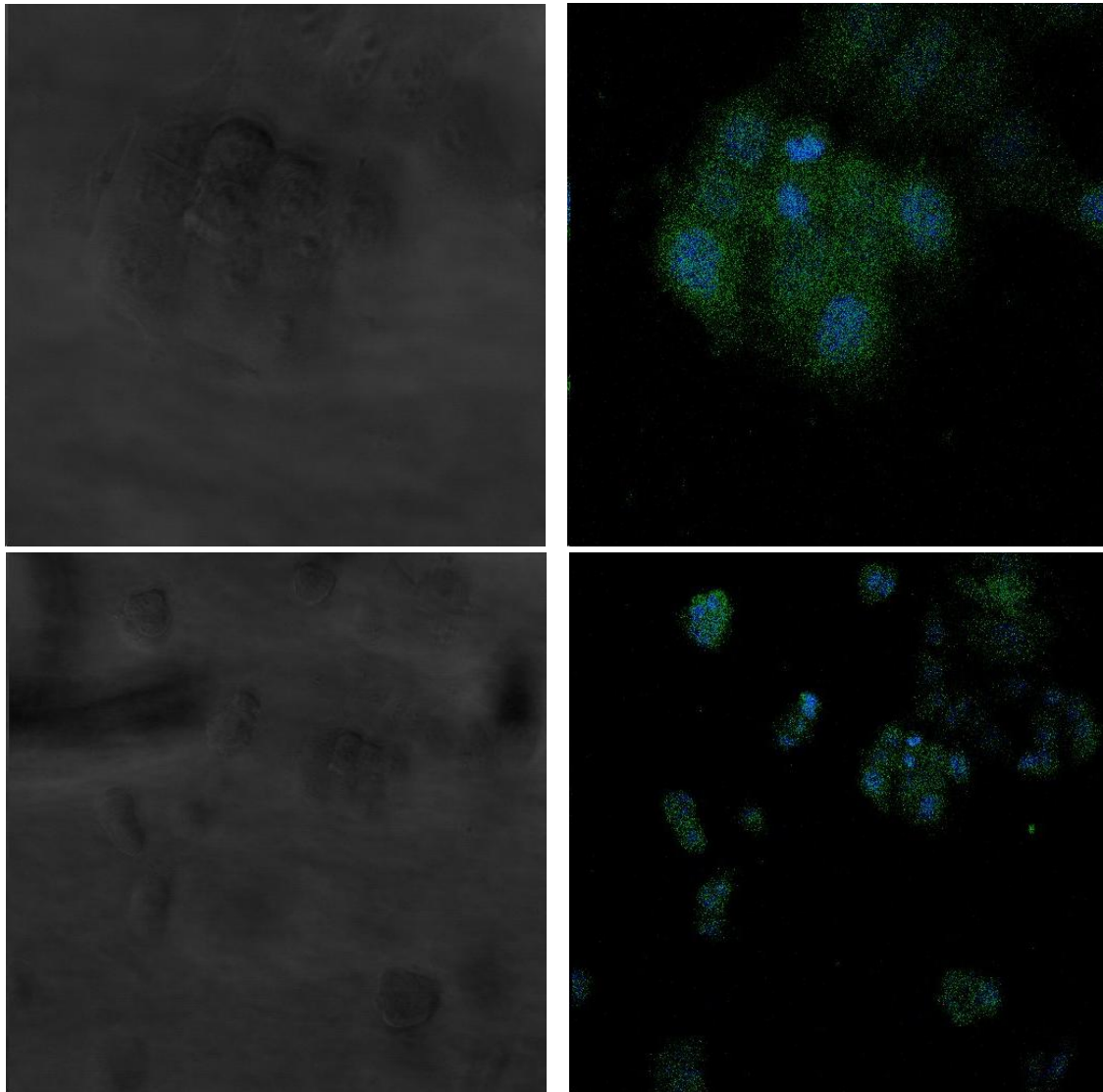


Figura VIII.12 Imágenes de microscopía confocal de células MCF7 marcadas con SFN-FITC (verde) y DAPI (azul). En la parte izquierda se ven imágenes de transmitancia y en la derecha se ven las imágenes de fluorescencia del mismo campo óptico.

Los resultados indicaron que el valor de absorbancia fue aproximadamente el mismo en todas las condiciones ensayadas. Aunque dicho valor fue inferior al valor registrado para el control de dilución (Figura VIII.13), sólo en las diluciones al 20% y 25% mostró una diferencia significativa respecto al control. Durante las siguientes 24 h, la proliferación del cultivo y la presencia de NC de CS:SFN en el medio mostraron una relación inversa (Figura VIII.13). En este caso, se encontró una diferencia significativa a una dilución del 15% o superior. Por último, a las 72 h desde la aplicación de los NC, se observó que la proliferación al adicionar una dilución de nanoestructuras igual al 20% o mayor presentó una diferencia significativa de proliferación respecto al control (Figura VIII.13 y Tabla VIII-8). A todos los tiempos ensayados, un incremento en la presencia de los NC de CS:SFN produjo una disminución en la absorbancia detectada respecto a la detectada en el cultivo control de dilución (Tabla VIII-8). Por último, el incremento de la proporción de las nanoestructuras hasta el 30%, resultó en un valor de absorbancia a las 72 h igual al registrado a las 48 h. Dicho valor fue igual al 48% y al

37% respecto del control de dilución a las 48 h y 72 h, respectivamente (Tabla VIII-8) Estos resultados indicaron que los NC de CS:SFN 1:1.6 mg:mg aplicados al cultivo celular tenían un efecto dosis dependiente. De forma que al aumentar la presencia de las nanoestructuras en el medio, la proliferación del cultivo decelera. Llegando a encontrar una tasa de proliferación nula a una proporción igual al 30 %. Dicha situación definía un efecto citostático de los nanodispositivos.

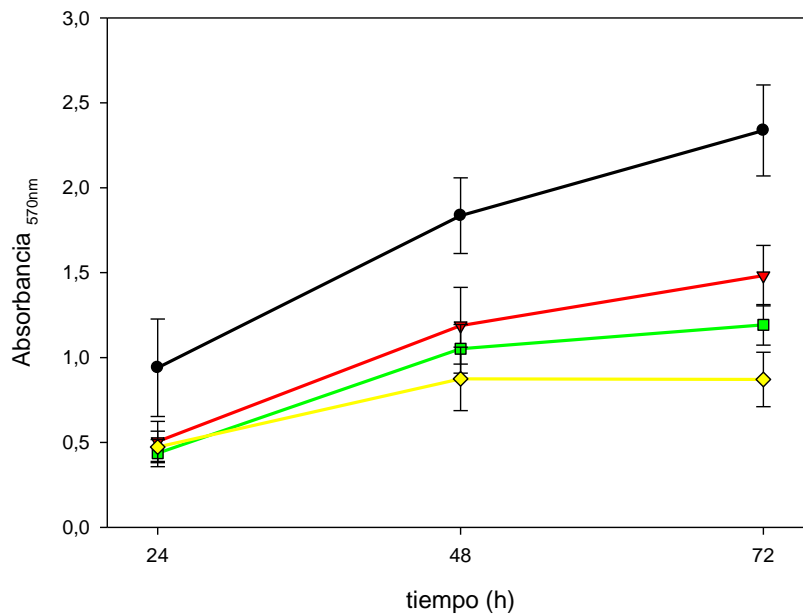


Figura VIII.13. Proliferación de células HeLa expuestas a CS:SFN 1:1.6 mg:mg. Las curvas representan el control de dilución (círculos negros) o una adición de NC al medio del 10% (triángulos rojos), 20% (cuadrados verdes) y 30% (rombos amarillos).

Tabla VIII-8. Porcentajes de absorbancia del medio respecto al control en función de la concentración de nanocompuestos compuestos de CS:SFN 1:1.6 mg:mg. Las diferencias significativas respecto al control de dilución se indican como Nd = no diferente y * para $p < 0.05$.

Proporción de NC en el medio (%)	Comparable a C _{SFN} ($\times 10^{-5}$ g/mL)	Comparable a C _{CS} ($\times 10^{-4}$ g/mL)	24 h	48h	72 h
5	0.5	0.5	65.7 Nd	68.9 Nd	62.8 Nd
10	1	1	53.8 Nd	64.7 Nd	63.4 Nd
15	1.5	1.5	63.7 Nd	55.2*	55.9 Nd
20	2	2	46.5*	57.3 Nd	51.0*
25	2.5	2.5	43.4*	48.1*	46.6*
30	3	3	50.3 Nd	47.6*	37.3*

- Citotoxicidad de AuNP

El análisis de los resultados del ensayo de citotoxicidad de AuNP, que presentaban un diámetro hidrodinámico igual a 10 nm, reveló que dichas nanoestructuras no presentaban efecto citotóxico sobre las células HeLa durante las 72 h tras la aplicación

al medio de cultivo (Figura VIII.14). Tampoco existía una diferencia significativa en el valor de absorbancia registrado en cualquiera de las condiciones respecto al valor de absorbancia del control de dilución (Tabla VIII-9). La biocompatibilidad de las AuNP se encuentra en la literatura ampliamente descrita. Hühn y colaboradores indicaron que la citotoxicidad de estas nanopartículas con carga negativa se podía observar cuando la concentración de las nanopartículas de oro era superior a 20 nM (Hühn et al., 2013). Prado-Gotor y colaboradores estimaron que el número medio de átomos de oro por cada AuNP de 10nm de diámetro era 30687 (Prado-Gotor et al., 2014). Considerando la máxima concentración aplicada, 1.7×10^{12} partículas/mL, la masa atómica del oro y despreciando la masa que aporta el citrato que recubre las nanopartículas, la concentración de AuNP aplicada fue 2.84 pM. Por lo, de acuerdo con los resultados de Hühn, es coherente no encontrar un efecto citotóxico debido a la aplicación de estas nanoestructuras en las condiciones aplicadas.

Sin embargo, existe discrepancia en los resultados descritos en la literatura. Las diferencias encontradas atienden principalmente a diferencias en el diámetro hidrodinámico de las partículas. Los estudios de citotoxicidad realizados con partículas de diámetro inferior a 5 nm indican que estas nanopartículas son muy citotóxicas debido a que son capaces de atravesar las membranas y llegar al núcleo (Alkilany & Murphy, 2010). Como ejemplo, se encontró alta citotoxicidad en el caso de nanopartículas de oro de 1.9 nm de diámetro hidrodinámico, que se encontraban formando agregados de nanoestructuras de 200 a 300 nm en el interior de los lisosomas (Jain et al., 2014; Kesharwani, Jain, & Jain, 2014). Los estudios de citotoxicidad de las nanopartículas de oro de diámetro mayor poseen diferente nivel de toxicidad. Las nanopartículas de diámetro aproximadamente igual a 50 nm son rápidamente endocitadas y exocitadas, por lo que resultan no tóxicas (Alkilany & Murphy, 2010; Chithrani, 2010). Si el diámetro aumenta, se modifica la internalización de las nanopartículas de oro. Así, las que presentan un diámetro hidrodinámico igual a 70 nm interaccionan con las membranas pero son endocitadas en baja proporción, concretamente 23% en el caso de las células HeLa, mientras que las nanopartículas de 110 nm o mayores raramente se internalizan (Wang et al., 2010).

Tabla VIII-9. Porcentajes de absorbancia del medio de las condiciones en estudio respecto al control de dilución en función de la concentración de nanopartículas de oro. Las diferencias significativas respecto al control de dilución se indican como Nd = no diferente y * para $p < 0.05$.

Concentración de AuNP ($\times 10^{12}$ partículas/mL)	24 h	48h	72 h
0.6	131.7 Nd	115.0 Nd	104.5 Nd
0.9	116.8 Nd	104.4 Nd	109.8 Nd
1.1	104.1 Nd	109.4 Nd	102.1 Nd
1.4	101.9 Nd	104.6 Nd	98.1 Nd
1.7	97.0 Nd	104.1 Nd	87.6 Nd

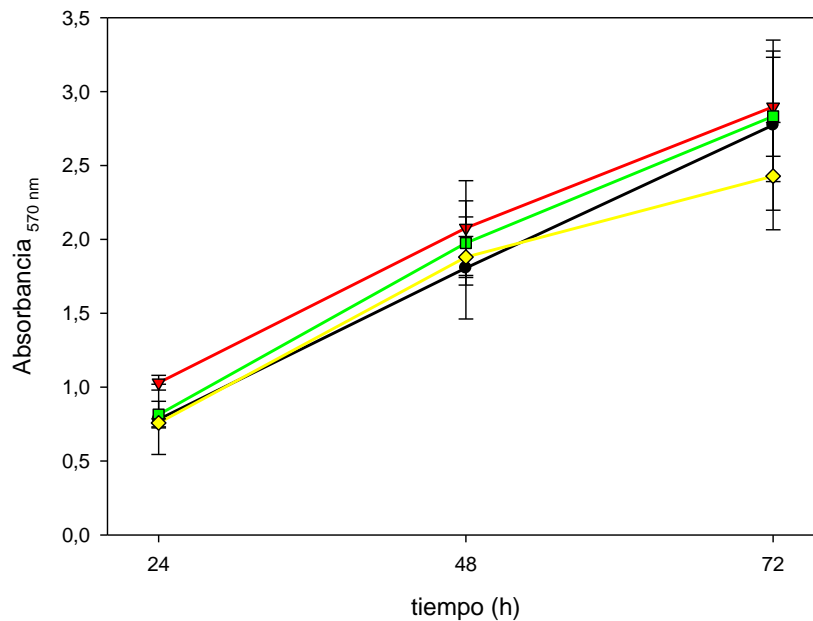


Figura VIII.14. Proliferación de células HeLa expuestas a AuNP. Las curvas representan el control de dilución (círculos negros) o una concentración de AuNP igual a 5.7×10^{11} partículas/mL (triángulos rojos), 1.14×10^{12} partículas/mL (cuadrados verdes) y 1.71×10^{12} partículas/mL (rombos amarillos).

- Citotoxicidad de nanocomposites de AuNP:CS

Los NC se sintetizaron con una proporción AuNP:CS 1:10 partícula:partícula. Las equivalencias entre las AuNP libres, el CS libre y los NC adicionados al medio aparecen en la Tabla VIII-10.

El ensayo de citotoxicidad de los NC de AuNP:CS 1:10 partícula:partícula reveló que dichos nanocomposites no presentaban efecto antiproliferativo (Figura VIII.15). Al igual que ocurría en el caso de las AuNP (Figura VIII.14) y el CS (Figura VIII.7). Como era de esperar, no existía diferencia significativa en cuanto al valor de absorbancia registrado al adicionar los NC de AuNP:CS respecto al valor registrado en el caso del control de proliferación (Tabla VIII-10). Los resultados de citotoxicidad de los NC AuNP:CS eran los esperados ya que el contenido en AuNP en los NC en la dilución al 30% era comparable con la menor concentración de nanopartículas libres testada previamente (Tabla VIII-9). Y el contenido en CS fue 150 veces menor que el testado previamente y tampoco en aquel caso mostró efecto citotóxico (Tabla VIII-6).

Tabla VIII-10. Porcentajes de absorbancia del medio respecto al control en función de la proporción de NC AuNP:CS 1:10 partícula:partícula. Las diferencias significativas respecto al control de dilución se indican como Nd = no diferente y * para $p < 0,05$.

Proporción de NC en el medio (%)	Comparable a C_{AuNP} ($\times 10^{11}$ partículas/mL)	Comparable a C_{CS} ($\times 10^{-6}$ g/mL)	24 h	48h	72 h
5	1	0.3	110.5 Nd	125.5 Nd	100.1 Nd
10	1.9	0.7	108.4 Nd	104.0 Nd	92.3 Nd
15	2.9	1	119.8 Nd	98.1 Nd	89.3 Nd
20	3.8	1.3	117.0 Nd	95.9 Nd	91.7 Nd
25	4.8	1.7	79.0 Nd	86.1 Nd	82.1 Nd
30	5.7	2	92.6 Nd	79.4 Nd	86.3 Nd

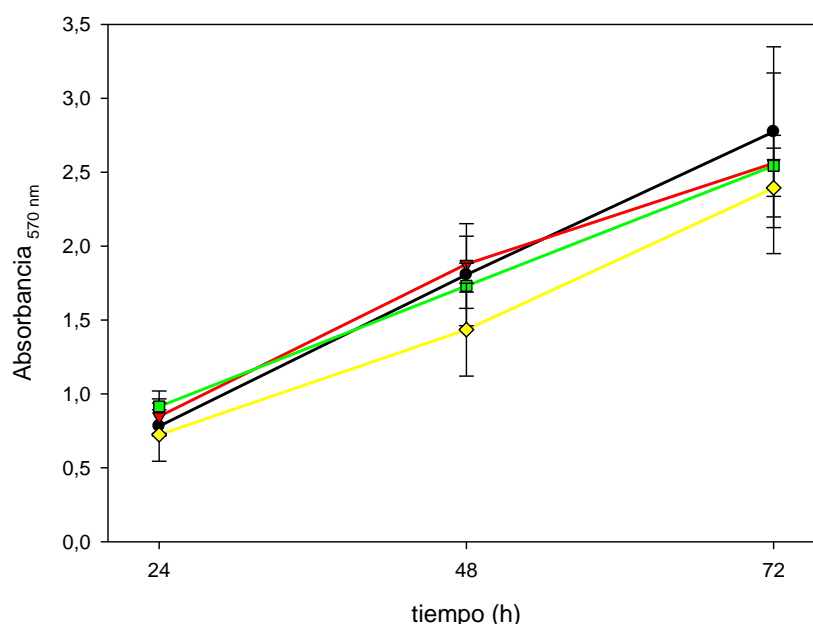


Figura VIII.15. Proliferación de células HeLa expuestas a NC AuNP:CS 1:10 partícula:partícula. Las curvas representan el control de dilución (círculos negros) o la proliferación tras la adición de NC al 10% (triángulos rojos), 20% (cuadrados verdes) o 30% (rombos amarillos).

4. Conclusiones.

La toxicidad de los líquidos iónicos aumenta conforme aumenta la cadena lateral de los cationes. Respecto al carácter citotóxico en función del grupo funcional, los formulados con imidazolio eran los más tóxicos de los líquidos iónicos analizados. Y los formulados con piridinios eran más tóxicos que los formulados con pirrolidonios.

Respecto a los sistemas nanométricos, las nanopartículas de CS MMW, SFN y AuNP mostraron un carácter biocompatible permitiendo la proliferación del cultivo de HeLa durante las primeras 72 h tras la aplicación del tratamiento. El sistema de nanocomposites compuesto por CS:SFN 1:1.6 mg:mg presentó un carácter biocompatible a bajas diluciones 10% y 20%, mientras que aplicados al 30%

aparecieron efectos citostáticos en la proliferación del cultivo. Por último, los nanocomposites compuestos de AuNP:CS 1:10 mostraron biocompatibilidad en todas las diluciones ensayadas.

Las nanopartículas de SFN marcadas con FITC se internalizaron en células MCF7. Las imágenes de confocal mostraron un punteado disperso en el citoplasma que indicó que las nanopartículas fueron endocitadas pero no agregaron una vez en el interior celular.

Capítulo X : CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo hemos utilizado el quitosano de peso molecular medio para conseguir obtener distintas nanoestructuras. De modo que podemos concluir:

1. Se pueden observar estructuras de quitosano de diferente tamaño en disolución como consecuencia del enredamiento de las cadenas del biopolímero. El tamaño de las estructuras finales depende de características intrínsecas del biopolímero, como el grado de desacetilación y por tanto, riqueza en grupos amina, y de características extrínsecas como concentración del polímero en disolución, fuerza iónica y pH del medio en el que está disuelto el biopolímero.
2. En iguales condiciones de fuerza iónica y pH, las estructuras de quitosano de peso molecular medio en disolución presentan un diámetro hidrodinámico inferior cuanto menor sea la concentración del biopolímero en la disolución. La concentración crítica del quitosano utilizado en este trabajo fue aproximadamente 8×10^{-4} g/mL. Las disoluciones del biopolímero a concentración inferior a la concentración crítica presentaban siempre partículas de tamaño nanométrico que correspondían a cadenas libres del biopolímero.
3. Las interacciones entre las cadenas de quitosano son débiles, ya que la dilución de una disolución de concentración de biopolímero superior a su concentración crítica, y la agitación durante 24 h permite la separación de las cadenas, si la concentración final es inferior a su c^* .
4. En condiciones de pH inferior al punto isoeléctrico, el diámetro hidrodinámico de las estructuras de quitosano es menor cuanto menor sea el pH del medio. Debido, muy probablemente a que la protonación de los grupos amina de las cadenas de CS dificulta su acercamiento y enredamiento. El límite inferior de esta tendencia se encuentra en un valor de pH alrededor de 3.0. En esas condiciones, se produce la hidrólisis de las cadenas del biopolímero. Como resultado se observan estructuras de pocos nanómetros de diámetro. En el otro extremo encontramos el caso de las disoluciones en las que el pH presenta un valor superior al punto isoeléctrico. En dichas condiciones, se produce la desprotonación de los grupos amina y el acercamiento y formación de los agregados de quitosano.
5. El incremento de la fuerza iónica de la disolución da lugar a la reducción del diámetro hidrodinámico de las estructuras de quitosano presentes en la misma. Dicha reducción se consigue gracias a la distribución de los iones de la disolución sobre las cadenas del biopolímero y el apantallamiento de las cargas superficiales, proceso que permite el plegamiento de las cadenas y la reducción del tamaño final de la estructura.
6. El diámetro hidrodinámico de las cadenas de quitosano de peso molecular medio con un grado de acetilación alrededor del 20% en disolución a pH = 4.3 y fuerza iónica igual a 0.2 M es 60 nm aproximadamente.
7. El CS en disolución ácida es un polielectrolito policationico capaz de interactuar electrostáticamente con polianiones como las nanopartículas de oro recubiertas de citrato. Las nanoestructuras compuestas de nanopartículas de

oro recubiertas de citrato y quitosano presentan diferente tamaño y conformación en función de la proporción de las especies reaccionantes y del tiempo de interacción entre las especies. La síntesis en la que se permitió la interacción entre nanopartículas de oro recubiertas de citrato y quitosano durante varias horas en cada etapa de la síntesis, dio como resultado microcomposites no estables, que agregaron y precipitaron. Manteniendo el procedimiento de síntesis, pero disminuyendo los intervalos en los que se permitía la interacción de las especies, se obtenían nanoestructuras que variaban su conformación en función de la proporción de las especies reaccionantes.

8. El quitosano de peso molecular medio a concentración igual a 10^{-3} g/mL a pH = 4 fuerza iónica igual a 0.25 M estabiliza nanopartículas de oro recubiertas de citrato de forma rápida y eficiente, ya que al adicionar nanopartículas de oro recubiertas de citrato a la disolución de quitosano, no se observan los agregados típicamente encontrados en las suspensiones de nanopartículas de oro recubiertas de citrato al incrementar la fuerza iónica. La interacción entre el biopolímero y las nanopartículas tiene lugar en menos de 3 minutos, tiempo en que se obtiene la primera medida de DLS.
9. Los nanocomposites de nanopartículas de oro recubiertas de citrato y quitosano obtenidos con una proporción nanopartículas de oro recubiertas de citrato:quitosano 1:10 partícula:partícula presentan estabilidad en términos de no agregación, durante los primeros meses tras el incremento de la fuerza iónica. En estas condiciones, las nanopartículas de oro recubiertas de citrato se localizan sobre las estructuras del biopolímero, por lo que el tamaño final de los nanocomposites depende del diámetro de las estructuras de quitosano.
10. Los nanocomposites de nanopartículas de oro recubiertas de citrato y quitosano mostraron estabilidad en el rango de temperatura entre 25 °C y 60 °C, y frente a la aplicación de sonicación suave. Sin embargo, agregaron al ser liofilizados.
11. Los nanocomposites de quitosano y nanopartículas de fibroína de seda que presentan proporciones de quitosano: nanopartículas de fibroína de seda entre 1:203 mg:mg y 1:0.4 mg:mg, presentan tamaño nanométrico y una conformación en la que el biopolímero se sitúa sobre la proteína. Sin embargo, la exposición a una fuerza iónica de 0.024 M reduce el rango de estabilidad al comprendido entre quitosano:nanopartículas de fibroína de seda 1:12.7 mg:mg y 1:1.6 mg:mg
12. El gicol-quitosano es un derivado del quitosano que mantiene las propiedades estabilizadoras del polisacárido y que adquiere características de liófilo en disolución. Por esta razón, el gicol-quitosano consigue estabilizar las nanopartículas de fibroína de seda en un rango más amplio de fuerza iónica, hasta 0.096 M. Aunque para ello, es necesario aumentar la presencia del biopolímero en la disolución.
13. Los nanocomposites polisacáridicos complejos sintetizados a partir de las modificaciones realizadas sobre los nanodispositivos de Woitiski, en los que se redujo el contenido en CS, mostraron un diámetro hidrodinámico nanométrico

durante las primeras tres semanas tras la síntesis. Además, no mostraron agregación durante ese período de tiempo. Los nanocomposites formulados con 250 μg de quitosano presentaron mayor estabilidad, homogeneidad de tamaños y migraron más lentamente que los formulados con 2.5 μg del biopolímero, que presentaron una distribución de tamaños más heterogénea, una migración más veloz y menor estabilidad. Estos nanodispositivos, independientemente de la cantidad de quitosano que presentaran, presentaban una buena tasa de liberación de insulina, siendo esta liberación alrededor del 40% en fluido gástrico simulado y alrededor del 80% en fluido intestinal simulado.

14. La citotoxicidad de los líquidos iónicos sobre células HeLa depende de la longitud de la cadena lateral del catión y de la composición iónica del líquido iónico. Un incremento en la longitud de la cadena lateral da como resultado un incremento en la toxicidad del líquido iónico resultante. Por otra parte, la toxicidad de los diferentes líquidos iónicos en función del catión que constituía los líquidos iónicos testados permite concluir que los líquidos iónicos compuestos por imidazolio son los más tóxicos, los formulados con piridinio presentan una toxicidad intermedia y los formulados con pirrolidonio presentan menos toxicidad que cualquiera de los dos anteriores en condiciones de igualdad de longitud de cadena.
15. El quitosano de peso molecular medio, las nanopartículas de oro recubiertas de citrato y las nanopartículas de fibroína de seda no presentaron efecto citotóxico sobre las células HeLa. Los nanocomposites de quitosano y nanopartículas de fibroína de seda mostraron biocompatibilidad a bajas diluciones, sin embargo al incrementar la dilución al 30%, se registró un efecto citostático. Los nanocomposites de nanopartículas de oro recubiertas de citrato y quitosano mostraron biocompatibilidad.

Capítulo XI : BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, U., Goliaei, A., Tsereteli, L., & Berkowitz, M. L. (2016). Properties of Poloxamer Molecules and Poloxamer Micelles Dissolved in Water and Next to Lipid Bilayers: Results from Computer Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, *120*(26), 5823–5830. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11448>
- Aguilar, M.-I. (2004). Methods in Molecular Biology. In *HPLC of Peptides and Proteins* (p. 251:3). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-742-4:3>
- Ajisawa, A. (1997). Dissolution aqueous of silk fibroin with calciumchloride / ethanol solution, 91–94.
- Alkilany, A. M., Abulateefeh, S. R., Mills, K. K., Bani Yaseen, A. I., Hamaly, M. A., Alkhatib, H. S., ... Stone, J. W. (2014). Colloidal Stability of Citrate and Mercaptoacetic Acid Capped Gold Nanoparticles upon Lyophilization: Effect of Capping Ligand Attachment and Type of Cryoprotectants. *Langmuir*, *30*(46), 13799–13808. <https://doi.org/10.1021/la504000v>
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, *12*(7), 2313–2333. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., ... Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, *24*(3), 401–416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
- Andrade, F., Goycoolea, F., Chiappetta, D. A., das Neves, J., Sosnik, A., & Sarmiento, B. (2011). Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, *2011*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2011/865704>
- Asakura, T., Watanabe, Y., Uchida, A., & Minagawa, H. (1984). NMR of Silk Fibroin . 2 . I3C NMR Study of the Chain Dynamics and Solution Structure of Bombyx mori Silk Fibroin, *20*, 1075–1081.
- Atkins, P. (1991). *Físico Química*. (A.-W. P. Company, Ed.) (3a edición). Buenos Aires, Argentina: Atkins.
- Basu, S., Pande, S., Jana, S., Bolisetty, S., & Pal, T. (2008). Controlled Interparticle Spacing for Surface-Modified Gold Nanoparticle Aggregates. *Langmuir*, *24*(10), 5562–5568. <https://doi.org/10.1021/la8000784>
- Baygazieva, E. K., Yesmurzayeva, N. N., Tatykhanova, G., Mun, G., Khutoryanskiy, V., & Kudaivergenov, S. (2014). Polymer protected gold nanoparticles: Synthesis, characterization and application in catalysis. *International Journal of Biology and Chemistry*, *7*(1), 14–23.
- Bélanger, J. M. R., Paré, Jocelyn, J. R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. In *Instrumental Methods in Food Analysis* (pp. 37–59). [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X)
- Bertrán Rusca, J., & Núñez Delgado, J. (2002). Química Física Vol II. In *Química Física* (Ariel Cien, pp. 1133–1156). Barcelona.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2011). Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, *85*, 325–333.
- Bhattacharai, S. R., K.C., R. B., Aryal, S., Bhattacharai, N., Kim, S. Y., Yi, H. K., ... Kim, H. Y. (2008). Hydrophobically modified chitosan/gold nanoparticles for DNA delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, *10*(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9233-7>
- Bhirde, A. A., Hassan, S. A., Harr, E., & Chen, X. (2014). Role of albumin in the

- formation and stabilization of nanoparticle aggregates in serum studied by continuous photon correlation spectroscopy and multiscale computer simulations. *Journal of Physical Chemistry C*, 118(29), 16199–16208. <https://doi.org/10.1021/jp5034068>
- Bogdanov, A. A., Gupta, S., Koshkina, N., Corr, S. J., Zhang, S., Curley, S. A., & Han, G. (2015). Gold Nanoparticles Stabilized with MPEG-Grafted Poly(1 -lysine): in Vitro and in Vivo Evaluation of a Potential Theranostic Agent. *Bioconjugate Chemistry*, 26(1), 39–50. <https://doi.org/10.1021/bc5005087>
- Boucard, N., David, L., Rochas, C., Montembault, A., Viton, C., & Domard, A. (2007). Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules*, 8(4), 1209–1217. <https://doi.org/10.1021/bm060911m>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Chaiyasan, W., Srinivas, S. P., & Tiyaboonchai, W. (2013). Mucoadhesive Chitosan–Dextran Sulfate Nanoparticles for Sustained Drug Delivery to the Ocular Surface. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), 200–207. <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0193>
- Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K., & Paria, S. (2014). Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 8–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>
- Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous Behaviour of Chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/939536>
- Chen, M.-C., Sonaje, K., Chen, K.-J., & Sung, H.-W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 32(36), 9826–9838. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.087>
- Chen, Y., Mohanraj, V. J., & Parkin, J. E. (2003). Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. *Letters in Peptide Science*, 10(5–6), 621–629. <https://doi.org/10.1007/BF02442596>
- Chen, Y. S., Hung, Y. C., Liao, I., & Huang, G. S. (2009). Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(8), 858–864. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9334-6>
- Chithrani, D. B. (2010). Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol*, 27(7), 299–311. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.507787>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
- Cho, J., Heuzey, M.-C., Bégin, A., & Carreau, P. J. (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 500–515. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047>
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., ... Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. (2005). Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 33(3), 261–87.
- Cölfen, H., Berth, G., & Dautzenberg, H. (2001). Hydrodynamic studies on chitosans in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 373–383.

- [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00269-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00269-1)
- Collado-González, M., Fernández Espín, V., Montalbán, M. G., Pamies, R., Hernández Cifre, J. G., Díaz Baños, F. G., ... García de la Torre, J. (2015). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in presence of chitosan. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(6), 268. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3069-3>
- Collado-González, M., Montalbán, M. G., Peña-García, J., Pérez-Sánchez, H., Vllora, G., & Díaz Baños, F. G. (2017). Chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *161*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.043>
- d'Angelo, I., Casciaro, B., Miro, A., Quaglia, F., Mangoni, M. L., & Ungaro, F. (2015). Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide, *135*, 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.027>
- da Silva, R. B., Lima Neto, A. F., Soares dos Santos, L. S., de Oliveira Lima, J. R., Chaves, M. H., dos Santos, J. R., ... de Moura, C. V. R. (2008). Catalysts of Cu(II) and Co(II) ions adsorbed in chitosan used in transesterification of soy bean and babassu oils - A new route for biodiesel syntheses. *Bioresource Technology*, *99*(15), 6793–6798. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.047>
- Daniel, M. C. M., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, *104*, 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698>
- Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2015). The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, *127*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>
- Detloff, T., Sobisch, T., & Lerche, D. (2007). Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems). *Powder Technology*, *174*(1–2), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.10.021>
- Di Carlo, G., Curulli, A., Toro, R. G., Bianchini, C., De Caro, T., Padeletti, G., ... Ingo, G. M. (2012). Green synthesis of gold-chitosan nanocomposites for caffeic acid sensing. *Langmuir*, *28*(12), 5471–5479. <https://doi.org/10.1021/la204924d>
- Díaz Baños, F. G., Díez Peña, A. I., Hernández Cifre, J. G., López Martínez, M. C., Ortega, A., & García De La Torre, J. (2014). Influence of ionic strength on the flexibility of alginate studied by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, *102*, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.023>
- Domb, A. J. (Abraham J. ., Kost, J., & Wiseman, D. M. (1997). *Handbook of biodegradable polymers*. CRC/Taylor & Francis.
- Dragan, E. S., Mihai, M., & Schwarz, S. (2009). Complex Nanoparticles Based on Chitosan and Ionic/Nonionic Strong Polyanions: Formation, Stability, and Application. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *1*(6), 1231–1240. <https://doi.org/10.1021/am900109u>
- Durst, F., Melling, A., & Whitelaw, J. (1981). *Principles and Practices of Laser Doppler Anemometry*. (A. Press, Ed.).
- Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1007/b136495>
- Emam, H. E., & Ahmed, H. B. (2016). Polysaccharides templates for assembly of nanosilver. *Carbohydrate Polymers*, *135*, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.095>
- Feng Jiao, T., Zhou, J., Zhou, J., Gao, L., Xing, Y., & Li, X. (2011). Synthesis and

- Characterization of Chitosan-based Schiff Base Compounds with Aromatic Substituent Groups. *Iranian Polymer Journal*, 20(2), 123–136.
- Fernandes, S. C. M., Oliveira, L., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Gandini, A., & Desbrières, J. (2009). Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry*, 11(12), 2023. <https://doi.org/10.1039/b919112g>
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vazquez-Lasa, B., Goycoolea, F. M., San Román, J., & Argüelles-Monal, W. M. (2015). Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan- g -poly(N -vinylcaprolactam). *Carbohydrate Polymers*, 134, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.069>
- Fonte, P., Araújo, F., Reis, S., & Sarmiento, B. (2013). Oral Insulin Delivery: How Far are We? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 7(2), 520–531. <https://doi.org/10.1177/193229681300700228>
- Fonte, P., Araújo, F., Silva, C., Pereira, C., Reis, S., Santos, H. A., & Sarmiento, B. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1342–1354. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.010>
- Fonte, P., Nogueira, T., Gehm, C., Ferreira, D., & Sarmiento, B. (2011). Chitosan-coated solid lipid nanoparticles enhance the oral absorption of insulin. *Drug Delivery and Translational Research*, 1(4), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s13346-011-0023-5>
- García Montalbán, M. (2016). *Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda*. University of Murcia.
- Gartner, C., & Lopez, B. L. (2010). Stiffness of chitosan in solution through intrinsic viscosity measurements. *Revista Facultad De Ingenieria-Universidad De Antioquia*, (53), 20–29.
- Gérente, C., Andrès, Y., McKay, G., & Le Cloirec, P. (2010). Removal of arsenic(V) onto chitosan: From sorption mechanism explanation to dynamic water treatment process. *Chemical Engineering Journal*, 158(3), 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.005>
- Germershaus, O., Werner, V., Kutscher, M., & Meinel, L. (2014). Deciphering the mechanism of protein interaction with silk fibroin for drug delivery systems. *Biomaterials*, 35(10), 3427–3434. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.083>
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids , Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 4(February), 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- GIDOLQUIM. (n.d.). 3.6.1 Fundamento de la técnica | Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ). Retrieved June 24, 2017, from <http://www.ub.edu/talq/es/node/252>
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. In *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*.
- Górnik, K., Grzesik, M., & Romanowska-Duda, B. (2008). the Effect of Chitosan on Rooting of Grapevine Cuttings and on Subsequent Plant Growth Under Drought and Temperature Stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, 333–343.
- Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remuñán-López, C., Quaglia, F., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), 1736–1743. <https://doi.org/10.1021/bm9001377>

- Guo, L., Xu, Y., Ferhan, A. R., Chen, G., & Kim, D.-H. (2013). Oriented Gold Nanoparticle Aggregation for Colorimetric Sensors with Surprisingly High Analytical Figures of Merit. *Journal of the American Chemical Society*, 135(33), 12338–12345. <https://doi.org/10.1021/ja405371g>
- Gupta, A., Terrell, J. L., Fernandes, R., Dowling, M. B., Payne, G. F., Raghavan, S. R., & Bentley, W. E. (2013). Encapsulated fusion protein confers “sense and respond” activity to chitosan-alginate capsules to manipulate bacterial quorum sensing. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 552–562. <https://doi.org/10.1002/bit.24711>
- Guziewicz, N. A., Massetti, A. J., Perez-Ramirez, B. J., & Kaplan, D. L. (2013). Mechanisms of monoclonal antibody stabilization and release from silk biomaterials. *Biomaterials*, 34(31), 7766–7775. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.039>
- Hakimi, O., Gheysens, T., Vollrath, F., Grahn, M. F., Knight, D. P., & Vadgama, P. (2010). Modulation of cell growth on exposure to silkworm and spider silk fibers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 92(4), 1366–1372. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32462>
- Hayes, R., Warr, G. G., & Atkin, R. (2015). Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 115(13), 6357–6426. <https://doi.org/10.1021/cr500411q>
- He, Y., Zhang, X., & Yu, H. (2015). Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay. *Microchimica Acta*, 182(11–12), 2037–2043. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1546-0>
- Hu, Y., Du, C., Li, Y., Fan, L., Li, X., Jurjanz, S., ... Kannan, K. (2015). A gold nanoparticle-based colorimetric probe for rapid detection of 1-hydroxypyrene in urine. *The Analyst*, 140(13), 4662–4667. <https://doi.org/10.1039/C5AN00722D>
- Huang, H., & Yang, X. (2004). Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 5(6), 2340–2346. <https://doi.org/10.1021/bm0497116>
- Huang, K.-S., Grumezescu, A. M., Chang, C.-Y., Yang, C.-H., & Wang, C.-Y. (2014). Immobilization and stabilization of TiO₂ nanoparticles in alkaline-solidified chitosan spheres without cross-linking agent. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3(2), 174–178.
- Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S. J. H., ... Parak, W. J. (2013). Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano*, 7(4), 3253–3263. <https://doi.org/10.1021/nn3059295>
- Hwang, J. K., & Shin, H. H. (2000). Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 1244(3), 175–175.
- Jain, S., Coulter, J. A., Butterworth, K. T., Hounsell, A. R., McMahon, S. J., Hyland, W. B., ... O’Sullivan, J. M. (2014). Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiotherapy and Oncology*, 110(2), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.12.013>
- Jana, S., Maji, N., Nayak, A. K., Sen, K. K., & Basu, S. K. (2013). Development of chitosan-based nanoparticles through inter-polymeric complexation for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 870–876. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.064>
- Jastrzebska, K., Kucharczyk, K., Florczak, A., Dondajewska, E., Mackiewicz, A., & Dams-Kozłowska, H. (2015). Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. Jin, Y., Li, Z., Hu, L., Shi, X., Guan, W., & Du, Y. (2013). Synthesis of chitosan-

- stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.carbp>. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 20(2), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.11.010>
- Jia, L., Guo, L., Zhu, J., & Ma, Y. (2014). Stability and cytocompatibility of silk fibroin-capped gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 43, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.024>
- Jin, Y., Li, Z., Hu, L., Shi, X., Guan, W., & Du, Y. (2013). Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.018>
- Kadokawa, J. I. (2016). Dissolution, gelation, functionalization, and material preparation of chitin using ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry*, 88(6), 621–629. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0503>
- Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
- Katime, I. (1994). *Química Física Macromolecular* (Universida).
- Kesharwani, P., Jain, K., & Jain, N. K. (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 268–307. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>
- Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U., & Hortaçsu, Ö. (2007). A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), 150–180. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.05.013>
- Korchagina, E. V., & Philippova, O. E. (2010). Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. *Biomacromolecules*, 11(12), 3457–3466. <https://doi.org/10.1021/bm100990u>
- Kumar, N., Seth, R., & Kumar, H. (2014). Colorimetric detection of melamine in milk by citrate-stabilized gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 456(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.002>
- Kundu, B., Kurland, N. E., Bano, S., Patra, C., Engel, F. B., Yadavalli, V. K., & Kundu, S. C. (2014). Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 251–267. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.09.002>
- Kundu, J., Chung, Y. Il, Kim, Y. H., Tae, G., & Kundu, S. C. (2010). Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.052>
- Laaksonen, T., Ahonen, P., Johans, C., & Kontturi, K. (2006). Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid-Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size. *ChemPhysChem*, 7(10), 2143–2149. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600307>
- Larguinho, M., & Baptista, P. V. (2012). Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics — From genomics to proteomics. *Journal of Proteomics*, 75(10), 2811–2823. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.007>
- Leal-Egaña, A., & Scheibel, T. (2010). Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(3), 155–167. <https://doi.org/10.1042/BA20090229>
- Lee, D.-W., Powers, K., & Baney, R. (2004). Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.06.033>

- Leiva, A., Bonarredd, S., Pino, M., Saldías, C., Kortaberria, G., & Radić, D. (2015). Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. *European Polymer Journal*, 68, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.032>
- Lerche, D. (2016). Comprehensive particle characterization by homogeneous-start centrifugal sedimentation technique. In *Focus User Meeting: The centrifugal sedimentation technique*.
- Levine, I. N. (2004). *Fisicoquímica* (McGraw-Hil).
- Li, P., Dai, Y.-N., Zhang, J.-P., Wang, A.-Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(3), 221–8.
- Linlin Wu, Chunsheng Shi, Liangfei Tian, and, & Zhu*, J. (2007). A One-Pot Method to Prepare Gold Nanoparticle Chains with Chitosan. <https://doi.org/10.1021/JP076733O>
- Liu, L., Zhang, X., & Chaudhuri, J. (2014). Size control in the synthesis of 1-6nm gold nanoparticles using folic acid-chitosan conjugate as a stabilizer. *Materials Research Express*, 1(3). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/3/035033>
- Louie, S. M., Spielman-Sun, E. R., Small, M. J., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2015). Correlation of the Physicochemical Properties of Natural Organic Matter Samples from Different Sources to Their Effects on Gold Nanoparticle Aggregation in Monovalent Electrolyte. *Environmental Science & Technology*, 49(4), 2188–2198. <https://doi.org/10.1021/es505003d>
- Lozano-Pérez, A. A., Montalbán, M. G., Aznar-Cervantes, S. D., Cragolini, F., Cenis, J. L., & Vllora, G. (2014). Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(12), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.41702>
- Lozano-Pérez, A. A., Montalbán, M. G., Aznar-Cervantes, S. D., Cragolini, F., Cenis, J. L., & Vllora, G. (2015). Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(12), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.41702>
- Lu, J., Yan, F., & Texter, J. (2009). Advanced applications of ionic liquids in polymer science. *Progress in Polymer Science*, 34(5), 431–448. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.12.001>
- Luo, Y., Teng, Z., Li, Y., & Wang, Q. (2015). Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydrate Polymers*, 122, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.084>
- Madhusudhan, A., Reddy, G. B., Venkatesham, M., Veerabhadram, G., Kumar, A. D., Natarajan, S., ... Singh, S. S. (2014). Efficient ph dependent drug delivery to target cancer cells by gold nanoparticles capped with carboxymethyl chitosan. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8216–8234. <https://doi.org/10.3390/ijms15058216>
- Martínez Nistal, Á. (2003). Microscopía láser confocal. *Servicio de Proceso de Imágenes. Universidad de Oviedo*, 1–20.
- Microscopia Electrónica de Barrido con detector EDS (SEM-EDS) | Departamento de Ciencias Químicas UNAB| UNAB. (n.d.). Retrieved June 22, 2017, from <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>
- Mironov, A. V., Vikhoreva, G. A., Kil'deeva, N. R., & Uspenskii, S. A. (2007).

- Reasons for unstable viscous properties of chitosan solutions in acetic acid. *Polymer Science Series B*, 49(1–2), 15–17. <https://doi.org/10.1134/S1560090407010046>
- Miyama, T., & Yonezawa, Y. (2004). Aggregation of photolytic gold nanoparticles at the surface of chitosan films. *Langmuir*, 20(14), 5918–5923. <https://doi.org/10.1021/la040002n>
- Moharram, M. A., Khalil, S. K. H., Sherif, H. H. A., & Khalil, W. A. (2014). Spectroscopic study of the experimental parameters controlling the structural properties of chitosan–Ag nanoparticles composite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.01.099>
- Molnár, É., Barbu, E., Lien, C. F., Górecki, D. C., & Tsibouklis, J. (2010). Toward drug delivery into the brain: Synthesis, characterization, and preliminary in vitro assessment of alkylglyceryl-functionalized chitosan nanoparticles. *Biomacromolecules*, 11(11), 2880–2889. <https://doi.org/10.1021/bm100577x>
- Montiel-Herrera, M., Gandini, A., Goycoolea, F. M., Jacobsen, N. E., Lizardi-Mendoza, J., Recillas-Mota, M., & Argüelles-Monal, W. M. (2015). N-(furfural) chitosan hydrogels based on Diels-Alder cycloadditions and application as microspheres for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 128, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.052>
- Morariu, S., Brunchi, C. E., & Bercea, M. (2012). The behavior of chitosan in solvents with different ionic strengths. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(39), 12959–12966. <https://doi.org/10.1021/ie301309g>
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., & Harding, S. E. (2009). Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.025>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Mottaghitlab, F., Farokhi, M., Shokrgozar, M. A., Atyabi, F., & Hosseinkhani, H. (2015). Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 206, 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.020>
- Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Bhattacharya, S., Mishra, R., & Kundu, P. P. (2015). pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.040>
- Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D., & Kundu, P. P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1457–1475. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.004>
- Mushi, N. E., Butchosa, N., Salajkova, M., Zhou, Q., & Berglund, L. A. (2014). Nanostructured membranes based on native chitin nanofibers prepared by mild process. *Carbohydrate Polymers*, 112, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.038>
- Mushi, N. E., Kochumalayil, J., Cervin, N. T., Zhou, Q., & Berglund, L. A. (2016). Nanostructurally Controlled Hydrogel Based on Small-Diameter Native Chitin Nanofibers: Preparation, Structure, and Properties. *ChemSusChem*, 9(9), 989–995. <https://doi.org/10.1002/cssc.201501697>
- Naik, a. (1975). Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la

- investigación textil VTGLT-. *Boletín Del Instituto de Investigación Textil Y de Cooperación Industrial*, 64, 39–50.
- Niamsa, N., Srisuwan, Y., Baimark, Y., Phinyocheep, P., & Kittipoom, S. (2009). Preparation of nanocomposite chitosan/silk fibroin blend films containing nanopore structures. *Carbohydrate Polymers*, 78(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.003>
- Numata, K., & Kaplan, D. L. (2010). Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(15), 1497–1508. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.009>
- Ojea-Jiménez, I., & Puentes, V. (2009). Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: The role of citrate ions. *Journal of the American Chemical Society*, 131(37), 13320–13327. <https://doi.org/10.1021/ja902894s>
- Paddock, S. W. (1999). Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biotechniques*, 27(5), 992–1004.
- Pamies, R., Cifre, J. G. H., Espín, V. F., Collado-González, M., Díaz Baños, F. G., & de la Torre, J. G. (2014). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(4), 2376. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2376-4>
- Panos, I., Acosta, N., & Heras, A. (2008). New Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *Current Drug Discovery Technologies*, 5(4), 333–341. <https://doi.org/10.2174/157016308786733528>
- Park, S., Woodhall, J., Ma, G., Veinot, J. G. C., & Boxall, A. B. A. (2015). Do particle size and surface functionality affect uptake and depuration of gold nanoparticles by aquatic invertebrates? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(4), 850–859. <https://doi.org/10.1002/etc.2868>
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., ... Parak, W. J. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11(3), 2313–2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>
- Pestov, A., Nazirov, A., Modin, E., Mironenko, A., & Bratskaya, S. (2015). Mechanism of Au(III) reduction by chitosan: Comprehensive study with ¹³C and ¹H NMR analysis of chitosan degradation products. *Carbohydrate Polymers*, 117, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.030>
- Pike, E. R. (Edward R., & Sabatier, P. C. (2002). *Scattering: scattering and inverse scattering in pure and applied science*. Academic Press.
- Pinto, P. C. A. G., Costa, S. P. F., Lima, J. L. F. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2012). Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.013>
- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Gazzarri, M., Bartoli, C., Grassi, L., ... Batoni, G. (2015). Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity in vitro against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00372>
- Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2006). Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 24(2), 62–7. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.004>
- Plascencia-Jatomea, M., Viniestra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 582–586. <https://doi.org/10.1002/mabi.200350024>

- Popa-Nita, S., Alcouffe, P., Rochas, C., David, L., & Domard, A. (2010). Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms. *Biomacromolecules*, *11*(1), 6–12. <https://doi.org/10.1021/bm9012138>
- Prado-Gotor, R., López-Pérez, G., Martín, M. J., Cabrera-Escribano, F., & Franconetti, A. (2014). Use of gold nanoparticles as crosslink agent to form chitosan nanocapsules: Study of the direct interaction in aqueous solutions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *135*, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.005>
- Pretti, C., Renzi, M., Ettore Focardi, S., Giovani, A., Monni, G., Melai, B., ... Chiappe, C. (2011). Acute toxicity and biodegradability of N-alkyl-N-methylmorpholinium and N-alkyl-DABCO based ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(4), 748–753. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.032>
- Qin, X., Engwer, C., Desai, S., Vila-Sanjurjo, C., & Goycoolea, F. M. (2017). An investigation of the interactions between an E. coli bacterial quorum sensing biosensor and chitosan-based nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *149*, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.031>
- Raftery, R. M., Tierney, E. G., Curtin, C. M., Cryan, S.-A., & O'Brien, F. J. (2015). Development of a gene-activated scaffold platform for tissue engineering applications using chitosan-pDNA nanoparticles on collagen-based scaffolds. *Journal of Controlled Release*, *210*, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.005>
- Regiel-Futyra, A., Kus-Liškiewicz, M., Sebastian, V., Irusta, S., Arruebo, M., Stochel, G., & Kyzioł, A. (2015). Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*(2), 1087–1099. <https://doi.org/10.1021/am508094e>
- Regiel, A., Irusta, S., Kyzioł, A., Arruebo, M., & Santamaria, J. (2013). Preparation and characterization of chitosan–silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*, *24*(1), 15101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/1/015101>
- Rescignano, N., Fortunati, E., Armentano, I., Hernandez, R., Mijangos, C., Pasquino, R., & Kenny, J. M. (2015). Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, *445*, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.032>
- Rinaudo, M. (2006). Non-covalent interactions in polysaccharide systems. *Macromolecular Bioscience*, *6*(8), 590–610. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600053>
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*, *6*(10), 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Rooze, J., Rebrov, E. V., Schouten, J. C., & Keurentjes, J. T. F. (2013). Dissolved gas and ultrasonic cavitation - A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.04.013>
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *Journal of Cell Biology*, *188*(6), 759–768. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910104>
- Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., & Tajmir-Riahi, H. A. (2013). Encapsulation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by chitosan nanoparticles. *Biomacromolecules*, *14*(2), 557–563. <https://doi.org/10.1021/bm3018577>
- Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Ferreira, D., & Neufeld, R. (2007). Oral

- Bioavailability of Insulin Contained in Polysaccharide Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 8(10), 3054–3060. <https://doi.org/10.1021/bm0703923>
- Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules*, 5(5), 1882–1892. <https://doi.org/10.1021/bm049786+>
- Schatz, C., Lucas, J. M., Viton, C., Domard, A., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*, 20(18), 7766–7778. <https://doi.org/10.1021/la049460m>
- Schwarz, S., Steinbach, C., Schwarz, D., Mende, M., & Boldt, R. (2016). Chitosan — The Application of a Natural Polymer against Iron Hydroxide Deposition, (August), 623–632.
- Sheshkin, D. J. (2004). *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*.
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2016). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shih, C.-M., Shieh, Y.-T., & Twu, Y.-K. (2009). Preparation of gold nanopowders and nanoparticles using chitosan suspensions. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.008>
- Silva, S. S., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2017). Ionic liquids in the processing and chemical modification of chitin and chitosan for biomedical applications. *Green Chem.*, 19(5), 1208–1220. <https://doi.org/10.1039/C6GC02827F>
- Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today*, 17(13), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>
- Sönnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J., & Alivisatos, A. P. (2005). A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nature Biotechnology*, 23(6), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nbt1100>
- Stolte, S., Matzke, M., Arning, J., Bösch, A., Pitner, W.-R., Welz-Biermann, U., ... Thöming, J. (2003). Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Aquat. Toxicol.*, 63(11), 43–63. <https://doi.org/10.1039/B711119C>
- Thakur, V. K., & Thakur, M. K. (2014). Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(12), 2637–2652. <https://doi.org/10.1021/sc500634p>
- Turbitt, C., O'Hagan, P., Hasapidis, K., & Pokrajac, G. (2002). A Multi-tool Approach to Colloid Stability: SPOS and Separation Analysis. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(5), 711–719. <https://doi.org/10.1081/DIS-120015374>
- Utts, J. M., & Heckard, R. F. (2012). *Mind on statistics*.
- Valle-Delgado, J. J., Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F., Gálvez-Ruiz, M. J., Feiler, A., & Rutland, M. (2004). Interactions between bovine serum albumin layers adsorbed on different substrates measured with an atomic force microscope. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(7), 1482–1486. <https://doi.org/10.1039/B314060C>
- Van Holde, K. (1979). *Bioquímica física* (Alhambra).
- Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Gonçalves, A. M. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Coutinho, J. A. P. (2014). Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.003>
- Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a Biomaterial. *Progress in Polymer Science*,

- 32(8–9), 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>
- Vo, K. D. N., Guillon, E., Dupont, L., Kowandy, C., & Coqueret, X. (2014). Influence of Au(III) Interactions with Chitosan on Gold Nanoparticle Formation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(8), 4465–4474. <https://doi.org/10.1021/jp4112316>
- Wang, D., Qing, Y., Yang, X., Zhong, Z., Lei, X., Xie, J., ... Li, Z. (2010). Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252Cf ... Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252 Cf neutron and X-rays, (January 2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-71>
- Wang, S.-H., Lee, C.-W., Chiou, A., & Wei, P.-K. (2010). Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-33>
- Wang, S., Xu, T., Yang, Y., & Shao, Z. (2015). Colloidal Stability of Silk Fibroin Nanoparticles Coated with Cationic Polymer for Effective Drug Delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*.
- Wenk, E., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2011). Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 150(2), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.007>
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Materials Science* (Vol. 1–4). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-415-5_23
- Woitiski, C. B., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2009). Colloidal carrier integrating biomaterials for oral insulin delivery: Influence of component formulation on physicochemical and biological parameters. *Acta Biomaterialia*, 5(7), 2475–2484. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.03.007>
- Woitiski, C. B., Veiga, F., Ribeiro, A., & Neufeld, R. (2009). Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.002>
- Wu, T., Guo, N., Teh, C., & Hay, J. (2013). Chapter 2: Theory and Fundamentals of Ultrasounds. In *Advances in Ultrasound Technology for Environmental Remediation*. SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5533-8_2
- Xiao, Z., Tian, T., Hu, J., Wang, M., & Zhou, R. (2014). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles as the delivery system for tuberose fragrance. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(1), 22–34. <https://doi.org/10.1002/ffj.3174>
- Yan, L.-P., Silva-Correia, J., Ribeiro, V. P., Miranda-Gonçalves, V., Correia, C., da Silva Morais, A., ... Reis, R. L. (2016). Tumor Growth Suppression Induced by Biomimetic Silk Fibroin Hydrogels. *Scientific Reports*, 6(1), 31037. <https://doi.org/10.1038/srep31037>
- Yang, J., Han, S., Zheng, H., Dong, H., & Liu, J. (2015). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 123, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.029>
- Yang, N., & Li, W. H. (2015). Preparation of gold nanoparticles using chitosan oligosaccharide as a reducing and capping reagent and their in vitro cytotoxic effect on Human fibroblasts cells. *Materials Letters*, 138, 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.09.078>

- Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H., & Li, A. (2016). *A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment*. *Water Research* (Vol. 95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.068>
- Yavuz, M. S., Cheng, Y., Chen, J., Cobley, C. M., Zhang, Q., Rycenga, M., ... Xia, Y. (2009). Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nature Materials*, 8(12), 935–939. <https://doi.org/10.1038/nmat2564>
- Zakaria, H. M., Shah, A., Konieczny, M., Hoffmann, J. A., Nijdam, A. J., & Reeves, M. E. (2013). Small Molecule- and Amino Acid-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 29(25), 7661–7673. <https://doi.org/10.1021/la400582v>
- Zhang, B., Li, X., Chen, D., & Wang, J. (2013). Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*. *Protoplasma*, 250(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0379-5>
- Zhang, C., Zhai, X., Zhao, G., Ren, F., & Leng, X. (2015). Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 134, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.065>
- Zhang, Y., Wei, W., Lv, P., Wang, L., & Ma, G. (2011). Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.09.016>
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. Bin. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4880–4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>
- Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>



University of Murcia

International School of Doctoral Studies

**CHARACTERIZATION OF
NANOSTRUCTURES OF CHITOSAN, SILK
FIBROIN, AND GOLD FOR DRUG DELIVERY**

SUMMARY

MARÍA DEL MAR COLLADO GONZÁLEZ

2017

INDEX

Index	5
ABBREVIATIONS	1
CHAPTER I: INTRODUCTION AND OBJECTIVES	5
Contextualization.....	7
Objectives	7
CHAPTER II: AGGREGATION BEHAVIOR OF GOLD NANOPARTICLES IN PRESENCE OF CHITOSAN.....	9
Introduction	11
Materials and methods.....	11
Results and discussion	13
Conclusions	25
CHAPTER III: CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLES-CHITOSAN NANOCOMPOSITES OF CONTROLLED SIZE	27
Introduction	29
Materials and methods.....	29
Results and discussion	31
Conclusions	41
CHAPTER IV: CHITOSAN AS STABILIZING AGENT FOR NEGATIVELY CHARGED NANOPARTICLES	43
Introduction	45
Materials and methods.....	46
Results and discussion	49
Conclusions	57
CHAPTER V: KEY ROLE OF CHITOSAN IN SIZE OF COMPLEX POLYSACCHARIDE NANOCOMPOSITES.....	59
Introduction	61

Materials and methods.....	62
Results and discussion.....	66
Conclusions	74
CHAPTER VI: CYTOTOXICITY ASSAYS	75
Introduction and objectives	77
Materials and methods.....	78
Results and discussion.....	80
Conclusions	88
CHAPTER VII: GENERAL CONCLUSIONS.....	89
CHAPTER VIII: REFERENCES.....	93

To those who started my history:

To my dad

To my mum

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

λ_{max}	Wavelength of maximum absorbance
ALG	alginate
AuNP	Gold nanoparticles coated with citrate
c*	Critical concentration
CS	Chitosan
DA	Degree of acetylation
DAPI	4'-6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DLVO theory	Theory of Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DS	Dextran Sulfate
ECACC	European collection of Authenticated cell cultures
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HPLC	High performance liquid chromatography
I	Ionic strength
IL	Ionic liquids
LDV	Laser doppler velocimetry
LMW	Low molecular weight
MEM	Minimum Eagle's medium
MMW	Medium molecular weight
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NC	Nanocomposite
PEG 4000	Poly(ethyleneglycol) 4000
pI	Isoelectric point
PVP K90	Poly(vinylpyrrolidone) K90
SFN	Silk fibroin nanoparticles
SGF	Simulated gastric fluid
SIF	Simulated intestinal fluid
UrAc	Uranyl acetate

Chapter I: Introduction and objectives

Contextualization

Nanomedicine has experienced great progress in the design and application of the structures synthesized in recent decades (E. J. Cho et al., 2013). New designs help to improve the therapeutic efficiency and to preserve the properties of the bioactive molecules used in treatments (Mottaghitalab, Farokhi, Shokrgozar, Atyabi, & Hosseinkhani, 2015; Zhao, Li, & Xie, 2015). In this sense, drug delivery systems offer many advantages, such as improvements in the bioavailability of drugs, through reduced degradation rates and the controlled drug release. These advantages enhance the cellular uptake and reduce the side effects of drugs (Mottaghitalab et al., 2015; Zhao et al., 2015).

Treatments can be targeted by using derived nanosystems. In cancer, for example, the main targets are factors over expressed in tumor cells and specific environmental conditions in the proximity of the tumors such as the increased acidification of the medium (Ruoslahti, Bhatia, & Sailor, 2010; Shi, Kantoff, Wooster, & Farokhzad, 2016).

Multi-drug resistant strains are emerging as a result of the application of antibiotics. As a possible alternative, the use of cationic antimicrobial peptides has been proposed. However, the main disadvantage of such peptides is their tendency to aggregate (d'Angelo et al., 2015; Ruoslahti et al., 2010; Shi et al., 2016). Since the minimum diameter of capillaries in the human body is 4 μm , the aggregation of nanodispositives could be a serious problem (Wang, Xu, Yang, & Shao, 2015). Hence, the development of a system which avoids the aggregation of these peptides is clearly desirable.

Different materials can be used for developing drug delivery systems. Among them, biodegradable biopolymers show excellent biocompatibility and a high encapsulation rate and release efficiency (Zhao et al., 2015). Besides, polysaccharide matrices are of great interest because drugs can be attached to their surface or loaded within (Yang, Han, Zheng, Dong, & Liu, 2015). Chitosan (CS) is a polycationic polyelectrolyte in solution, which has shown good ability for the stabilization of several negatively charged nanostructures.

Gold nanoparticles coated by citrate (AuNP) and silk fibroin nanoparticles (SFN) show biocompatibility and good load and release efficiency. However, both of them suffer rapid aggregation under physiological conditions. In this work, we use MMW CS as stabilizing agent for polyanionic nanodispositives. We use AuNP as a model of metallic nanoparticles, SFN as a model of non-metallic nanostructures and polysaccharides as alginate or dextran sulfate in order to evaluate whether MMW CS can act as stabilizing factor for complex polymeric structures.

Objectives

The general objective of this doctoral thesis is to characterize drug delivery nanodevices, in which MMW CS is used as stabilizing agent; that is, the presence of the

biopolymer avoids the aggregation of the nanostructures. This objective is developed as follows,

1. Study of the properties of the MMW CS in solution as a function of the concentration of the polymer, ionic strength and pH of the solution.
2. Design and synthesis of nanocomposites composed of MMW CS and gold nanoparticles coated by citrate (AuNP). Study of the stability with time of the structures obtained, and of the effect of increasing the ionic strength of the solution. Study of the proportion between MMW CS and AuNP to develop smaller nanostructures with the lower content on CS.
3. Design and synthesis of nanocomposites composed of MMW CS and silk fibroin nanoparticles (SFN). Study of the stability with time of the structures obtained, and of the effect of increasing the ionic strength of the solution. Study of the proportion between MMW CS and AuNP to develop smaller nanostructures with the lower content on CS. Design and synthesis nanocomposites composed of glycol-CS and SFN which do not aggregate when increasing the ionic strength of the solution.
4. Design and synthesis of complex polymeric nanostructures in which MMW CS acts as size modulator. Nanostructures which do not aggregate in aqueous solution are analyzed for their efficiency as drug delivery systems in *in vitro* conditions using insulin as a model of drug.
5. Study of the cytotoxicity of MMW CS, AuNP, and SFN using HeLA cell culture. Study of the cytotoxicity of developed nanostructures composed of MMW CS and AuNP and MMW CS and SFN using HeLA cell culture.

Chapter II: Aggregation behavior of gold nanoparticles in presence of chitosan

Introduction

Noble-metal nanoparticles are of great interest due to their biocompatibility and low toxicity. Especially, gold nanoparticles (AuNPs) with their unique properties have promoted several applications in biomedicine (Larguinho & Baptista, 2012; Yavuz et al., 2009). Since bare nanoparticles in solution tend to aggregate, they are coated with small charged molecules which act as stabilizing agents via electrostatic repulsion. However, if the medium has sufficiently high ionic strength or low pH, that electrostatic interaction is screened and aggregation occurs (Pamies et al., 2014). A practical solution in biomedical applications is to add some biocompatible polymer that is adsorbed on the nanoparticle surface giving rise to so-called core-shell nanoparticles (Chatterjee et al., 2014). One of such biopolymers is chitosan (CS), a linear amino-polysaccharide formed by glucosamine and N-acetyl-glucosamine units, which is obtained by deacetylation of chitin. In water solution, it becomes one of the few positively charged polysaccharides and therefore, able to interact with the negatively charged citrate-coated AuNPs. CS has been employed as reducing and stabilizing agent in the synthesis of metallic nanoparticles (Huang & Yang, 2004; Linlin Wu, Chunsheng Shi, Liangfei Tian, & Zhu, 2007; Regiel, Irusta, Kyzioł, Arruebo, & Santamaria, 2013) and as coating agent to design nanoparticle systems able to act as sensors or drug carriers (Bhattarai et al., 2008; Prado-Gotor et al., 2014; Regiel et al., 2013). However, few works have been devoted to directly study the influence of solution parameters on the interaction between chitosan and nanoparticles (Prado-Gotor et al., 2014). The goal of the present paper is to evaluate the role of CS in preventing AuNPs aggregation in salty solutions and reveal the kind of structures formed when an AuNPs suspension and a solution of CS of medium molecular weight are mixed. For the sake of completeness, we also discuss about the influence of lowering the pH value in such a system.

In a previous paper (Pamies et al., 2014), we studied the aggregation behaviour of AuNPs in saline aqueous media by using dynamic light scattering (DLS), UV-visible spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). In this work we use again those techniques in order to elucidate the types of nanocomposite appearing in the system formed by AuNPs and CS. Since CS is only soluble in acidic solutions, we firstly determine which value of pH allows for the CS dissolution without affecting the AuNPs suspension. Then, we test the influence of the ionic strength and pH on the CS solution. Finally, we discuss how the nanocomposite formed after mixing an AuNPs suspension and a CS solution is able to prevent the AuNPs aggregation from an increase of the ionic strength or a decrease of the pH.

Materials and methods

Materials

The aqueous suspension of monodisperse gold nanoparticles (5.7×10^{12} particles/mL) was purchased from Ted Pella, Inc. (Redding, CA) and stored at 4°C in a refrigerator.

The nominal hydrodynamic diameter of those nanoparticles was $d = 10$ nm according to the manufacturer's specifications and $d = 13$ nm according to our DLS measurements. The nanoparticles are coated with a citrate layer (negatively charged) that avoids aggregation.

Chitosan of medium molecular weight was purchased from Sigma-Aldrich (448877-250G). According to the manufacturer's specifications the molecular weight range is 190000 – 310000 Da and deacetylation is 75 – 85% (i.e. the degree of acetylation is 15 – 25%, and so solvable in dilute acidic medium). Glacial acetic acid from Panreac was used to set $\text{pH} = 4$ and dissolve the chitosan. On the other hand, hydrochloric acid from Panreac was used to set $\text{pH} = 2$. In order to set the ionic strength to 0.25 M, we prepared milli-Q water solutions of sodium nitrate, NaNO_3 , with a 99% of purity purchased to Acros Organics (lot. no. A-0301681).

Dynamic Light Scattering: hydrodynamic size

Hydrodynamic size was measured by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) The apparatus equipped with a 4 mW He/Ne laser emitting 633 nm works at a wide range of temperatures up to 120 °C. The scattering intensity at a 173° angle relative to the source (backscattering) was measured and the software calculates the size distribution function, i.e. the hydrodynamic diameter distribution, from the time autocorrelation function of the scattering intensity fluctuations. Each measurement comprised 10 runs of 10 seconds each. Except for results shown in Figure III.1, all DLS results are the average of 90 measurements performed during approximately 4 hours. It was checked that this protocol provide very reproducible intensity, volume and number distributions.

Although the three types of size distribution (intensity, volume and number) supplied by the Zetasizer software will be discussed, caution must be taken in the interpretation of distributions by volume and number which are obtained from the distribution by intensity assuming, in addition to the sphericity and homogeneity of particles and the accuracy of the primary distribution by intensity, a precise knowledge of the actual refractive index of the particles (we have checked that the influence of this factor is very small for our system). Thus, the distribution by intensity must be that considered in order to characterize particle size whereas distributions by volume and number are adequate for estimating relative populations of the particles when comparing results from different conditions.

UV-visible spectroscopy: surface plasmon absorption

Absorption spectra were collected by using a T92+ UV-visible spectrophotometer (PG Instruments, UK). The scanning wave length (λ) range was set from 400 nm to 900 nm being the scanning interval 1 nm. We have checked (see also AbdElhady & M., 2012) that the chosen λ range ensures that the absorption peak in the nanocomposite formed by AuNPs and CS is only due to the metallic nanoparticles. Thus, the surface plasmon

resonance exhibited by AuNPs is displayed as a strong absorption band in the visible region.

Transmission electron microscopy

Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis was carried out with a Jeol 1011 transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 100 kV, using a Gatan Bioscan Camera model 792 for imaging acquisition. Samples were prepared by dropcasting 10 μL of the nanoparticle solution on a 200 mesh Formvar/carbon coated copper/nickel grid and allowing it to dry at room temperature. Excess film was removed with absorbent paper.

Results and discussion

The three systems tested in this work are: 1) the AuNPs suspension, 2) the CS solution, and 3) the mixture of the AuNPs suspension and the CS solution. In every case, the temperature was 25°C , the AuNPs concentration was 2.85×10^{12} particles/ cm^3 and the CS concentration was 0.001 g/ cm^3 . The main aim is to elucidate how the AuNPs interact with the CS aggregates formed by the CS chains in solution both in absence and in presence of salt. For the latter purpose, we set a high ionic strength, $I = 0.25$ M, by addition of NaNO_3 . That ionic strength value represents a worse case for our purposes because it provokes a strong AuNPs aggregation (Pamies et al., 2014). Most of the experiments were carried out at $\text{pH} = 4$, achieved by controlled addition of acetic acid (HAc). The reason of choosing that pH is that it is around the lowest pH at which AuNPs do not appreciably aggregate (at least in the time scale using in our experiments) whilst the medium molecular weight CS can be easily dissolved. On the other hand, we use acetic acid instead of acetate buffer because the increase of the ionic strength associated to the latter provokes non-negligible nanoparticles aggregation. For the sake of completeness, we also carried out some experiments at $\text{pH} = 2$ by adding hydrochloric acid (HCl) in order to test the ability of CS to avoid the expected AuNPs aggregation under low pH . In addition, we have checked (results not shown) that at $\text{pH} > 4$ (at least up to $\text{pH} = 9$) gold nanoparticles do not aggregate so that working at high pH does not provide relevant information concerning the goal of this paper.

Influence of pH and ionic strength on the AuNP suspension

Figure II.1 illustrates the intensity size distributions obtained through DLS measurements for AuNPs suspensions under three different conditions of ionic strength and pH . The measurements were performed about 2 min after samples preparation to better appreciate how fast the AuNPs aggregation occurs under the same pH and ionic strength values that will be later imposed on the nanocomposite. At $\text{pH}=4$ we find practically the same distribution as the native nanoparticles at $\text{pH} = 7$ (Pamies et al., 2014) presenting a single narrow peak and an average hydrodynamic diameter about 13 nm which keeps for longer times (not shown here). Thus, the possible aggregation process due to $\text{pH} = 4$ must be extremely slow and does not affect the conclusions of

this work (for our practical purpose, the AuNPs suspension can be considered stable at that pH). However, under that same pH value but at the high ionic strength $I = 0.25$ M, clear strong (and quick) aggregation occurs (notice that the average hydrodynamic diameter shifts to about 500 nm). That aggregation process goes on with time giving rise to big aggregates of micrometer size (not shown here) which settle down thus appearing sedimentation in the measurement cell. On the other hand, if the pH of the native suspension is lowered to 2 by adding HCl, again clear aggregation quickly occurs arising AuNPs aggregates of average hydrodynamic diameter around 100 nm.

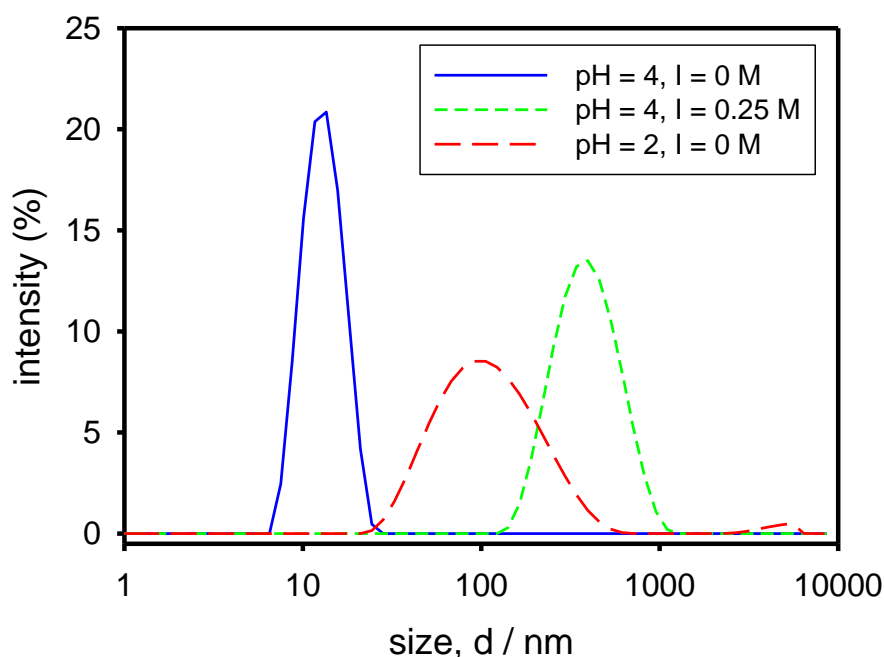


Figure II.1. Size distributions of AuNPs suspensions under the three different tested conditions as determined about 2 min after samples preparation.

The just described behaviour is confirmed by the UV-visible spectra depicted in Figure II.2. Although the absorbance value and the width of the absorbance peak (or plasmon peak) will depend on the nanoparticles concentration and the size distribution width, the position of the plasmon peak is just determined by the particle size. In Figure II.2, the plasmon peak corresponding to the AuNPs suspension at pH = 4 and $I = 0$ appears at the characteristic value for AuNPs with $d = 13$ nm, i.e. $\lambda \approx 520$ nm (solid line). After the salt addition to set $I = 0.25$ M, there is a clear peak shift up to $\lambda \approx 590$ nm (short-dashed line) that must be ascribed to the quick formation of big AuNPs aggregates as displayed in Figure II.1. Similar strong aggregation and plasmon peak shifts were found in our previous work on AuNPs when $I > 0.08$ M (Pamies et al., 2014). On the other hand, for a salt-free suspension at pH = 2 (long-dashed line), a peak shift up to $\lambda \approx 535$ nm is observed which must correspond to the intermediate aggregates of 100 nm size shown in Figure II.1.

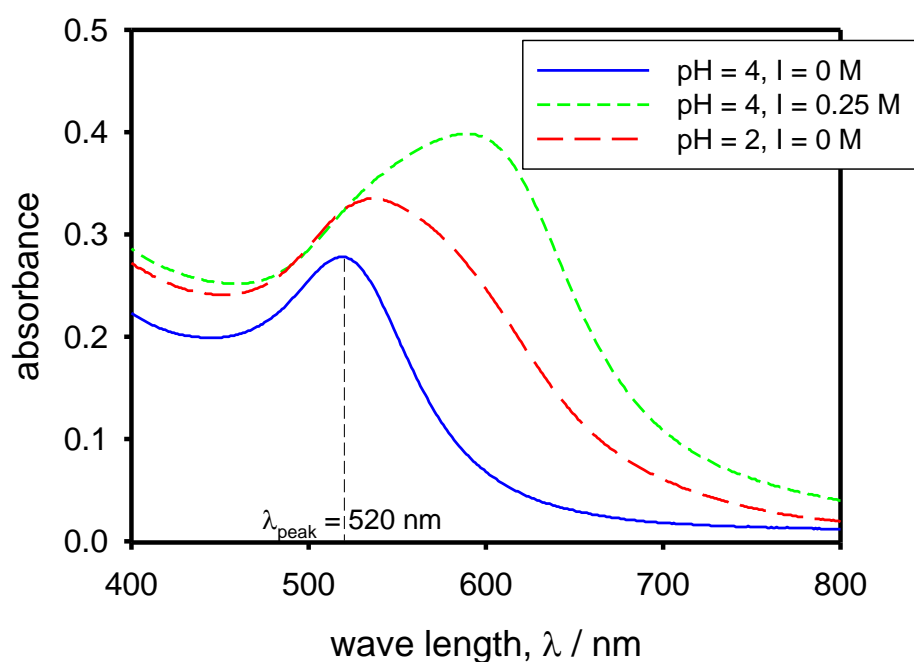


Figure II.2. UV-visible spectra of AuNPs suspensions under the three different tested conditions as determined about 2 min after samples preparation.

In conclusion, AuNPs clearly form big aggregates in lowering the pH and increasing the ionic strength severely. However, the moderate $\text{pH} = 4$ used in this work to dissolved CS does not provoke sufficient aggregation in order to interfere in the aggregation processes that could arise in the system formed by AuNPs and CS when working at severe pH or ionic strength conditions.

Influence of pH and ionic strength on the CS solution

CS is a common polysaccharide with a complex behavior (Domard, 2011; Rinaudo, 2006) that is solvable in acidic medium. We prepared CS solutions at $\text{pH} = 4$ with concentration $c = 0.002 \text{ g/cm}^3$ that becomes $c = 0.001 \text{ g/cm}^3$ at the working conditions. That concentration, already used in a previous similar work (Pamies et al., 2010), is about the critical overlap concentration, c^* , for the case of our CS solution (Cho, Heuzey, Bégin, & Carreau, 2006; Morariu, Brunchi, & Bercea, 2012). One can estimate c^* from the product $c^*[\eta] \approx 1$ (Cho et al., 2006), being $[\eta]$ the intrinsic viscosity of the polymer. Thus, we took from the literature (Morris, Castile, Smith, Adams, & Harding, 2009) values of $[\eta]$ for CS chains with similar features (degree of acetylation 20% and molecular weight 260000 Da) and dissolved in similar conditions ($\text{pH} = 4.3$ and $I = 0.2 \text{ M}$) that our CS chains and, in that way, we obtained $c^* \approx 0.0008 \text{ g/cm}^3$. Therefore, our CS solutions (both salty and obviously salt-free) are non-dilute and the CS chains form aggregates of varying size which characteristics will depend on both the CS intrinsic features and the environmental conditions (Korchagina & Philippova, 2010; Popa-Nita, Alcouffe, Rochas, David, & Domard, 2010; Schatz, Lucas, et al., 2004).

Figure II.3 shows size distributions for 0.001 g/cm³ CS solutions at pH = 4 corresponding to both salt-free conditions (I = 0 M) and high ionic strength (I = 0.25 M). The distribution by intensity for the salt-free case spans from 100 nm to 8000 nm although sizes beyond 5000 nm should not be seriously considered because they are close to the resolution limit of our DLS apparatus and curves are affected by different artefacts. Clearly, there are CS aggregates of micrometer size as indicated by the enormous peak around 3000 nm. Also, an important population of aggregates in between 200 nm to 500 nm must exist. However, for the case I = 0.25 M, no intensity is detected coming from particles bigger than 1000 nm. Instead, the distribution by intensity embraces smaller hydrodynamic diameters (from 10 nm up to 1000 nm) and presents two clear peaks, one around 40 nm and another around 300 nm. Interestingly, bimodal distributions for aqueous solutions of low molecular weight CS are often found in the literature (Chattopadhyay & Inamdar, 2010; Korchagina & Philippova, 2010). In conclusion, in presence of salt, all CS aggregates are clearly of submicron size; moreover, an important population of particles has a size smaller than 100 nm. Obviously, CS chains, either free or forming aggregates, must be less extended in the salty solution due to the shielding effect that the high concentration of NO₃⁻ ions has on the positively charged CS chains. Therefore, the possible CS aggregates must be shrunk in comparison to those formed in a salt-free solution and it is very likely that, in these conditions, chitosan molecules have much less tendency to form aggregates.

In terms of distribution by volume, our results show that in the absence of salt, most of the mass of chitosan is forming aggregates bigger than 1000 nm, while in the presence of salt, most of chitosan is found in structures (molecules or aggregates) of the order of 20-40 nm. This distribution also detects an important portion of mass with size under 10 nm that must correspond (if not an artifact) to degraded chitosan molecules. In terms of distribution by number, for the salt-free case, we find a few structures in the 20-40 nm range, but most of them are well above 100 nm. Instead, the situation changes completely when salt is added. Then, most of the particles are in the 10-30 nm range with a small peak for very small sizes (2-4 nm) which, as suggested above, must correspond to small portions of the chitosan molecule. Regarding this, it has been reported that CS chains can be degraded in acidic conditions (Mironov, Vikhoreva, Kil'deeva, & Uspenskii, 2007; Sun et al., 2008).

One can roughly estimate a range for the hydrodynamic diameter that would have our free CS chains in solution by using the relationship $d = 2 \times (3[\eta]M/10\pi N_A)^{1/3}$, where M is the molecular weight and N_A is the Avogadro number. As previously made to calculate c*, we took from the literature (Morris et al., 2009) values of [η] and M for CS chains with similar features and dissolved in similar salty conditions that our chains and, in that way, we obtained d values in between 50 nm and 80 nm. Therefore, for the case with I = 0.25 M, the peak about 40 nm may perfectly correspond to free CS chains which are close to the random coil conformation. That conformation is the reason to find a big population of free chains since they do not interact easily to form aggregates. However, the peak about 300 nm must correspond without any doubt to aggregates.

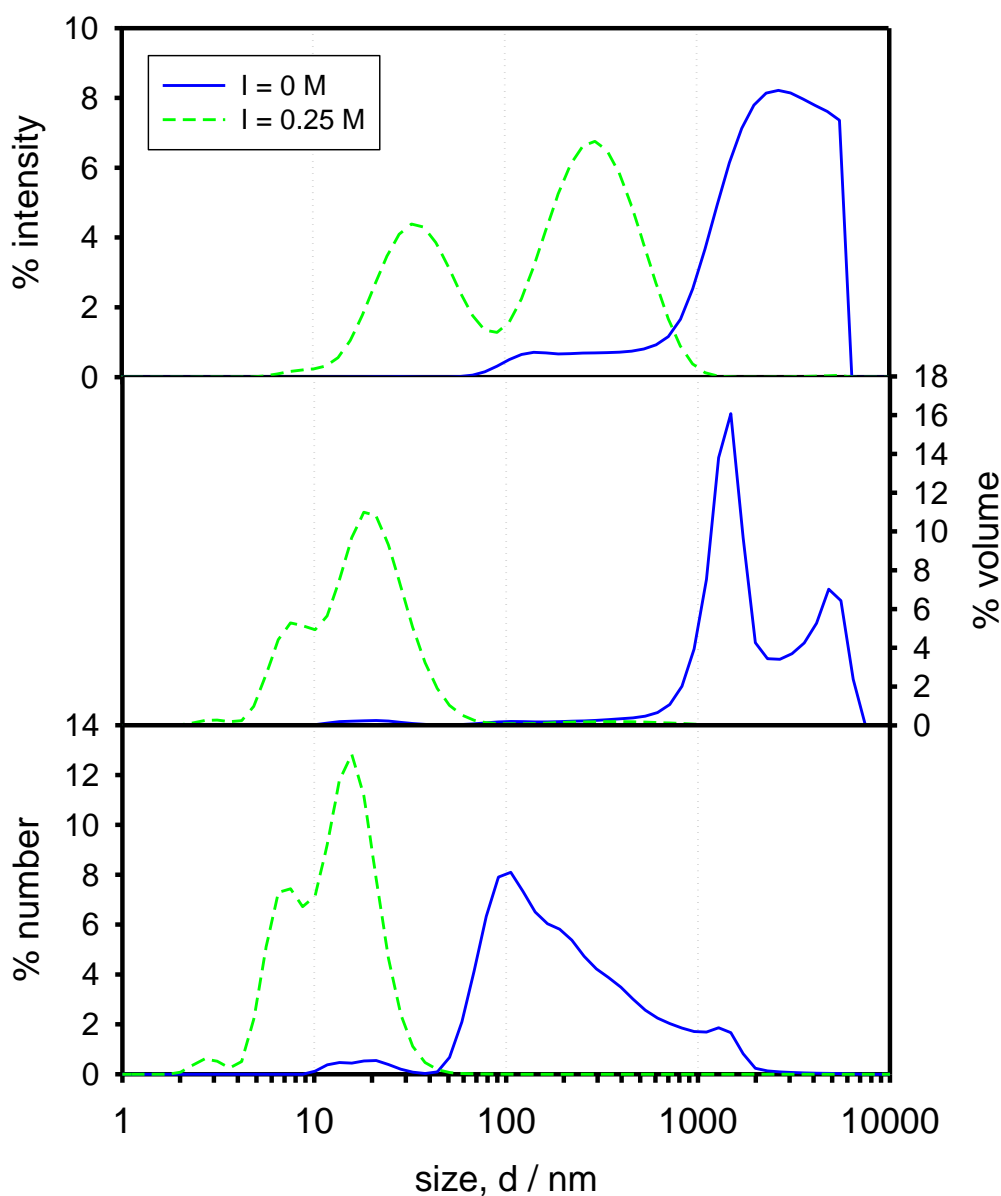


Figure II.3. Size distributions for 0.001 g/cm³ solutions at pH = 4 and two ionic strength conditions.

Figure II.4 shows size distributions for 0.001 g/cm³ CS salt-free solutions at both pH = 4 and pH = 2. The distribution by intensity shows that a decrease in pH provokes a decrease in the size of the CS aggregates. Even a significant peak is observed around 20 nm. Obviously, at pH = 2, the CS chains must be more protonated than at pH = 4 what increases their charge density and, as a consequence, their tendency to aggregate diminishes. Distributions by volume and number show that the amount of mass in aggregates is very small: nearly all CS is forming structures of the size of a single molecule. On the other hand, the existence of structures under 10 nm may be a consequence of the above mentioned CS degradation which must be much more relevant at low pH.

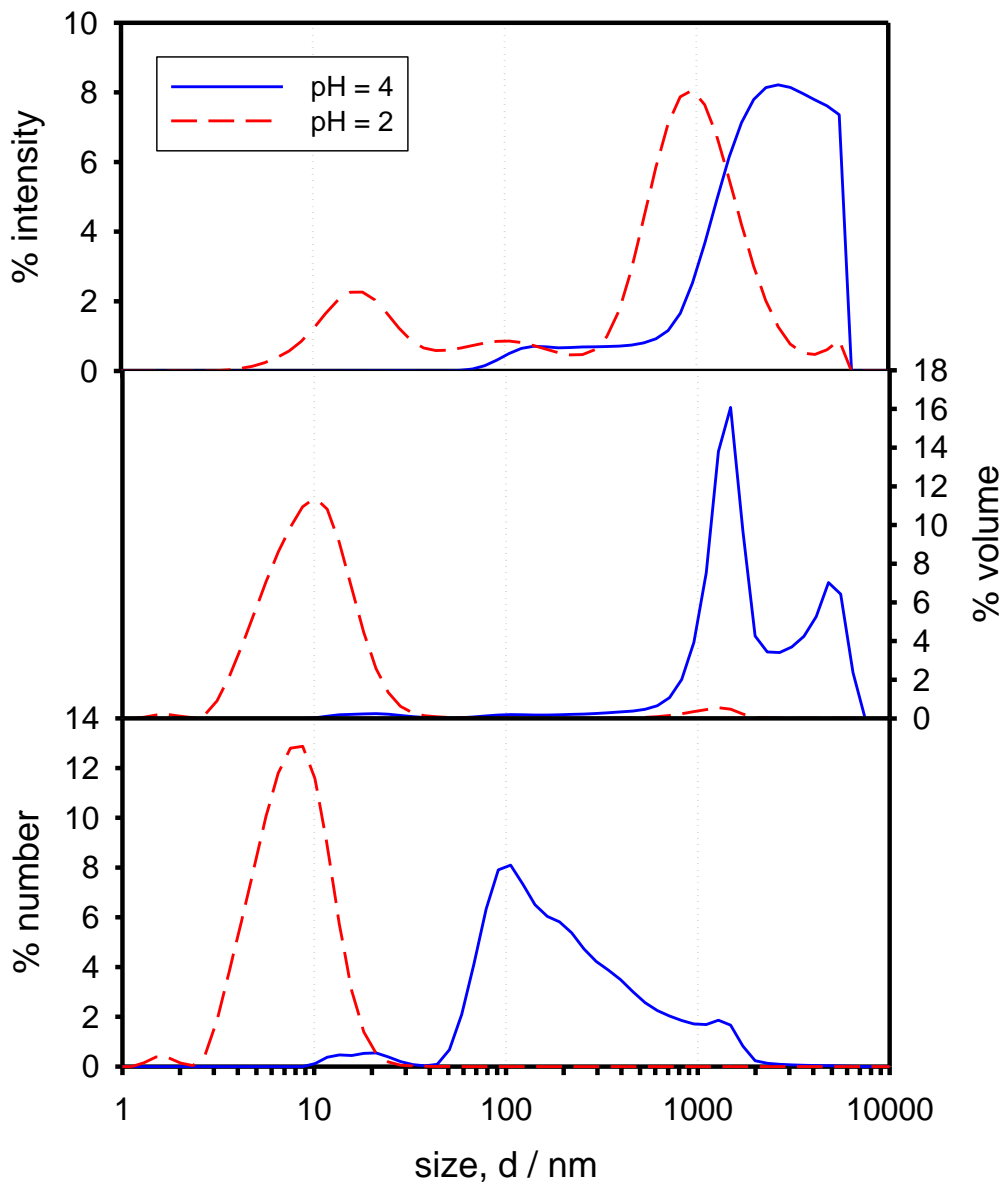


Figure II.4. Size distributions for 0.001 g/cm³ CS salt-free solutions at two pH values.

Influence of pH and ionic strength in the AuNP+CS nanocomposite

We now proceed to evaluate how the AuNPs behave in presence of CS. For that purpose we mix the native AuNPs suspension with a CS solution (0.001 g/cm³ after mixing) at pH = 4. The CS solution can either be salt-free or have a high ionic strength $I = 0.25$ M.

Figure II.5 illustrates the interaction of AuNPs with CS at pH =4 and salt-free conditions. For that purpose, the size distributions for the three systems (AuNPs suspension, CS solution and AuNP+CS nanocomposite) are plotted altogether. The distributions by intensity clearly show that the interaction between AuNP and CS provokes a reduction of the size of the detected aggregates: the peak at around 3000 nm (long-dashed line) is shifted to around 500 nm (solid line). The 500 nm size aggregates

can be ascribed to CS structures that become smaller in presence of AuNPs because the negatively charged AuNPs screen the charges on the CS chains. In turn, the characteristic peak of our AuNPs about 13 nm (short-dashed line) has disappeared. Therefore, everything indicates that most of the AuNPs are attached to the CS aggregates that become a trapping network for the nanoparticles. In the distribution by volume (and also by number), we observe that most of the mass is forming structures of small size around 20 nm (as it already occurred in the salty CS solution, Figure II.4). Also, a significant part is found as aggregates of micrometer size and a very small part in structures under 10 nm. As commented above, the latter likely corresponds to pieces of CS chains that suffered from degradation in acidic medium (Mironov et al., 2007) rather than to free AuNPs.

In Figure II.6, it is depicted a comparison between the size distributions corresponding to the nanocomposite both in presence (short-dashed line) and absence (solid line) of salt. As above mentioned, we firstly prepared a CS solution at the working ionic strength $I = 0.25$ M and then we added the AuNPs suspension. The distribution by intensity reveals that the effect of the ionic strength is just to reduce the size of the nanocomposites that must be quickly formed between the CS aggregates and the AuNPs. As explained previously, NO_3^- ions shield the positive charges on the CS chains (much more efficiently than the AuNPs) so that they become less extended on average. Clearly, when the nanoparticles are added to a CS solution of high ionic strength, two options appears: either AuNPs interact with each other to form AuNPs aggregates or they become attached to the already existing CS aggregates. Our results indicate that the latter option is preferred so that the CS aggregates are a very efficient trapping network for the AuNPs. If AuNPs aggregates were able to be formed, it would occur quickly and massively under $I = 0.25$ M (see Figure II.1), and particles beyond the micrometer size experiencing sedimentation would be detected. No one of those phenomena is observed. The distributions by volume and number are narrower than in the absence of salt and indicate that most of the mass is forming structures below 100 nm.

Finally, we show in Figure II.7 the effect of lowering the pH in the salt-free solution of the nanocomposite by addition of HCl. The distribution by intensity shows that the effect of changing the pH is small once the nanocomposite is formed. The distributions by volume and number indicate that a decrease in pH increases the amount of mass organized in small structures (single molecules or fractions of single molecules).

In sum, what it seems clear is that when AuNPs are added to a CS solution in favourable conditions for strong and fast nanoparticles aggregation, such aggregation does not happen. The only explanation is that AuNPs are quickly trapped by the CS structures so that they cannot aggregate.

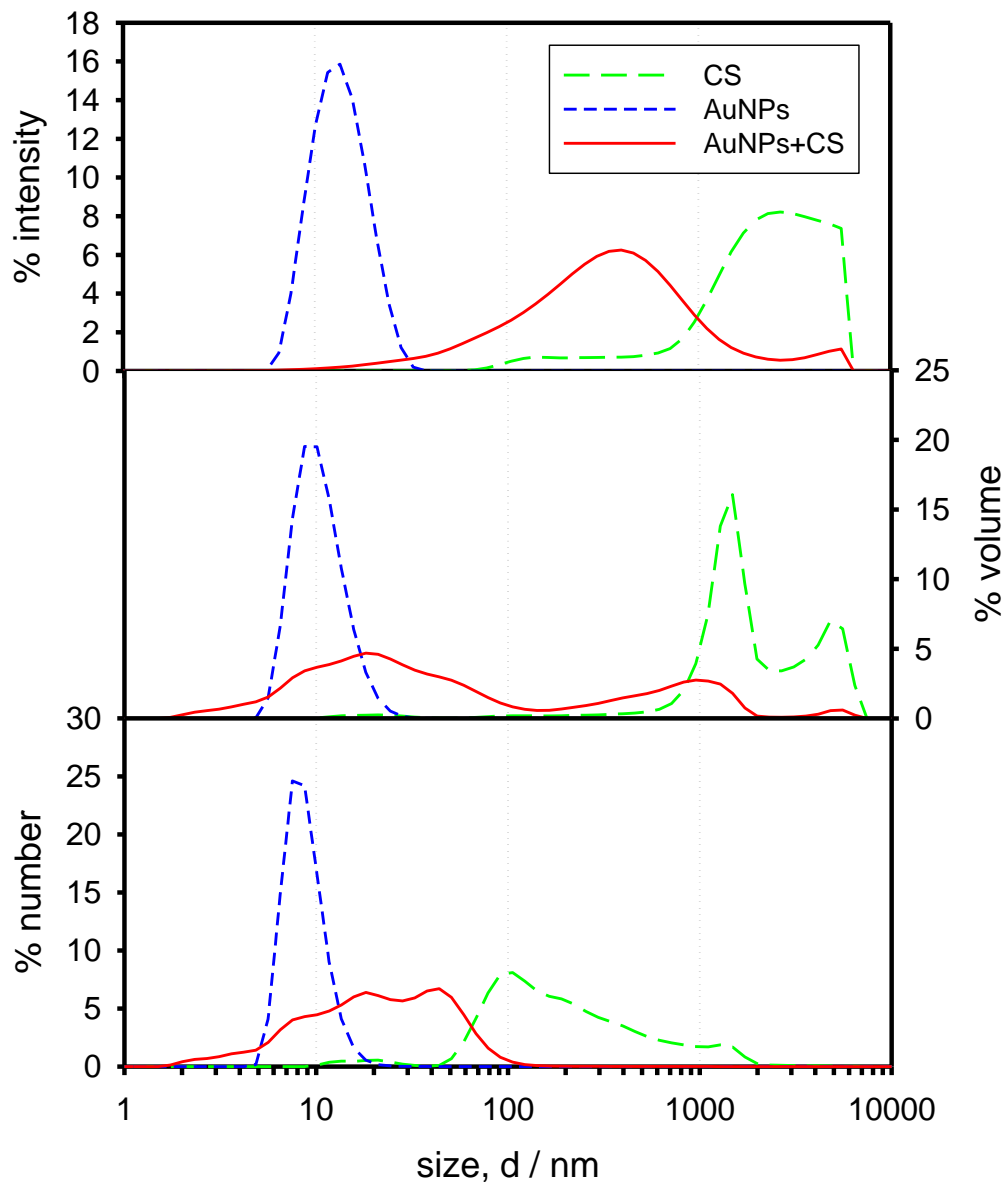


Figure II.5. Comparison of size distributions for AuNPs suspension, CS solution, and nanocomposite (AuNP+CS) under salt-free conditions and pH = 4.

Previous findings are confirmed by UV-visible measurements performed within a wavelength region that probes the size of the AuNPs without interference of the CS structures. Figure II.8 shows the UV-visible spectra corresponding to the different evaluated systems that involve AuNPs. As already commented, the relevant aspect of the spectra to elucidate the presence of AuNPs aggregates and their sizes is the position of the plasmon peak. As observed in Figure III.8, the value $\lambda_{\max} \approx 520$ nm is found both in the curve corresponding to the initial AuNPs suspension at pH = 4 (solid blue line), which corresponds to particles of diameter 13 nm, and the curves corresponding to the nanocomposites formed after mixing that initial AuNPs suspension with CS solutions under the different acidic and ionic strength conditions (red lines). Moreover, the two curves corresponding to the nanocomposite at pH = 4 superimpose almost perfectly regardless the ionic strength. All those evidences demonstrate that a low pH or a high

ionic strength does not provoke AuNPs aggregation (as it does occur in absence of CS (dashed blue lines)) because the nanocomposite formation is very fast and stable.

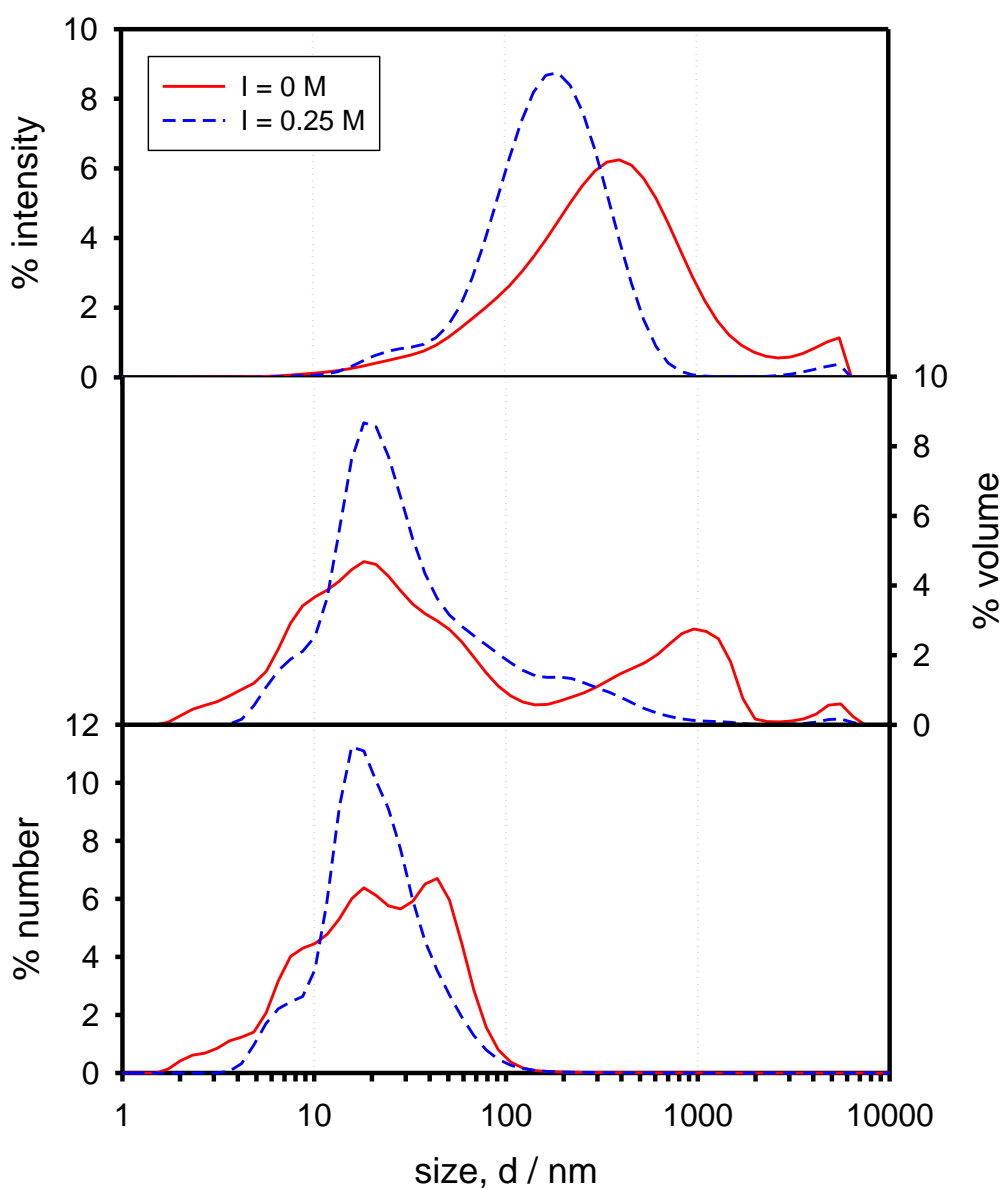


Figure II.6. Size distributions for the nanocomposite (AuNPs+CS) solution at pH = 4 both in absence ($I = 0$ M) and presence ($I = 0.25$ M) of salt.

Nevertheless, a closer inspection to the plasmon peaks of the nanocomposites reveals that their wave length position is indeed shifted towards a slightly higher value ($\lambda_{\max} \approx 524$ nm) than that corresponding to our initial AuNPs suspension (see dotted line in Figure II.8 to guide the eye).

Our assumption that most of the AuNPs are trapped in the CS aggregates explains every spectrum and size distribution feature of the nanocomposites. Firstly, the position of the plasmon peaks clearly indicates that the sizes of the majority of the AuNPs in the nanocomposite systems are close to 13 nm (i.e. there are not big AuNPs aggregates);

however, no AuNPs with that size are detected by DLS. The reason is that they cannot move freely around the solution because they are trapped into CS aggregates. Secondly, the slight red shift experienced by the plasmon peaks of the nanocomposites respect to the value in the initial AuNPs suspension is explained if AuNPs are very close on average (Sönnichsen, Reinhard, Liphardt, & Alivisatos, 2005) but avoiding the necessary contact to form the big aggregates expected when $I = 0.25$ M or $\text{pH} = 2$ which would provoke a more dramatic red shift. That may occur if many individual (or very small clustered) AuNPs are trapped in the CS. Finally, the good superposition of the absorbance curves for both $I = 0$ M and $I = 0.25$ M (at a same pH) further confirms the quick and strong immobilization of many individual (or very small clustered) AuNPs in the CS networks independently of the environmental conditions.

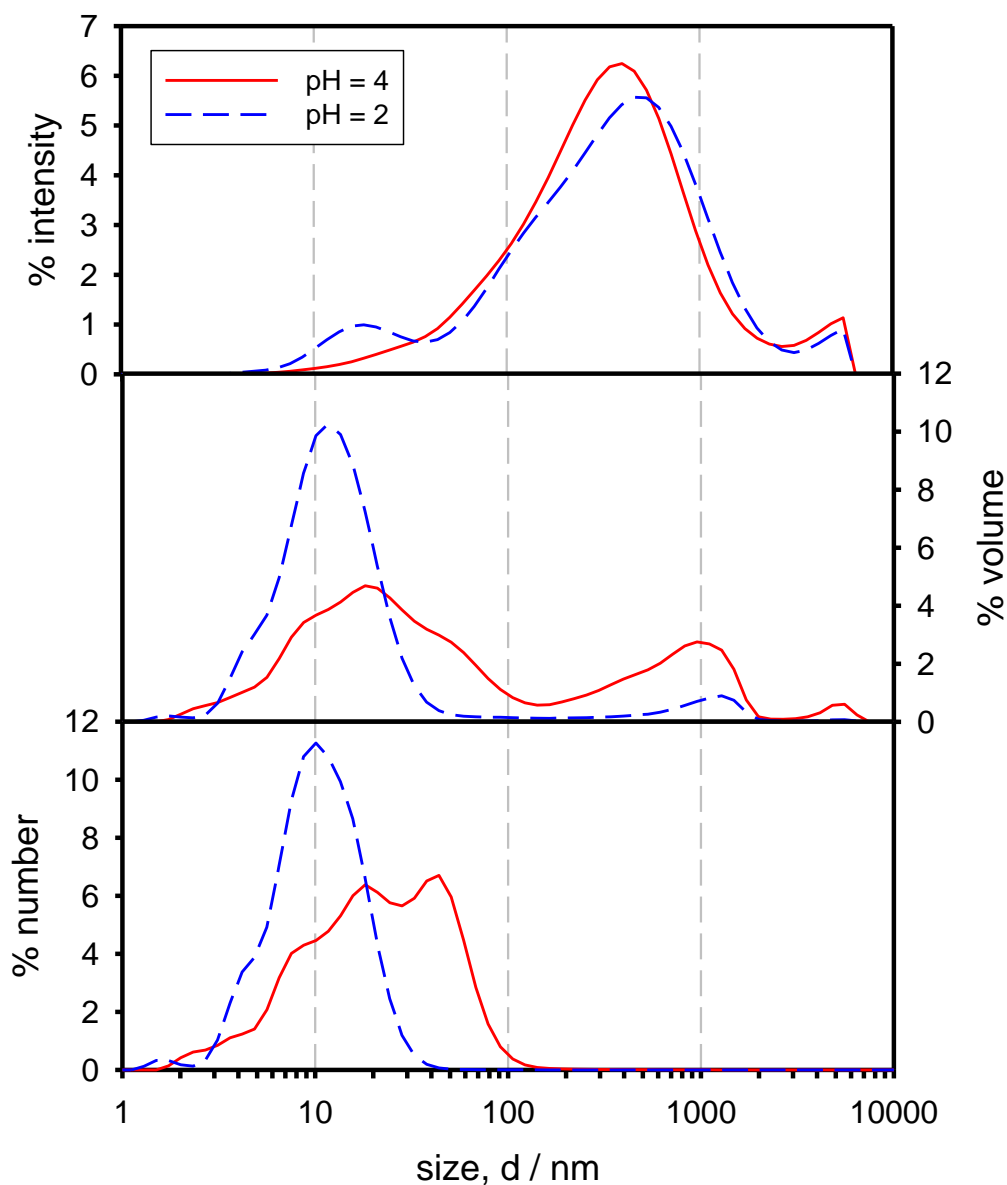


Figure II.7. Size distributions for the nanocomposite (AuNP+CS) salt-free solution at two pH values).

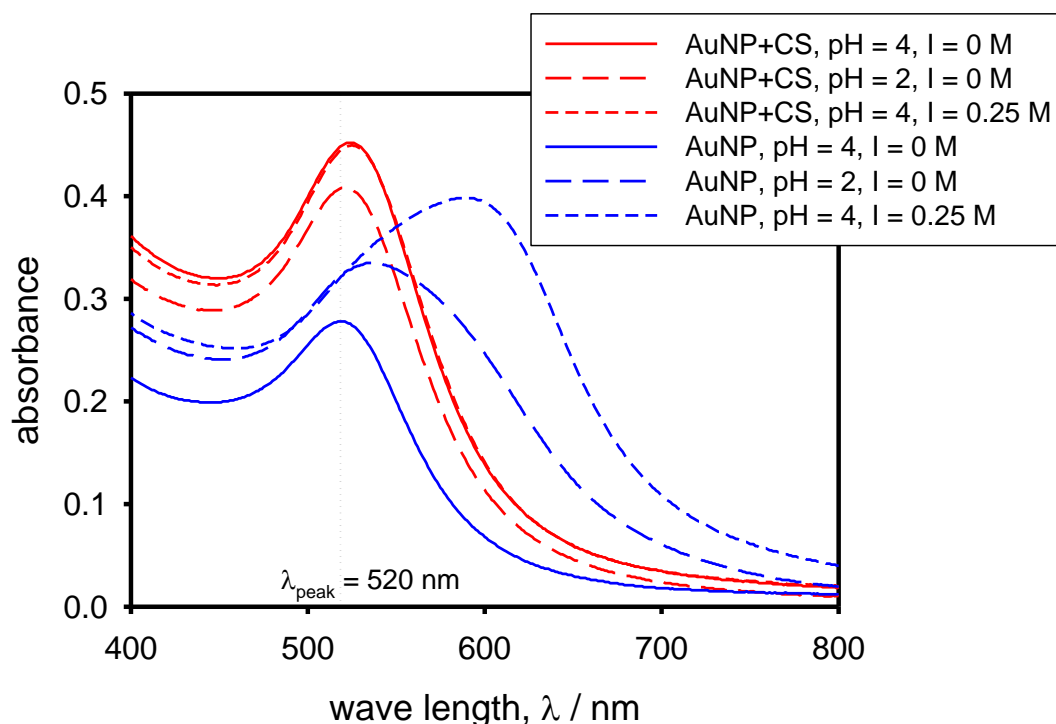


Figure II.8. UV-visible spectra to control the presence of AuNPs aggregates under different conditions. Vertical dotted line marks the plasmon peak of the initial AuNPs suspension.

The above conclusions are supported by TEM images which shed further light on the structure of AuNPs+CS nanocomposites. Figure II.9 is a TEM image corresponding to a salt-free solution at $\text{pH} = 4$. There, one can appreciate associations of AuNPs in different solution regions but preserving the nanoparticle individuality. The size of the regions with AuNPs associations depends on the size of the underlying CS aggregates. That image is consistent with the presence of a plasmon peak at $\lambda_{\text{max}} \approx 524 \text{ nm}$ since AuNPs seem to form associations of individual particles which are close enough in order to provoke a slight red shift of the plasmon peak. One can also appreciate that apparently isolated AuNPs are indeed attached to CS structures.

In fact, if we compare the TEM images of commercial AuNPs (see, for example, Pamies et al., 2014) with no aggregation detected, we find that they are similar because no large structures of touching AuNPs are found, although in the only AuNP suspension the distribution of nanoparticles appears more homogeneous with no areas of high density of AuNPs (as those observed in Figure II.9) and, as a consequence, a higher average distance among them. In addition, Figure II.10 shows a TEM image of the AuNP suspension at $\text{pH} 4$ and $I = 0.25 \text{ M}$. In this figure, a large AuNP aggregate is clearly observed. This micro-sized structure consists of a very high number of touching AuNPs, which clearly explains the very significant increase in the wavelength of the plasmon peak.

When the ionic strength of the system is $I = 0.25 \text{ M}$, we obtain TEM image like that depicted in Figure II.11. Although in this case UrAc has not been added, one can appreciate structures of CS where AuNPs are attached. The difference in the

organization of AuNPs with CS is very clear, in the same way that is very clear the similarities with Figure II.9 showing the nearly negligible effect on the addition of salt when the nanocomposite has been formed. The TEM images support the results shown in Figures II.1, II.2 and II.8.

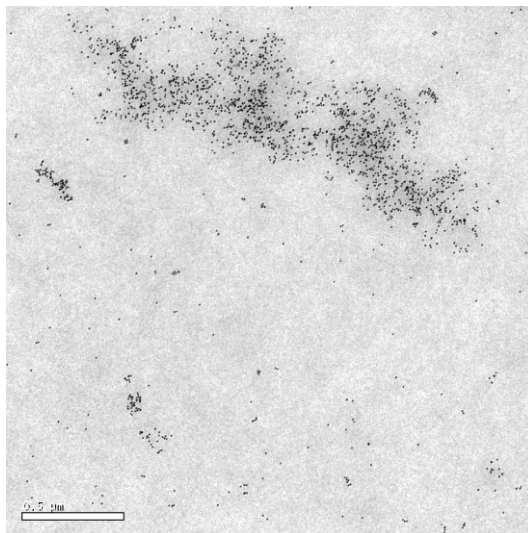


Figure II.9. TEM image of nanocomposite salt-free solution at pH = 4. White bar on the left bottom corner represents 0.5 μm

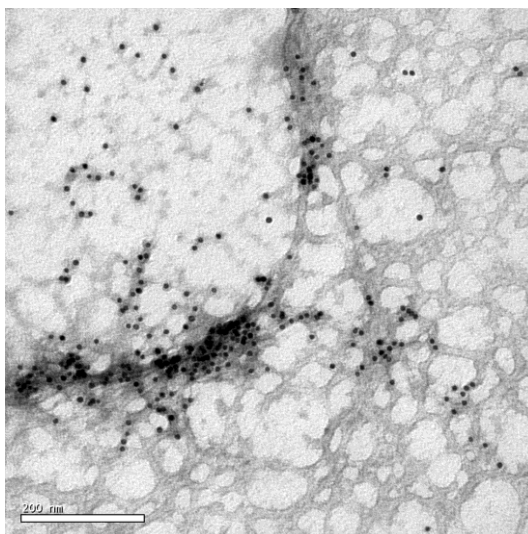


Figure II.10. TEM image of the nanocomposite salt-free solution after UrAc addition. White bar on the left bottom corner represents 200 nm.

Finally, TEM images suggest that most of the trapped AuNPs are stuck on the surface of the CS aggregates. Otherwise, if AuNPs could penetrate easily within the CS networks, most of the images will show regions with very high AuNPs density and the individuality of the AuNPs could not be appreciated.

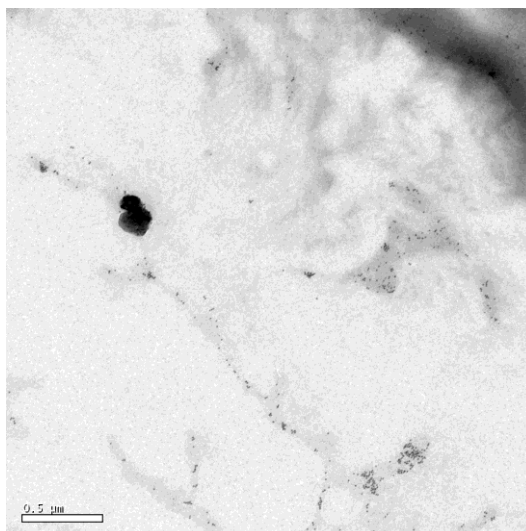


Figure II.11. TEM image of the nanocomposite solution at pH = 4 and I = 0.25 M. White bar on the left-bottom corner represents 0.5 μm .

Conclusions

CS is a positively charged polysaccharide that after solution in an acidic medium forms aggregates. When an AuNPs suspension is added to a chitosan solution (indeed a suspension of chitosan aggregates), the metallic nanoparticles approach the CS aggregates due to electrostatic attraction and stick mainly on their surface where they keep immobilized. Although the nanocomposites so formed have a varying shape and size that depend on solution parameters like pH and ionic strength, structures beyond 1000 nm are rarely found.

Although individual AuNPs can aggregate by increasing the salt concentration or decreasing the pH, that process does not occur in presence of CS. The reason is that the formation of the AuNPs+CS nanocomposites is very fast and once the AuNPs become trapped on the CS network they cannot aggregate. The AuNPs are distributed mainly on the surface of the CS structures in such a way that they are close enough but not in the necessary contact to form big AuNPs aggregates what explains the just slightly shift of the plasmon peak from $\lambda_{\text{max}} \approx 520$ nm (characteristic of isolated AuNPs of 13 nm size) to $\lambda_{\text{max}} \approx 524$ nm. In sum, CS prevents AuNPs from aggregation.

**Chapter III: Characterization of gold
nanoparticles-chitosan nanocomposites of
controlled size**

Introduction

The instability of gold nanoparticles coated by citrate (AuNP) at physiological conditions is the reason why stabilizing agents are used. However, although three centuries have passed since the first attempt to stabilize AuNP with polymers, the desired stabilization still has not developed.

Due to their properties, AuNP have been used to develop some devices in the field of biomedicine (Larguinho & Baptista, 2012). Because of their tendency to aggregate in solution, a strategy to avoid it consists in covering it with small charged molecules which act as stabilizing agents through the appearance of electrostatic repulsive forces on the surface of AuNP. However, if the medium has an ionic strength high enough or low pH, these electrostatic interactions are screened and aggregation occurs (Laaksonen, Ahonen, Johans, & Kontturi, 2006; Pamies et al., 2014).

A practical solution to stabilize AuNP is adding some biocompatible polymer which gets adsorbed on the surface of the nanoparticles (Chatterjee, Sarkar, Jagajjani Rao, & Paria, 2014). In AuNP the citrate group shows a negative Z potential and acts as a bridge among nanoparticles and a polycationic polymer as chitosan (CS) (Ojea-Jiménez & Puentes, 2009). Prado-Gotor and colleagues published the first attempt to synthesize nanocomposites composed of AuNP and CS low molecular weight (Prado-Gotor, López-Pérez, Martín, Cabrera-Escribano, & Franconetti, 2014). In this work, nanostructures in which AuNP were inside a structure and CS covers the structure and kept exposed to the environment.

The first objective of this chapter is obtaining nanocomposites composed of MMW CS and AuNP. The second objective is the study of the stability over the time of the nanosystems developed. Also characterization of the nanodevices obtained under different conditions which induce the AuNP aggregation will be studied.

Materials and methods

Materials

The aqueous suspension of monodisperse gold nanoparticles (5.7×10^{12} particles/cm³) was purchased from Ted Pella, Inc. (Redding, CA) and stored at 4°C in a refrigerator. The nominal hydrodynamic diameter of those nanoparticles was $d = 10$ nm according to the manufacturer's specifications and $d = 13$ nm according to our DLS measurements. The nanoparticles are coated with a citrate layer (negatively charged) that avoids aggregation.

Chitosan of medium molecular weight was purchased from Sigma-Aldrich (448877-250G). According to the manufacturer's specifications the molecular weight range is 190000 – 310000 Da and deacetylation is 75 – 85% (i.e. the degree of acetylation is 15 – 25%, and so solvable in dilute acidic medium). Chitosan was dissolved in milliQ

water with glacial acetic acid from Panreac at pH = 3 at a final concentration of 10^{-5} g/mL.

The synthesis of nanocomposites was started with 1.5 mL of an AuNP suspension. Then, volumes of the CS solution were added in a controlled way. After the addition, samples were homogenized and measured by DLS. For characterization by other techniques, the synthesis of nanocomposites was started with 1 mL of AuNP suspension, and the equivalent volume of CS solution to maintain the proportion among species was added (Table III-1).

Table III-1. Volumes of a CS solution at 10^{-5} g/mL were added to a 1 mL or 1.5 mL of AuNP suspension in the synthesis of nanocomposites composed of AuNP and CS.

1 mL AuNP	1.5 mL AuNP
20 μ L	30 μ L
100 μ L	150 μ L
246.5 μ L	390 μ L
652.5 μ L	1030 μ L
975.9 μ L	1930 μ L
1617.9 μ L	2530 μ L

Methods

Dynamic Light Scattering: hydrodynamic size and ζ potential.

Hydrodynamic size was measured by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) equipped with a 4 mW He/Ne laser emitting 633 nm. The apparatus works at a wide range of temperatures, up to 120 °C. The scattering intensity at a 173° angle relative to the source (backscattering) was measured and the software calculates the size distribution function, i.e. the hydrodynamic diameter distribution, from the time autocorrelation function of the scattering intensity fluctuations. Each DLS assay of controlled synthesis was composed of 4 measurements run automatically and each stability assay comprised 5 measurements (5 runs of 20 seconds each). Every plot represents the average of the measurements performed. It was checked that these protocols provide very reproducible intensity, volume and number distributions.

Although the three types of size distribution (intensity, volume and number) supplied by the Zetasizer software will be discussed, caution must be taken in the interpretation of distributions by volume and number, which are obtained from the distribution by intensity assuming, in addition to the sphericity and homogeneity of particles and the accuracy of the primary distribution by intensity, a precise knowledge of the actual refractive index of the particles (we have checked that the influence of this factor is very small for our system). Thus, the distribution by intensity must be that considered in order to characterize particle size, whereas distributions by volume and number are adequate for estimating relative populations of the particles when comparing results from different conditions.

The Malvern Zetasizer Nano ZS instrument is also able to measure the zeta potential ζ which gives information about the charge on the surface of the colloidal particles. Particles with ζ potentials greater than +30 mV or less than -30 mV are commonly considered stable because the electric repulsion is usually high enough to prevent aggregation. Each Z potential assay consisted of 6 measurements made in an automated way. That is, the software makes at least 13 runs and continues until the standard deviation of the measurements were within the acceptability criteria of the software or until 100 runs were performed.

Absorption spectra were collected using a T92+ UV-visible spectrophotometer (PG Instruments, UK). Each UV-visible spectroscopy assay consisted of 3 measurements. For the analysis of the results, a base line for each peak was extrapolated, and then the difference between the two curves was calculated. The λ_{\max} was calculated by adjusting the peak obtained to a Gaussian 4 parameter peak by SigmaPlot 10.0. The scanning wave length (λ) range was set from 300 nm to 1000 nm with a scanning interval of 1 nm. Measurements were made at 25 °C. We checked that the chosen λ range ensures that the absorption peak in the nanocomposite formed by AuNPs and CS is only due to the metallic nanoparticles. Thus, the surface plasmon resonance exhibited by AuNPs is displayed as a strong absorption band in the visible region.

Each sonication cycle consisted of two pulses of 30 seconds ON with a delay of 30 seconds. Total time of sonication was 1 min per cycle. Amplitude was fixed at 30%. The total number of cycles was 0, 1 or 2 (indicated in the text).

Results and discussion

AuNPs interact with chitosan (CS) and as a result nanocomposites (NC) are formed. These nanocomposites are composed of a core of chitosan and AuNP fixed onto the polymeric chains. This chapter describes a method for synthesizing NCs of controlled size.

Slow rate interaction

The total time to carry out this method was 9 days. In this period of time, CS was added slowly to permit gradual interaction among the species involved.

At the beginning, AuNP showed a main population centered in tens of hydrodynamic diameter (97.7%). After adding the biopolymer, the AuNP population diminished and another population centered in hundreds of nanometers appeared (Table III-2). Since, the new population had a hydrodynamic diameter that was bigger than the one of AuNP and smaller than the one of CS, it probably corresponded to the interaction of both species. According to DLS measurements, the higher the content of CS, the higher the hydrodynamic diameter of the NC obtained.

Table III-2. Hydrodynamic diameter of particles present in suspension of AuNP, CS 10^{-5} g/mL and suspensions of nanocomposites composed of AuNP+CS after adding the indicated volumes.

		Intensity		Number	
		Hydrodynamic diameter	%	Hydrodynamic diameter	%
AuNP		14±5 4356±943	97.7 2.3	8±2	100
CS 10^{-5} g/mL		493±305 4453±1049 46±18	75.6 12.7 11.7	27±10 306±180	100 0
Volume of CS solution at 10^{-5} g/mL added	Time since beginning (h)	Intensity		Number	
		Hydrodynamic diameter	%	Hydrodynamic diameter	%
30 μ L	0.25	18±5 411±88	57.4 42.6	12±3	100
310 μ L	67	146±94 17±6 3691±1219	69.1 23.8 7.1	11±3	100
1030 μ L	187	67±31 4815±816	97.5 2.5	27±10	100
1930 μ L	190	245±138 4754±766	98.6 1.4	37±5 87±46	21 79
2930 μ L	192	1639±349 959±97	68.4 31.6	1283±310	100

Fast rate interaction

The fast rate synthesis of NC took roughly 3.5 hours to complete. The only difference between both methods was that at the fast rate, the time between two adding events was limited to several minutes.

The distribution by intensity revealed that when 290 μ L of CS solution at 10^{-5} g/mL was added to a suspension of AuNP a population appeared measuring around hundred of nanometers (Figure III.1). The same result was obtained for the slow synthesis rate. However, it is of note that, at the fast rate, the population due to AuNP did not decrease to the extent that it did at the slow rate. A plausible explanation for this is that, due to the smaller length of time between the biopolymer additions, the interaction among species had not enough time as it had before. As a consequence, a large amount of AuNP remained in a free situation. Again, the more CS solution added, the smaller the population in the range of tens of nanometers and the larger the one in the range of the hundreds of nanometers, which was due to the presence of nanocomposites. Also of note is the fact that the fast rate interaction yielded nanometric structures even when the content of biopolymer was greater.

The distribution by volume revealed that the size of nanocomposites increased as the amount of CS in the sample increased. It is important to emphasize that at final volume of polymer added, a large amount of AuNP was still free in the solution.

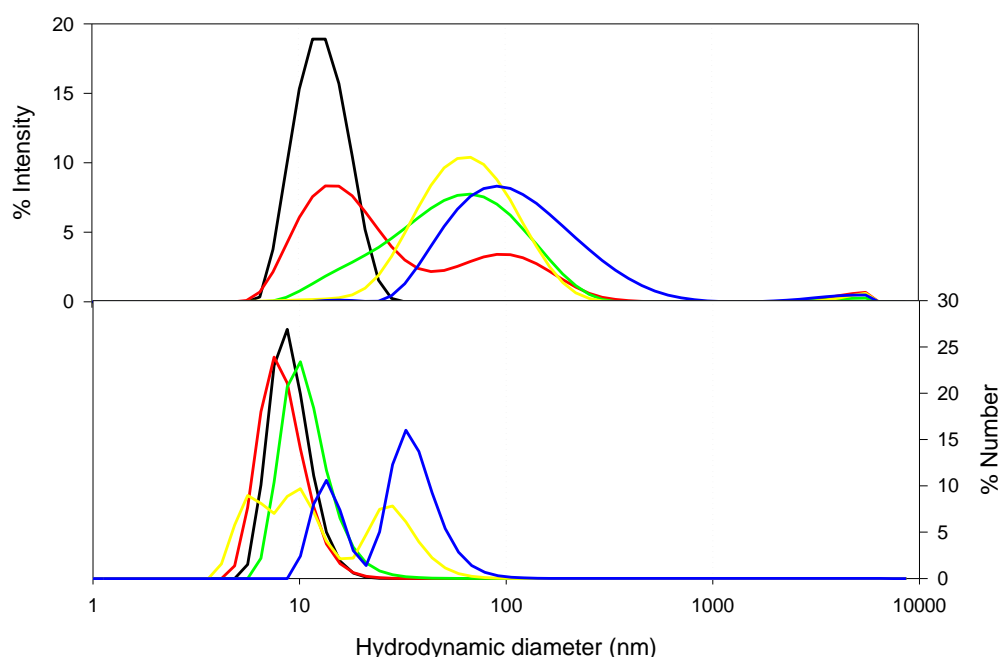


Figure III.1. Hydrodynamic diameter of composites composed of AuNP and CS obtained by a fast rate interaction. Curves represent AuNP after adding 0 μL (black), 290 μL (red), 1030 μL (green), 1930 μL (yellow) or 2730 μL (blue) of a CS solution at a concentration equal to 10^{-5} g/mL.

Z potential measurements indicated that the nanostructures were negatively charged (Table III-2). According to the results, AuNP were on the surface of the CS and exposed to the environment. When the volume of CS solution added was equal to or higher than 652.5 μL the population showed a monodisperse population with a Z potential centered at about -25 mV, a value outside the instability region. As a result, we concluded that AuNP was on the surface of the biopolymer, and an increase in the content of the polymer yielded NC with a monodisperse distribution, which was stable in terms of no aggregation.

UV-Vis spectroscopy measurements of each of the five solutions were carried out. In order to facilitate comparisons, an additional measurement of AuNP was also made. Analysis of these measurements reveals that the maximum of absorbance shifts towards higher wavelengths as the amount of CS in the solution increases (Figure III.2). However, no AuNP aggregation took place, as is evident from the wavelength at which the maximum of absorbance of each sample appears (Table III-3).

All the above results indicate that the fast rate method yields nanocomposites of a homogeneous size. This method is reproducible and apparently scalable.

Table III-2. Z potential, electrophoretic mobility, and conductivity of samples containing NC composed of AuNP and CS. Each sample was started with 1 mL of AuNP and then the indicated volume of a CS solution (10^{-5} g/mL) was added.

Volume added (μL)	Z Potential		Electrophoretic mobility		Conductivity (mS/cm)
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	
20	-54 \pm 4	28.6	-4.2 \pm 0.3	28.6	0.422
	-126 \pm 9	27.3	-9.9 \pm 0.7	27.3	
	-83 \pm 5	24.2	-6.5 \pm 0.4	24.2	
100	-79 \pm 4	59.5	-6.2 \pm 0.3	59.5	0.365
	-102	29.0	-8.3 \pm 0.5	29.0	
	-143	4.8	-11.2 \pm 0.2	4.8	
246.5	-18 \pm 14	87.4	-1.4 \pm 1.1	87.4	0.339
	-102 \pm 6	7.7	-5.5 \pm 0.6	7.7	
	-96 \pm 5	2.3	-7.6 \pm 0.4	2.3	
652.5	-23 \pm 17	99.9	-1.8 \pm 1.4	99.9	0.298
	-104 \pm 4	0.1	-8.2 \pm 0.3	0.1	
	-15 \pm 4	27.9	-1.2 \pm 0.3	27.9	
975.9	-25 \pm 17	98.6	-2.0 \pm 1.3	98.6	0.285
	-81 \pm 2	0.5	-6.3 \pm 0.1	0.5	
	-95 \pm 5	0.5	-7.4 \pm 0.4	0.5	
1617.9	-24 \pm 7	100	-1.9 \pm 0.5	100	0.284
	-3 \pm 2	0	-0.2 \pm 0.1	0	

Table III-3. Wavelength of maximum absorbance (λ_{max}) of NC composed of AuNP and CS. Each sample was started with 1mL of AuNP suspension and then indicated volume of a 10^{-5} g/mL CS solution was added.

Volume added (μL)	λ_{max} (nm)
0	521.57
20	522.18
100	522.54
246.5	524.40
652.5	527.37
975.9	532.49
1617.9	547.37

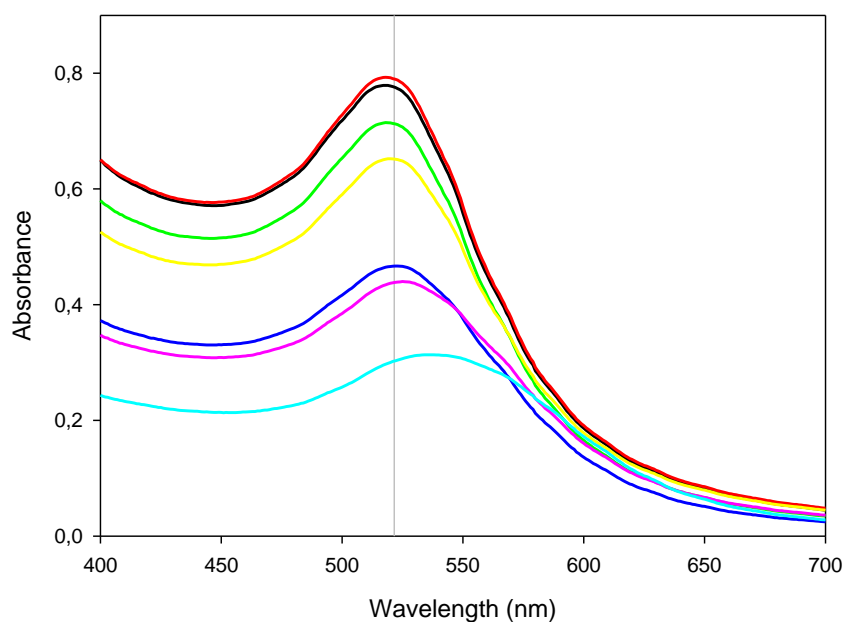


Figure III.1. UV-visible spectra of NC composed of AuNP and CS obtained by fast rate method. Curves represent AuNP (black) and NC containing 20 μL (red), 100 μL (green), 246.5 μL (yellow), 652.5 μL (blue), 975.9 μL (pink), and 1617.9 μL (cyan) of CS solution 10⁻⁵ g/mL. Gray vertical line indicates maximum of absorbance of AuNP.

Sability of the nanocomposites as a function of time

The size of the nanocomposites was measured by DLS several months after being synthesized. Figure III.3 shows the average of five measurements of the size of the nano-composites, which were synthesized by the slow rate method. These measurements were taken during synthesis and two months later, during which time the nano-composites were kept refrigerated. The great difference between the cumulative analyses and the adjustment by the least-squares of these measurements, which can be seen in every measurement (data not shown), indicates that larger aggregates than could be detected by the DLS software were present in the sample. In addition, the DLS plots point to great heterogeneity in the measurements 2 months after synthesis, which indicates that nano-composites synthesized in this way are not stable and tend to aggregate with time.

Synthesis using the fast rate method yielded nanocomposites that were very stable with time, as can be seen in Figure III.4. After 4 months of refrigeration, the nanocomposites showed little change in their hydrodynamic diameter, as can be seen in the distribution based on intensity. Larger changes can be seen in the distributions based on number. Anyway, the nanocomposites synthesized in this way always remained within the nanometric range. So, the stability of the nanocomposites synthesized in this way was greater than that obtained with the slow rate method.

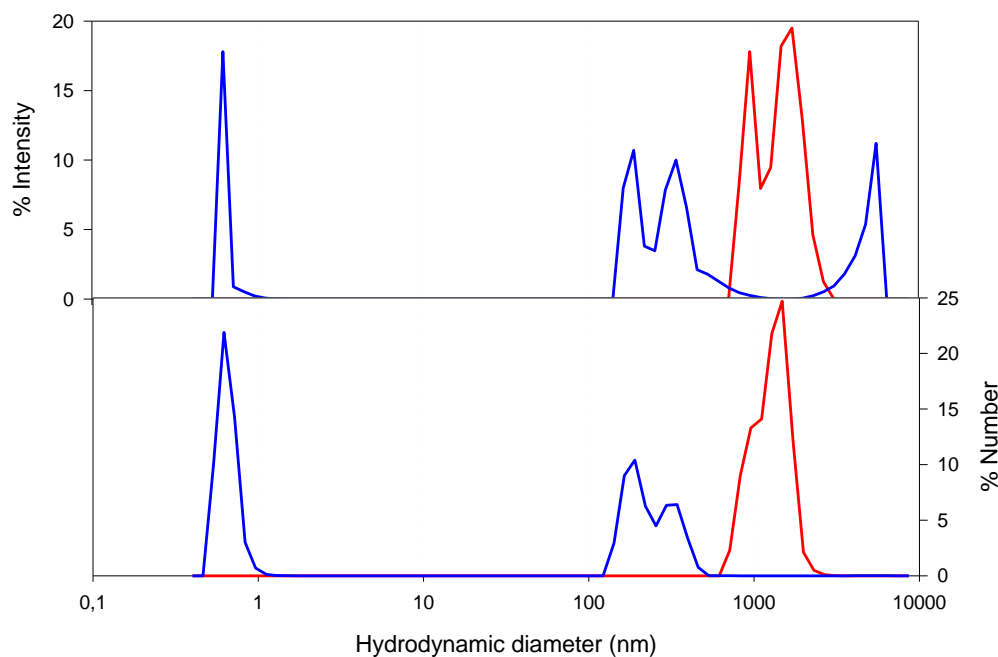


Figure III.3. Comparison of sizes with time of NC obtained by slow rate interaction. Curves represent the moment of synthesis (red) and two months later (blue).

Z potential analysis with time of nanocomposites synthesized by fast rate method revealed that the negative charge on the surface of the aggregates remained unchanged for two months after synthesis. Then, the Z potential decreased sharply, as can be seen in Table III-4, which represents the average of 6 measurements. This agrees with the aggregation of nanocomposites with time. When the Z potential of the nanocomposites decreased, the repulsive forces which kept the nanocomposites apart disappeared and, as a result, aggregation occurred.

Stability of nanocomposites as a function of temperature

For a deeper characterization of the nanocomposites, the stability was measured as a function of temperature using nanostructures synthesized with 1 mL of AuNP and 975.9 μL of CS solution 10^{-5} g/mL, which showed an initial hydrodynamic diameter of roughly 50 nm. These were exposed to different temperatures, either increasing (from 25 °C to 60 °C) or decreasing (from 60 to 25 °C). To carry out these experiments, the sample was introduced into the DLS device, which can set the temperature within a wide range of temperatures. After of exposing of the sample to the temperature for 3 minutes, four measurements were made.

As regards to the set of increasing temperatures, the plots of size distribution by intensity always point to a population centered in the range 30 - 50 nm, which have a representation of at least 90% in every case. Occasionally, another population is plotted in the micrometric range. However, these plots in the micrometric range were negligible (Figure III.5). Regarding the set of descending temperatures, as occurred in the set of ascending temperature, the nanocomposites did not change in size as a function of the temperature. The main population was still centered in the range from 30 to 50 nm

(Figure III.6). Size distribution by number revealed that particles of tens of nanometers appears when the temperatures start to decrease (at 50°C). The most feasible explanation is that this population corresponds to portions of free chains of CS, which probably interact with higher particles in the suspensions since they disappear when the temperature falls. As a result, we concluded that nanocomposites did not change their size because of the temperature, at least in the studied range of temperatures.

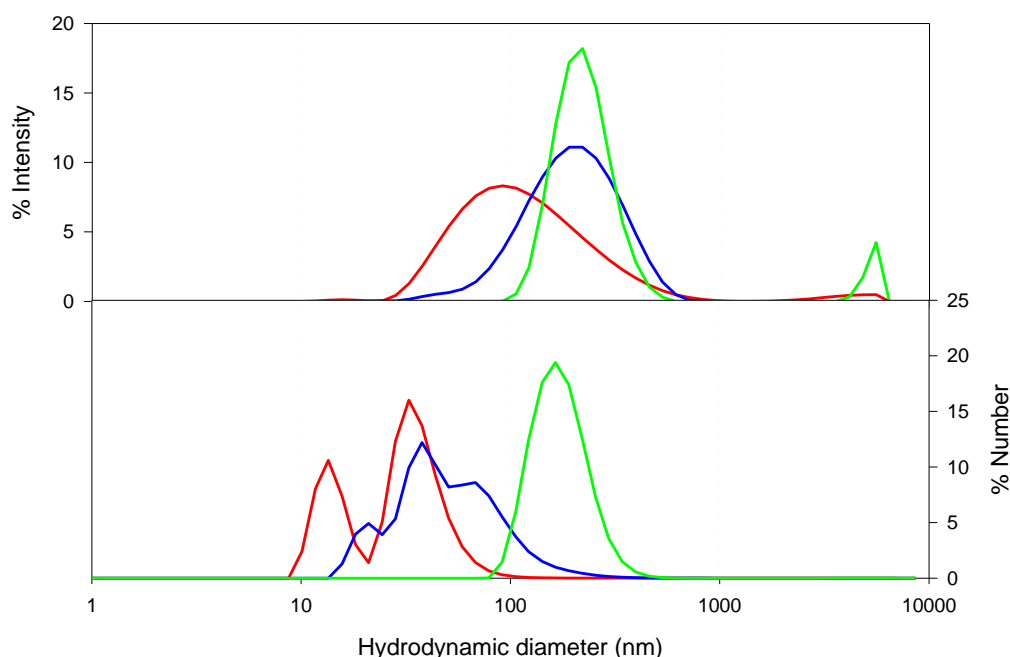


Figure III.4. . Comparison of sizes with time of NC obtained by fast rate interaction. Curves represent the moment of synthesis (red), and two (blue) and four (green) months later.

Table III-4. Z potential, electrophoretic mobility and conductivity of NC composed of AuNP and CS at different times post synthesis.

Time since synthesis	Z potencial		Electrophoretic mobility		Conductivity
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	
0	-24 ± 7	100	-1.9 ± 0.5	100	0.284
	-3 ± 2	0	-0.2 ± 0.1	0	
2	-24 ± 5	100	-1.9 ± 0.4	100	0.299
4	-8.8	99.6	-0.6 ± 0.7	99.6	0.291
	-107 ± 7	0.2	-8.4 ± 0.6	0.2	
	-84 ± 3	0.1	-6.6 ± 0.2	0.1	

Stability of nanocomposites in the face of system perturbances: sonication.

Ocasionalmente, the synthesis of NC yielded structures formed of AuNP and CS with a diameter greater than 300 nm (Figure III.7). Although these NC did not represent a substantial fraction of the sample, they were nevertheless present, and the Z potential was still negative (Table III-5). So, AuNP is probably located on the surface of the structures. UV-Vis spectroscopy analysis revealed a maximum of absorbance at around 558 nm (Figure III.8). All these data suggest that AuNP do not aggregate but attach

themselves to the surface of chitosan. The nanocomposites simply joined each other and, as a result, larger nanocomposites were found in the sample.

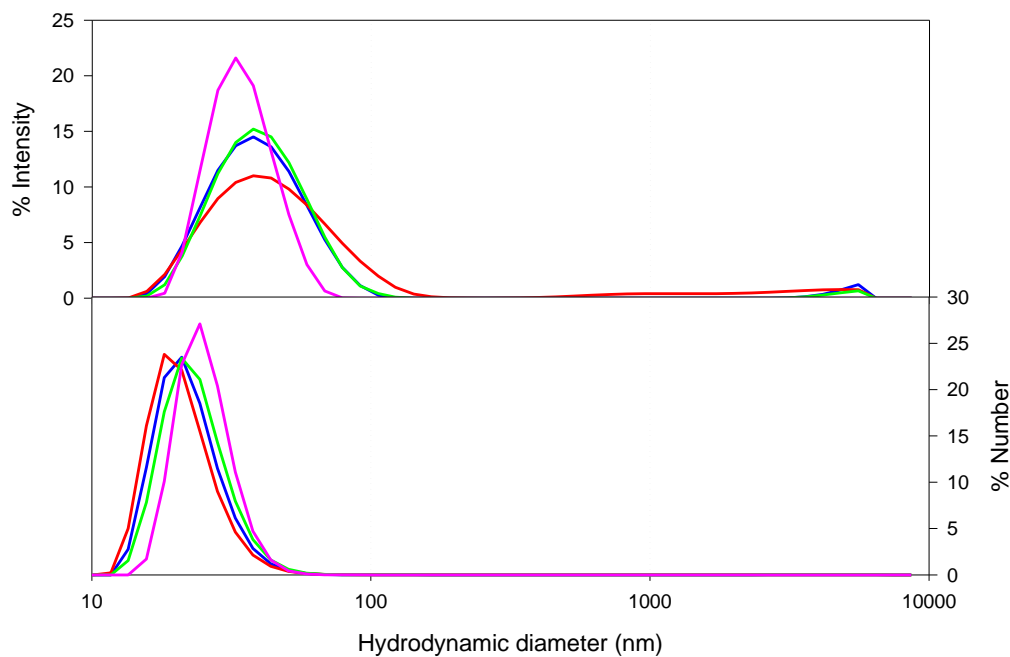


Figure III.5. Size distribution of NC composed of AuNP and CS exposed to a set of increased temperatures: 25 °C (blue), 40 °C (red), 50 °C (green), and 60 °C (pink).

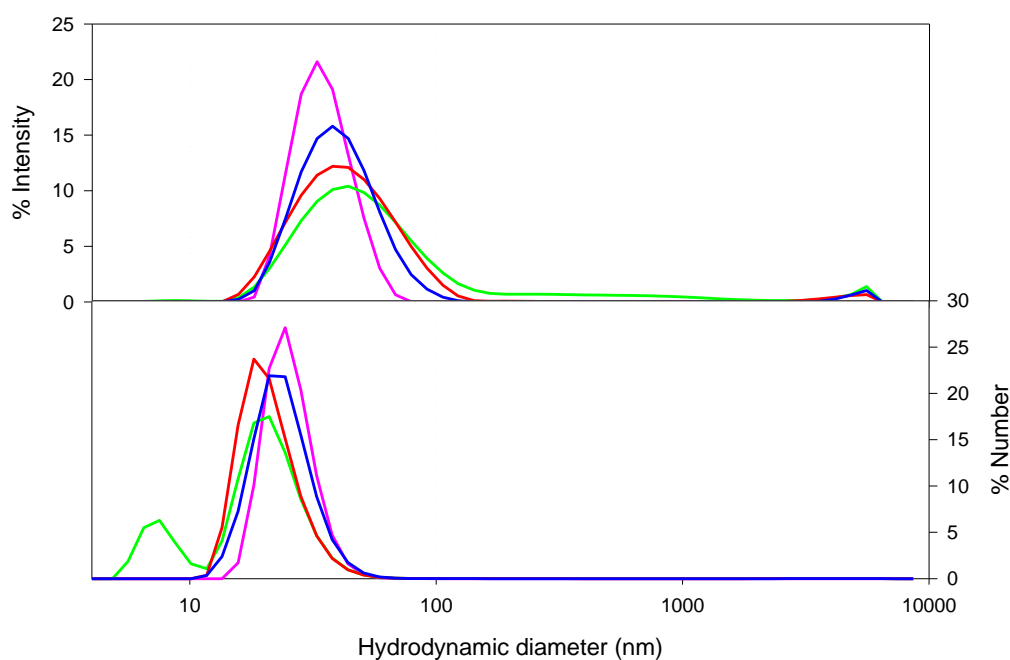


Figure III.6. Size distribution of NC composed of AuNP and CS exposed to a set of decreasing temperatures: 60 °C (pink), 50 °C (green), 40 °C (red), and 25 °C (blue).

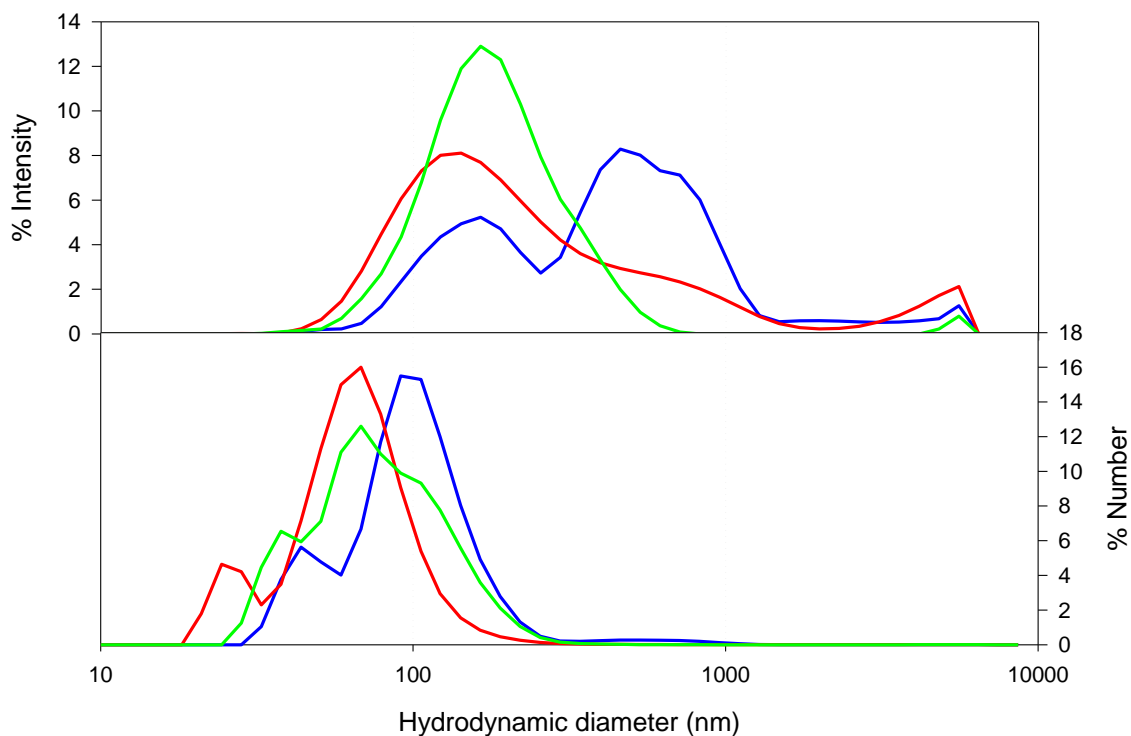


Figure III.7. Size distribution of NC composed of AuNP and CS before (blue) and after one (red) or two (green) cycles of sonication.

Table III-5. Z potential, electrophoretic mobility and conductivity of NC composed of AuNP and CS before and after being exposed to one or two cycles of sonication.

Number of cycles	Z potencial		Electrophoretic mobility		Conductivity
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	
0	-20 ± 3	100	-1.5 ± 0.3	100	0.287
1	-17 ± 4	100	-1.4 ± 0.3	100	0.316
2	-17 ± 3	100	-1.4 ± 0.3	100	0.299

Each sonication event was formed of 2 cycles of sonication lasting 30 seconds (30% intensity and 30 seconds between every cycle). After sonication, the nanocomposites become slightly smaller as can be appreciated from the intensity distribution of the DLS analysis (Figure III.7). UV-Vis spectroscopy analysis also revealed a shift in the maximum of the absorbance peak, which was now at 556 nm (Figure III.8). A second sonication event yielded a monodisperse population of nanocomposites with an average size of 150 nm. Of note is the fact that every distribution, intensity and number, showed a monodisperse population (Figure III.7). UV-Visible spectroscopy analysis shows a new shift in the maximum peak, which was now at 554 nm (Figure III.8). Z potential analysis revealed that the Z potential value of the nanocomposites did not change after being submitted to sonication, which indicates that AuNP remained on the surface of the nanostructures (Table III-5). These result show the structure was not affected by sonication, which apparently did not alter the union between AuNP and chitosan. Instead, sonication altered those interactions which kept NC together.

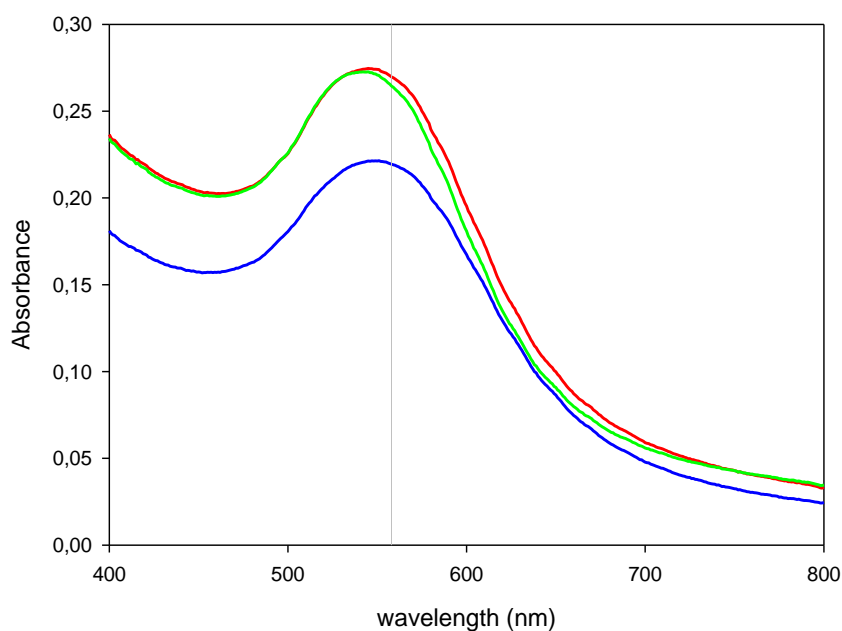


Figure III.8. UV-visible spectra of NC composed of AuNP and CS before (blue) and after one (red) or two (green) cycles of sonication. The vertical line represents $\lambda = 558$ nm.

Stability of nanocomposites in the face of system perturbances: lyophilization.

The nano-composites were lyophilized to check whether this technique could be considered an option for preserving them. Nanocomposites synthesized by a fast rate method showed an average size of 60 nm, a Z potential equal to -21 mV and a maximum absorbance peak at 542 nm before lyophilization. After lyophilizing, DLS analysis revealed that the structures in the nanometric range had disappeared and a population in the micrometric range could be observed, meaning that the nanocomposites had aggregated. However, the distribution by number revealed that in the sample the main population was centered at 170 nm, which indicates that nanocomposites had aggregated but kept a nanometric size. After the decrease in the Z potential after lyophilization seems to indicate that the nanocomposites had changed their structure so that more AuNP was on the surface of the nanostructure. Also UV-Vis spectroscopy analysis revealed a change in the structure, and the peak of absorbance shifted to 617 nm, revealing that AuNP had aggregated.

Table III-6. Z potential, electrophoretic mobility and conductivity of NC composed of AuNP and CS before and after lyophilization.

Liofilization	Z potencial		Electrophoretic mobility		Conductivity
	(mV)	%	($\mu\text{mcm/Vs}$)	%	
antes	-22±13	99.9	-1.7±1.0	99.9	0.271
	-82±2	0.1	-6.4±0.1	0.1	
	-96±3	0.0	-7.6±0.2	0.0	
después	-31±4	100	-2.4±0.4	100	0.496

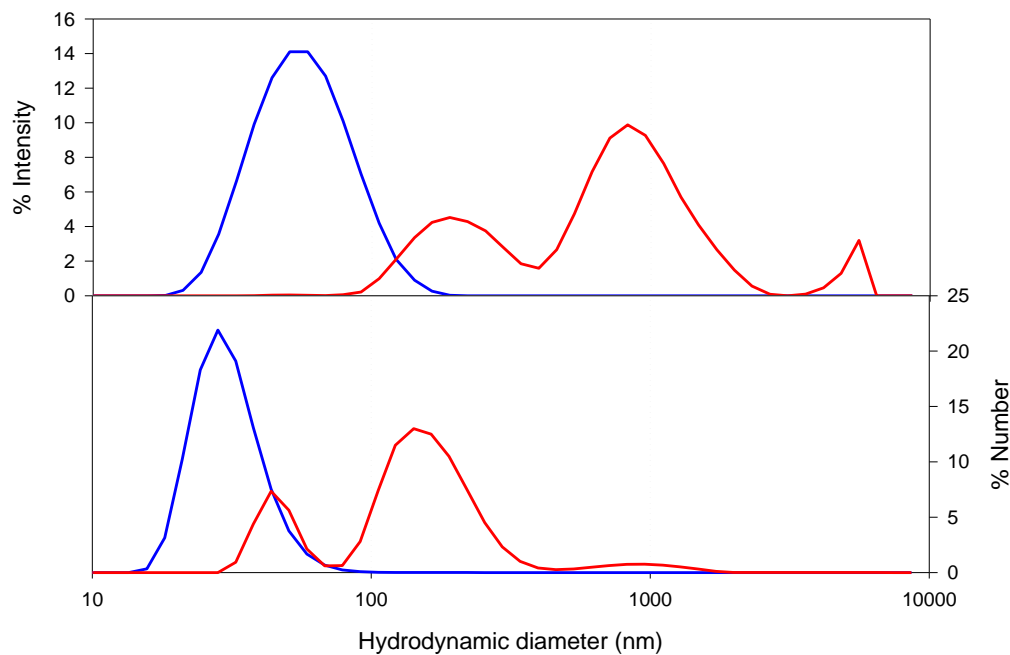


Figure III.9. Size distribution of NC composed of AuNP and CS before (blue) and after (red) lyofiltration.

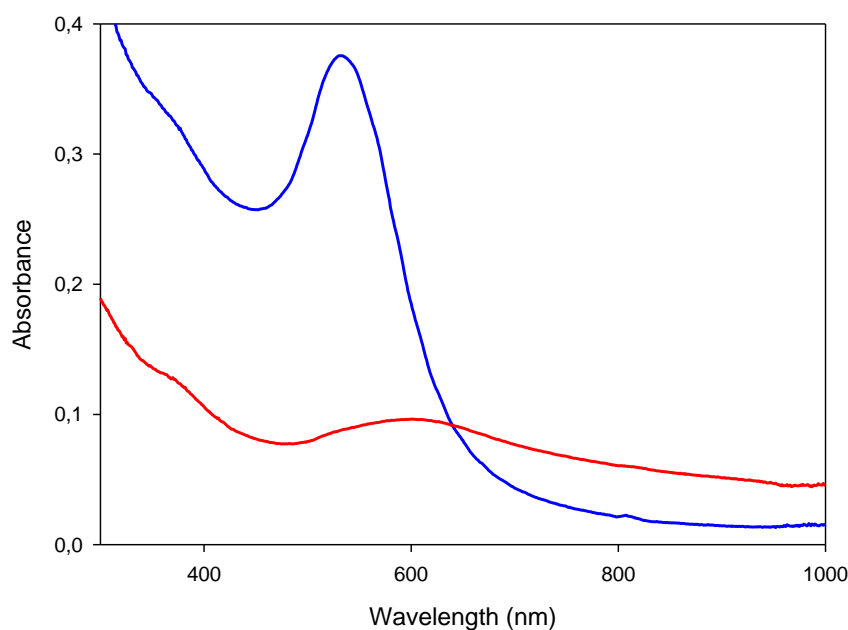


Figure III.10. UV-visible spectra of NC composed of AuNP and CS before (blue) and after (red) lyofiltration.

Conclusions

The main conclusion of this work is that a method to synthesize nanocomposites composed of AuNP and chitosan has been developed. This method is reproducible and also scalable, as we have confirmed in the above experiments. The nanocomposites synthesized by this method and kept refrigerated are stable, as checked over a period of

4 months. The stability of these nanocomposites was demonstrated over a wide range of temperatures (from 25 °C to 60 °C).

Moreover, we have tested the effect of sonication on the nanocomposites by exposing nanocomposites of a wide range of size (from 100 nm to 5000 nm), to sonication. As a result of sonication a monodisperse population centered at 150 nm was obtained, while the nanocomposites maintained the same Z potential value and the maximum of absorbance was still at the same wavelength as before sonication took place. These results reveal that sonication does not affect the structure of nano-composites, just their size.

In the last part of the work, we tested whether after lyophilizing nano-composites and dissolving them again, it was possible to obtain nanocomposites with the same properties as before lyophilizing. The results showed that the nanocomposites cannot resist lyophilization: AuNP aggregates, the Z potential of the nanocomposites decreases and the nanocomposites do not show the same size as they had before lyophilization.

Chapter IV: Chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles

Introduction

Nanomedicine, especially as regard the design of drug delivery systems, has seen significant progress in recent decades (Cho et al., 2006; Mottaghitalab et al., 2015). However, in many cases the problem arises that nanoparticles tend to aggregate upon exposure to biological media (Wang et al., 2015; Zakaria et al., 2013). To prevent this, chitosan has been proposed as stabilizing agent for both metallic (Leiva et al., 2015) and non metallic (Luo, Teng, Li, & Wang, 2015) nanoparticles. This will be the focus of this work.

Chitosan (CS) is a linear biopolymer with a complex behavior (Domard, 2011). Its biodegradability, biocompatibility, non-toxicity (Delmar & Bianco-Peled, 2015), and antibacterial activity (Raftery, Tierney, Curtin, Cryan, & O'Brien, 2015) are the reasons why micro and nanoparticles of Chitosan are used in several fields and applications (Leiva et al., 2015). Chitosan is a good option for stabilizing nanoparticles due to its polycationic nature (Raftery et al., 2015) and its conformation in solution (Christensen, Vold, & Vårum, 2008; Morris et al., 2009). Suspensions of some nanoparticles remain stable because of the electrostatic repulsion between negative charges on their surface of nanoparticles (Zhou, Ralston, Sedev, & Beattie, 2009). However, in a medium of high ionic strength, the charges on the surface of the nanoparticles are screened and aggregation occurs (Pamies et al., 2014; Zhao et al., 2015). In a previous work (Collado-González et al., 2015) we studied the aggregation process of gold-citrate nanoparticles in the presence of chitosan. Our hypothesis for this work is that chitosan is suitable to stabilize not only small metallic gold-citrate nanoparticles but also bigger silk fibroin nanoparticles, forming nanocomposites that could be used as nanocarriers for controlled drug delivery and that the characteristics of the final nanocomposites depend significantly on the proportion of chitosan used to obtain the nanoparticles.

Because of their physical, chemical and biological properties, silk Fibroin Nanoparticles (SFN) (see, for example Mottaghitalab et al., 2015) and Citrate-Gold Nanoparticles (AuNP) (see, for example Hu et al., 2015), are biodegradable and biocompatible materials, which can be processed into a range of structural forms. Stable suspensions in water of SFN can be achieved using different methodologies (Lozano-Pérez et al., 2015) Stable AuNP are usually obtained through reduction in a medium with citrate (Corzo Luzioni, 2012). In order to avoid aggregation, efforts have been made to synthesize chitosan-gold nanocomposites using either gold precursors (Jin et al., 2013) or gold nanocomposites (Collado-González et al., 2015; Prado-Gotor et al., 2014). In addition, some groups have studied structures composed of silk fibroin, which tend to self-assemble in different conditions (Vepari & Kaplan, 2007), and chitosan (Bhardwaj & Kundu, 2011; Wang et al., 2015) or chitosan derivatives (Wang et al., 2015). However, the literature contains no specific studies on the stabilizing role of chitosan on SFN.

The electrostatic interactions that occur between chitosan and citrate-gold nanoparticles have received attention previously (Huang & Yang, 2003). Regarding chitosan-SFN

nanocomposites, in this paper we include some computational modelling and calculations to try to understand at the atomic level which atoms are involved in the interactions. With the structural information that is available for the molecules of interest, computer simulation methods can provide useful predictions concerning the process of interest and can also aid in the interpretation and analysis of experimental data (Mackerell et al., 1998). Of the different potential molecular modeling methods available for the study of encapsulation, we used blind docking calculations, which consist of the computer simulation of the energies involved in the protein-ligand interactions (Sánchez-Linares, Pérez-Sánchez, Cecilia, & García, 2012). Among the results obtained by such simulations is informative on how many different chitosan molecules interact with SFN, which protein residues are involved, how these interactions are established (electrostatic, van der Waals, hydrogen bonds, hydrophobic, etc), and what the main protein-ligand interactions are (Navarro-Fernández et al., 2012).

Materials and methods

- Chitosan

Chitosan was obtained from Sigma-Aldrich (448877-250G). The molecular weight was in the order of 250000 Da and the degree of acetylation around 20% (data from the manufacturer). Chitosan solutions at $c=10^{-3}$ gcm⁻³ were prepared at pH set to 3.5 - 4 (glacial acetic acid from Panreac was used to adjust pH) stirring overnight. These solutions were later diluted (with water set at pH≈3.5-4) to obtain final concentrations equal to 10^{-4} gcm⁻³, 10^{-5} gcm⁻³, 10^{-6} gcm⁻³ and 10^{-7} gcm⁻³. In order to study the polymer's behavior as a function of the concentration, two different preparations of chitosan at pH 3.5–3.6 and concentrations of $c=10^{-3}$ gcm⁻³, $c=10^{-5}$ gcm⁻³, and $c=10^{-7}$ gcm⁻³ were analyzed.

The following method can be used to roughly calculate the number of chitosan molecules present in the different samples. Assuming a molecular weight of 250,000 g/mol, on average, each molecule will weigh $4,2 \times 10^{-19}$ g. When $c=0,001$ g/cm³, these will be $2,4 \times 10^{15}$ molecules of chitosan in each cm³.

- Gold nanoparticles

Gold nanoparticles coated by a negatively charged citrate layer were obtained from Ted Pella, Inc. (Redding, CA) in the form of a suspension in water and with a content of 5.7×10^{12} particles/cm³. We confirmed that the hydrodynamic diameter was 13 nm (nominal value 10 nm).

- Silk fibroin nanoparticles

To obtain SFNs, silk fibroin was dissolved in ionic liquids and submitted to high-power ultrasounds (Lozano-Pérez et al., 2015). A suspension was prepared with freeze-dried SFN at a final concentration equal to 10^{-4} g/cm³ and subjected to pulsating

ultrasonication of 15" steps at 30% amplitude for a total time of 3 minutes in a Sonifier Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, USA). These colloidal suspensions of SFNs remained stable in water for approximately 3 months before aggregation occurred.

- Chitosan-gold nanocomposites

These nanocomposites were prepared mixing chitosan and citrate gold nanoparticles at different proportions at pH = 4. To facilitate the analysis of the results, the composition of each sample is expressed as particles of gold per molecules of chitosan in the sample. As 0.5 cm³ of AuNP suspension was added in all preparations, the final content of AuNP was 2.85x10¹² nanoparticles per sample. Prado-Gotor et al. (Prado-Gotor, López-Pérez, Martín, Cabrera-Escribano, & Franconetti, 2014) calculated that the mean number of Au atoms in a spherical gold nanoparticle of 10 nm of diameter is 30687. Thus, taking into account the atomic weight of gold, every sample contained 2.88x10⁻⁵ g of gold. Then, a mixture of 0.5 cm³ of AuNP and 1 cm³ of CS 0.001 g/cm³ can be roughly described as a proportion of 3x10⁻²:1 (in weight) or 1:10³ (in number of particles) of AuNP:CS. We chose the second option, and with this, AuNP:CS samples of 1:10³, 1:10², 1:10 and 1:1 were prepared.

- Chitosan-silk fibroin nanocomposites

These nanocomposites were prepared mixing chitosan and SFN at different proportions at pH=4. The amount of SFN in the sample was fixed at 10⁻⁴ g and the prepared proportions were CS:SFN 1:0.4, 1:0.8, 1:1.6, 1:3.2, 1:6.35, 1:12.7, 1:25.4, 1:50.8, 1:203, and 1:813 mg:mg (in weight).

- Ionic strength

To evaluate the effect of the ionic strength of the medium, different concentration of KNO₃ (from Probus, S.A) were used. MilliQ water was used in all preparations.

- Size and z potential measurements

Hydrodynamic size was measured by Dynamic Light Scattering using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) at 25°C and a 173° angle relative to the source. The incorporated software calculates the hydrodynamic diameter distribution from the time autocorrelation function of the scattering intensity fluctuations. For chitosan solutions, to improve reproducibility, each assay was composed of 300 measurements (5 runs of 20 seconds each with no delay between measurements). For CS-AuNP and CS-SFN each assay was composed of 3 measurements (10 runs of 10 s) and took 5-8 min, what means that t = 0 is equivalent to this time. Later, two more results were obtained at t≈1.5 hours and t≈24 hours. Each curve in a plot represents the average of all performed measurements. For nanocomposites, a first control measurement was made to a suspension of nanoparticles (AuNP or SFN) followed by a second measurement when chitosan solution was added that was as time 0 in salt-free

suspensions. In samples in which the ionic strength was increased, a third measurement was carried out when KNO_3 was added, taking the third measurement as time 0. This protocol was confirmed as giving very reproducible results.

In this work, we have included distribution by intensity and by number. The Malvern software (included in the apparatus) provided the size distribution by number from the primary distribution by intensity assuming, in addition to the sphericity and homogeneity of particles and the accuracy of the distribution by intensity, the precise knowledge of the actual refractive index of the particles (we have checked that the influence of this factor is very small for our system). Thus, the distribution by intensity must be considered in order to characterize particle size whereas distribution by number is suitable for estimating relative populations of the particles when comparing results from different conditions.

The zeta potential, ζ , was also measured with the same apparatus. Each assay consisted of 6 measurements in an automated way.

- Blind docking calculations

For the blind docking calculations, a representative protein X-ray crystal structure for silk fibroin was chosen at the Protein Data Bank (PDB) database with PDB identifier 3UA0. The full-atom model of the protein used in this study was prepared from the raw PDB structure 3UA0 by removing water molecules, adding hydrogen atoms, assigning the ionization states of the amino acids by using Protonate3D function of the MOE software package and by calculating atomic partial charges using the AMBER99 forcefield (Wang et al., 2015) implemented in MOE.

For chitosan, the model consisting of a carbohydrate nonamer previously developed by Cunha et al., 2012 was used.

The docking of chitosan to the prepared protein structure model of silk fibroin and the detailed binding energy calculations were performed with the Autodock Vina docking software (Trott & Olson, 2010) using default configuration parameters. The size of the grid box for ligand docking was set to extend 120 Å in each direction from the geometric center of each individual docking simulation. The docking score produced by Autodock Vina was taken as the predicted value of the ligand binding energy. Only the top-ranked poses were used for structural and energy analyses. Scoring function from Vina considers Lennard-Jones term (LJ), hydrogen bonds (H-bonds), electrostatic interactions, hydrophobic stabilization, entropic penalty due to number of rotatable bonds, and internal energy of the ligand. We performed a blind docking approach (Navarro-Fernández et al., 2012) where multiple docking runs started around geometric centres of all residues within the selected threshold. A histogram with the resulting distribution of binding energies and their structural clusters of poses is generated.

Results and discussion

Chitosan behavior

The behaviour of chitosan in solution was studied in a previous work of our group (Collado-González et al., 2015), where it was seen that the distribution of sizes of chitosan and its structures at final concentration of 10^{-3} gcm^{-3} and at pH=4 spanned from 80 nm to 8000 nm. In this work the pH were fixed at pH=3.5-3.6 with similar results. The chitosan concentration used was about the critical overlap concentration, $c^*=0.0008 \text{ g/cm}^3$, for our CS solution (Cho et al., 2006; Morariu et al., 2012) and can be considered as non-dilute solution. Thus, the CS chains form aggregates of various sizes, whose characteristics will depend on both the CS intrinsic features and the environmental conditions (Korchagina & Philippova, 2010; Popa-Nita et al., 2010; Schatz, Lucas, et al., 2004). Since dilution of the chitosan solution was expected to decrease the tendency to entangle, we used final concentrations equal to 10^{-5} gcm^{-3} and 10^{-7} gcm^{-3} . As can be seen in the Figure IV.1, when solutions are diluted to values of 10^{-5} gcm^{-3} or lower, aggregates larger than 1000 nm do not appear. In fact, when the chitosan concentration decreased, the size of the aggregates was also found to decrease. Indeed most molecules of chitosan were found on their own or in very small aggregates (diameter lower than 100 nm) and only a small portion were observed forming entanglements of a few hundreds of nanometers.

In order to study the behavior of chitosan in a medium with high ionic force, the ionic strength was set at 0.15 M or 0.25 M. As we observed in a previous work using a different concentration (Collado-González et al., 2015), the presence of salt (0.15 M and 0.25 M gave the same results) decreases the hydrodynamic size of chitosan molecules and also decreases their tendency to form aggregates. From the data in the literature (Morris et al., 2009) we calculated (Collado-González et al., 2015) the expected hydrodynamic diameter of our free chitosan chains in solution with similar features and dissolved in similar saline conditions as ours, obtaining a range from 50-80 nm. Therefore, the peak shown in Figure IV.2 at 80 nm in diluted conditions (10^{-7} g/cm^3) was most probably due to free chitosan chains. Additionally, the disentanglement of chitosan aggregates can be appreciated in a clear way in the distribution by number. In this plot, it can be seen that in conditions of high ionic strength aggregates greater than 100 nm are considerably reduced in number.

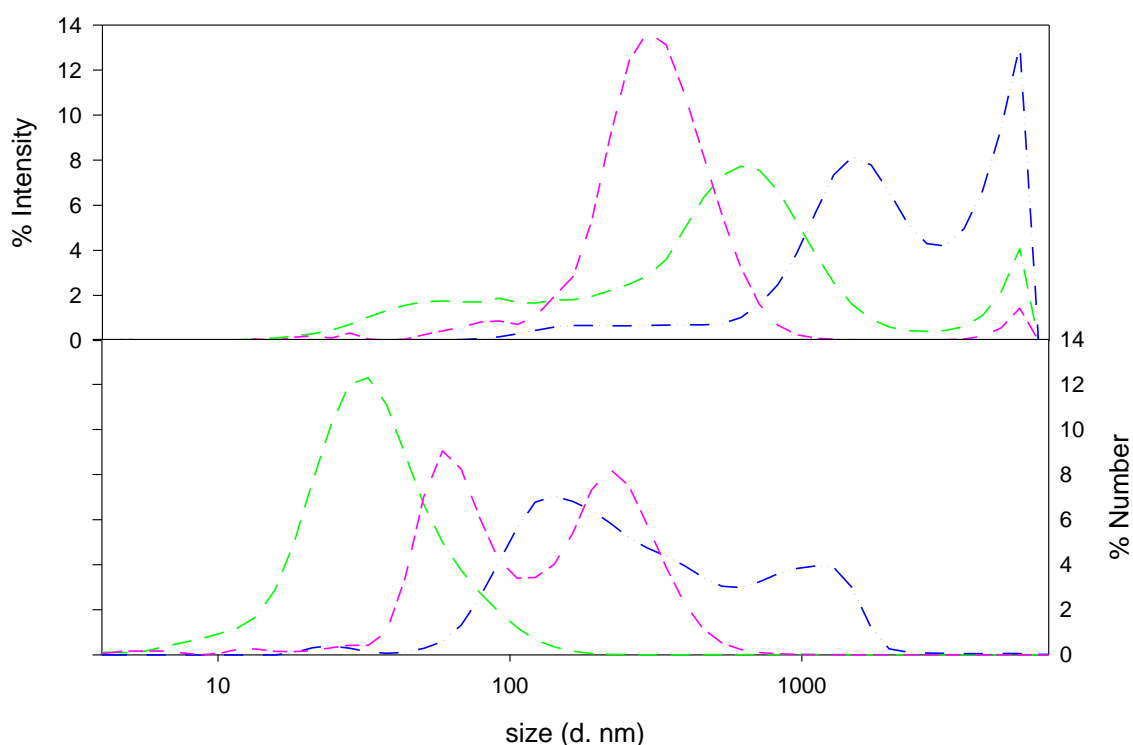


Figure IV.1. Comparison sizes of particles in solutions of chitosan at different concentration with ionic force equals to 0 M. Chitosan at concentration equal to 10^{-3} g/cm³ (blue dash dot dot line), 10^{-5} g/cm³ (green dash dot line), 10^{-7} g/cm³ (pink three short dashes line).

Our results fit well with the idea that in non-diluted conditions (10^{-3} gcm⁻³), the probability of entanglement among polymer chains increases because of the number of molecules and their expanded conformation. At low concentrations, the number of chitosan molecules interacting decreases, and when the ionic force of the solution increases, repulsive forces between the positive internal charges on the chains decrease and the hydrodynamic size of the particles is reduced. In this case there is an increase in free chitosan chains. Taking together this results can be considered relevant for the preparation of nanocomposites based on chitosan.

Chitosan and Citrate-Gold Nanoparticles

Citrate-gold nanoparticles (AuNP) tend to aggregate when the ionic strength of the medium increases. However, in a previous work (Collado-González et al., 2015), it was demonstrated that AuNP and chitosan interact and as a result nanocomposites are formed, showing the role of chitosan in preventing nanoparticle aggregation in conditions of high ionic strength. In the present study, we wanted to find the best proportion AuNP:CS ratio to prevent AuNP aggregation and provide the smallest nanocomposites.

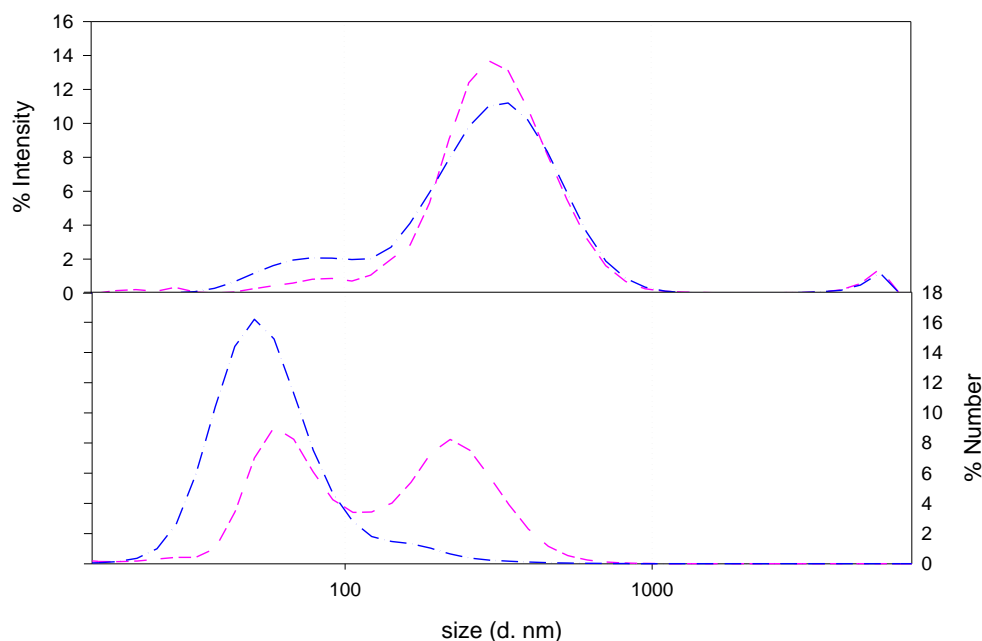


Figure IV.2. Comparison of sized of particles present in solutions of chitosan at 10^{-7} g/cm^3 at different ionic forces either 0 M (pink three short dashes line) or 0.15 M (blue dash dot line).

The nanocomposites obtained varied widely in size depending on the AuNP:CS ratio and salt conditions (Figures IV.3 and IV.4). A careful look at these results shows two extreme situations. For a AuNP:CS proportion $1:10^3$ (with CS concentration in the order of 10^{-3} gcm^{-3}), three stable populations of nanocomposites could be distinguished in the intensity plot. Before the addition of salt, the largest sizes (300 nm and more, even microstructures) were above the desirable value. Some of the nanoparticles obtained had a size in the order of 50 nm. Although it might be seen surprising, the number plot indicated that for both populations, the number of particles was low compared with the small structures in the order of 20 nm. The situation changed drastically when salt was added and only two populations were detected. The bigger one is shown by a peak that becomes narrower around 200 nm and the second centered around 20 nm. This behavior resembles that observed previously in similar conditions (Collado-González et al., 2015) and compatible with the idea that, at this concentration, some of chitosan molecules, probably the longest ones, tends to be entangled and the presence of salt and AuNP decreases the hydrodynamic size of aggregates and individual molecules of chitosan and nanocomposites.

At the other extreme we may look the sample with lowest proportion of chitosan (AuNP:CS 1:1, CS concentration comparable with 10^{-7}). When no salt is added, very few big nanocomposites are obtained (see intensity plot, Figure IV.3) and a quasi single broad peak around 30 nm is observed. Most (in number) nanoparticles formed have the same size than the smallest of AuNP:CS $1:10^3$. But in this case, the nanocomposites obtained were not stable and a strong and very fast aggregation and sedimentation occurs (Figure IV.4). Thus, the hypothesis concerning the lack of polymer to prevent the AuNP nanoparticle aggregation was reinforced.

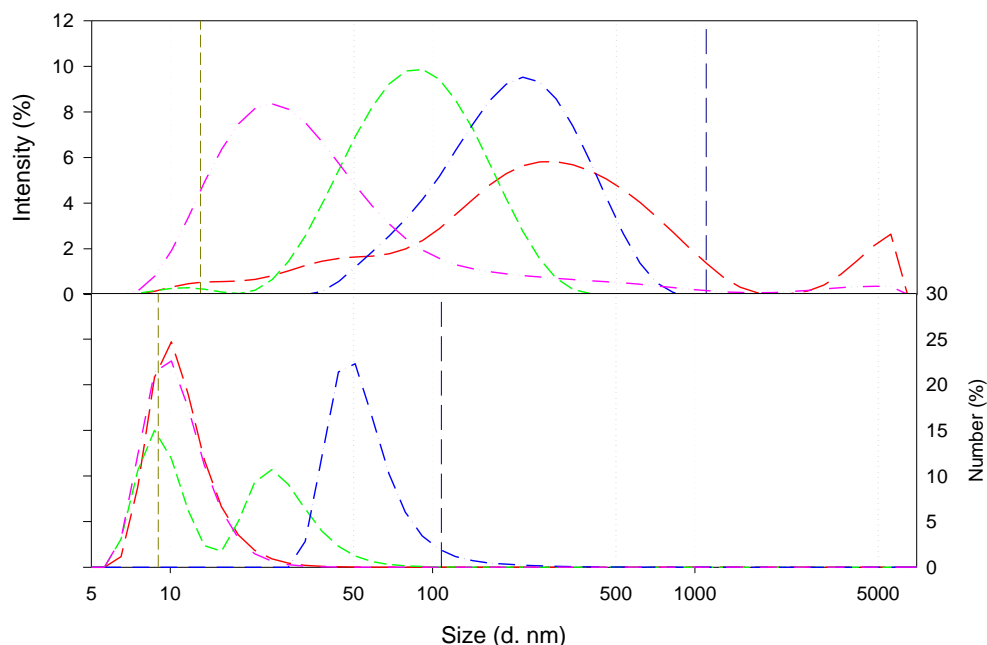


Figure IV.3. Comparison of sizes of nanocomposites obtained in different proportion samples when no salt was added to the medium. The different proportions represented are AuNP:CS 1:10³ (red long dashed line), AuNP:CS 1:10² (green short dashed line), AuNP:CS 1:10 (blue dash-dot line), AuNP:CS 1:1 (pink dash dot dot line). As a control of size, vertical dark blue long dash line represents the maximum in the distribution of chitosan (before added to AuNP) and vertical dark yellow short dash line represents the maximum in the distribution of AuNP (before added to CS).

Samples containing amounts of chitosan between those mentioned in the above paragraphs showed an intermediate behavior. Samples with a proportion of 1:10² formed two populations of nanocomposites that became a single one with most of structures below 100 nm, although an asymmetric peak in the intensity plot showed that a few bigger structures are also present. The most interesting are the nanocomposites of the sample AuNP:CS 1:10, which showed a single and relatively narrow distribution in all conditions. Size of these nanocomposites changed from 230 nm in salt-free suspension to 130 nm when salt was added.

Z potential allows us to know the structure of the nanocomposites in terms of the distribution and balance of superficial charges. For nanocomposites composed of AuNP and chitosan, values changed from +32 mV for AuNP:CS 1:10² to -25 mV for AuNP:CS. The reason of these values must be the amount of AuNP bound on the surface of chitosan, aggregates becoming more negative when the proportion of AuNP increased.

In brief, we already knew that chitosan (in moderate concentrations) interacts with gold nanoparticles to give nanocomposites (with a positive Z potential) that remain stable when the ionic strength increased (Collado-González et al., 2015). Now we have shown that a proportion gold nanoparticles:chitosan 1:10 yielded well defined (in size) nanocomposites with negative Z potential which are stable at high ionic strength. We must point out that the responsible of this colloidal stability cannot be only the electrostatic repulsion. We have already shown for AuNP that, at this ionic strength,

charges are screened and aggregation is produced (Pamies et al., 2014). On the other hand, at this ionic strength, chitosan remained soluble and no big aggregates were formed. Then, it is plausible to think in the supporting chitosan skeleton as the responsible of the lyophilic character of the AuNP:CS nanocomposites.

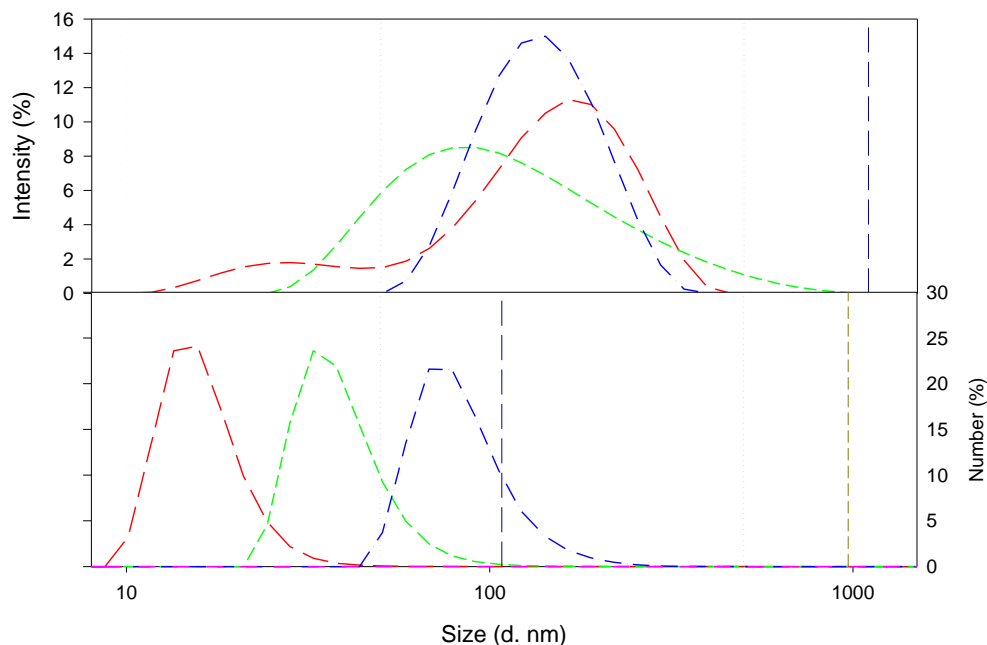


Figure IV.4. Comparison sizes of nanocomposites exposed to 0.15 M for 24 hours. The measurements were carried out 24 hours after adding the salt. Samples were kept on fridge over night. The different proportions represented are AuNP:CS 1:10³ (red long dashed line), AuNP:CS 1:10² (green short dashed line), AuNP:CS 1:10 (blue dash-dot line), AuNP:CS 1:1 (pink dash dot dot line, not observable). As a control of size, vertical dark blue long dash line represents the maximum in the distribution of chitosan and vertical dark yellow short dash line represents the maximum in the distribution of AuNP.

Chitosan-Silk Fibroin Nanocomposites

We studied nanocomposites formed by mixing different proportions of chitosan and silk fibroin in water. We found a range of ratios CS:SFN (roughly between 1:50.8 and 1:1.6) in which nearly all particle initially present are forming nanocomposites with a size around 200 nm (Figure IV.5) which is just slightly larger than the size of SFNs. All these nanocomposites were stable in water at least 24 hours.

Results obtained from Blind docking calculations provide details about how chitosan interacts with SFN by means of different types of intermolecular interactions. We can observe that a maximum of 5 “molecules” of chitosan (we must remember that our model is a nonamer) can bind over SFN, and that a maximum difference of 4 units in the scoring function values between the top and lowest poses is obtained. This suggests that there is a preferred part of docking of chitosan in the SFN monomer model. Moreover, a good steric fit between the five predicted clusters of poses and the protein is obtained, as shown in Figure IV.6. This steric fit is mainly due to electrostatic interactions, as shown by blue and green bars in Figures IV.7 and IV.8.

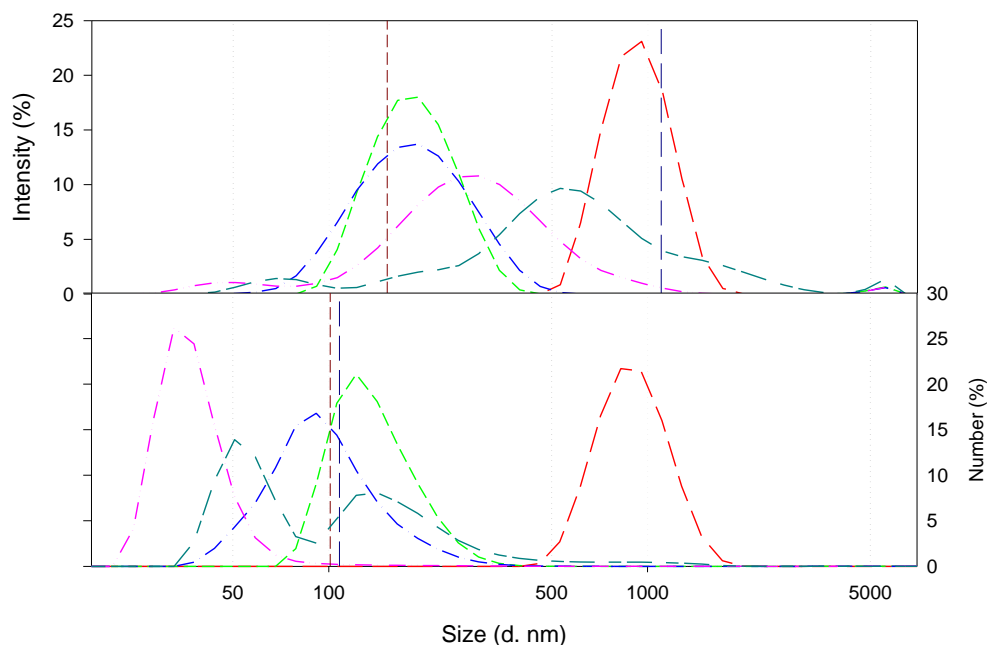


Figure IV.5. Comparison of size of nanocomposites composed of different proportion of chitosan and SFN when the ionic strength of the medium was no increased. The different proportions represented are CS:SFN 1:203 mg:mg (red long dash line), CS:SFN 1:50.8 mg:mg (green short dash line), CS:SFN 1:12.7 mg:mg (blue dash dot line), CS:SFN 1:1.6 mg:mg (pink dash dot dot line) and CS:SFN 1:0.4 mg:mg (dark cyan short long dashes line). Vertical dark blue long dash line represents the maximum in the distribution of chitosan and vertical red short dash line represents the maximum in the distribution of SFN.

If we take into account the size of the nanocomposites, the values of Z potential and blind docking calculations, we find that the most feasible explanation is that the SFN are inside of the structures formed and the chitosan is surrounding the nanoparticles interacting with the negatively charged areas of the SFN. This idea fits very well with a structure like that showed by Wang et al., (2015). In addition, it seems that for higher proportions of SFN, the CS molecules could act as bridges between SFN particles forming structures in the range of microns (Figure IV.5). Moreover, when chitosan proportion is very low (CS:SFN 1:813 mg:mg), nanocomposites still have negative Z potential or low positive Z potential (CS:SFN 1:203 mg:mg). It seems that due to the small amount of CS in the sample, this polymer cannot coat completely SFN and, as a consequence, the electrostatic repulsion forces are not sufficiently strong to prevent the formation of large aggregates even in water. On the other hand, when the amount of SFN in the mixture was lower than a ratio 1:0.4, the characteristics of the sample were similar to those of a chitosan solution. Between them, we found (Figure IV.5) the distribution for the CS:SFN ratio 1:12.7, with a maximum around 190 nm.

In addition to electrostatic interactions between chitosan and the protein, the stabilizing binding interaction is due to a network of hydrogen bonds (pink bars in Figure IV.7). The fact that the SFN monomer can interact with a certain number (5 in our model) of chitosan molecules implies that variations in the concentration of chitosan could affect the stabilization process of SFN, as observed experimentally in this work.

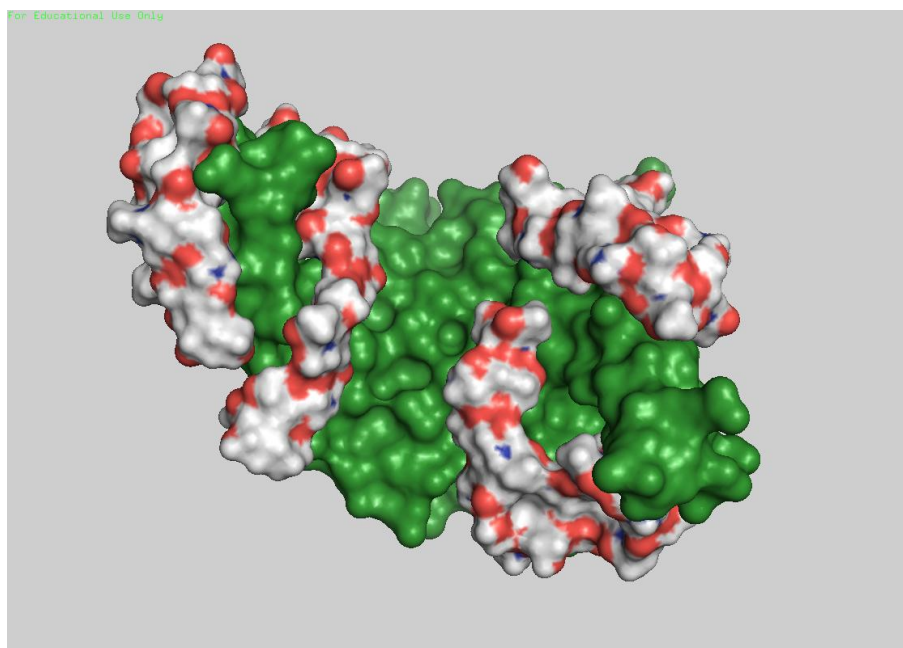


Figure IV.6. Surface representation of detected interactions areas between SFN (green color) and chitosan (white color for carbon skeleton) by the blind docking method.

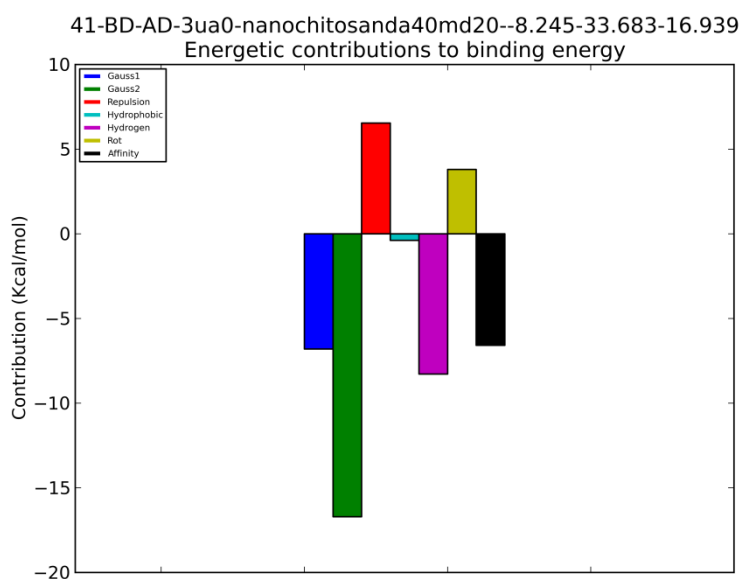


Figure IV.7. Energetic analysis of the top chitosan pose docked to SFN monomer model. Representation of the values of the different energetic contributions to the predicted binding energy (kcal/mol) where depicted energetic contributions are; electrostatic interaction types Gauss1 and Gauss2 (blue and red color), repulsion forces (red color), hydrophobic interactions (light blue), hydrogen bonds (pink color), entropic contribution (yellow color) and total predicted binding energy (black).

Silk fibroin nanoparticles are not stable when ionic strength of the dispersion is increased. In this work, we performed experiments to assess the stabilizing effect of the chitosan on the SFN when salt is added to the medium. A previous paper studied the stabilizing effect of glycol chitosan (Wang et al., 2015), soluble at neutral pH, in nanocomposites very similar to ours. We used a different and complementary approach and we estimated the minimum ionic strength at which SFN showed a slow but strong aggregation. In order to study the effect of different ratios CS:SFN to prevent

aggregation, we chose $I = 0.024$ M. We checked that higher values induced very fast aggregation.

After mixing chitosan and silk fibroin nanoparticles it was seen that, when the amount of chitosan in the sample was equal to or lower than the proportion CS:SFN 1:50.8 mg:mg, aggregation was observed even at short times. But, for ratios in the range 1:25.4 to 1:1.6 the structures had a size in the order of 200 – 300 nm a few minutes after mixing.

After 24 h since the addition of the salt, the sample which contains chitosan and SFN in a proportion of 1:25.4 mg:mg formed microcomposites. The amount of chitosan was not sufficient to prevent the slow aggregation of the SFN at this ionic strength. But samples containing proportions CS:SFN ranging from 1:12.7 mg:mg to 1:1.6 mg:mg did not aggregate, yielded populations of a few hundred nanometers. Besides, the standard deviation of these populations was small. The most interesting cases were CS:SFN 1:6.35 mg:mg with a peak in the intensity distribution at 315 ± 34 nm of hydrodynamic diameter and CS:SFN 1:12.7 mg:mg with a peak at 344 ± 72 nm. In both cases the homogeneity of these nanocomposites was bigger than the rest of the samples. These nanocomposites aggregated very fast when ionic strength was 0.15 M.

At CS:SFN proportions of 1:0.4 mg:mg and lower, a peak in the range of few nanometers was observed. A plausible explanation could be that when chitosan is in excess, longer chains of chitosan interact with sild, while some of the shorter chains remain free.

In a previous work (Wang et al., 2015) glycol chitosan (GCS) was used to stabilize silk fibroin nanoparticles in water and physiological liquids. Although the concentrations and proportions GCS:SFN were similar to those used in this work, their nanocomposites did not aggregate in high ionic strength conditions. We have shown that the main interaction between chitosan and fibroin was electrostatic and that CS:SFN nanocomposites were stable at $I = 0.024$ M but not at physiological ionic strength. It must be concluded therefore that the glycol group was responsible for preventing the aggregation of the nanocomposites. A plausible explanation is that this group was able to transform a lyophobic colloid into a lyophilic colloid. The stability of lyophilic colloids is not be significantly affected by the screening effect of the ions in a medium with high ionic strength.

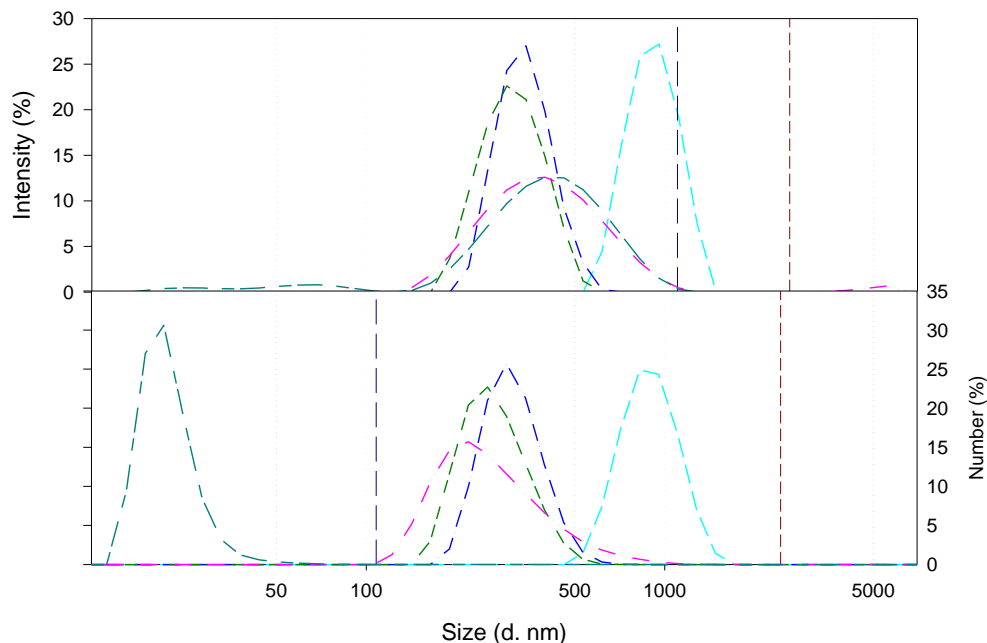


Figure IV.8. Comparison of the nanocomposites in samples composed of chitosan and silk fibroin nanoparticles in different proportions exposed at ionic strength equal to 0.024 M for 24 hours. The different proportions represented are CS:SFN 1:25.4 mg:mg (cyan long dashed line), CS:SFN 1:12.7 mg:mg (blue dash dot line), CS:SFN 1:6.35 mg:mg (dark green short short short line) CS:SFN 1:1.6 mg:mg (pink dash dot dot line) and CS:SFN 1:0.4 mg:mg (dark cyan short long dashes line). Vertical dark blue long dash line represents the maximum in the distribution of chitosan and vertical red short dash line represents the maximum in the distribution of SFN.

Conclusions

The role of chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles is clear, since the polymer prevents the aggregation which takes place when the ionic strength of the medium is increased. In this work we have shown that the proportion of the two components (chitosan and AuNP or SFN) and the concentration of chitosan have a significant influence on the nanocomposites obtained. In both cases an optimum value is proposed to obtain the smallest and most homogeneous stable nanocomposites.

Our results show two different ways in which this might occur: (i) chitosan acts as a structure in whose surface negatively charged small gold nanoparticles are immobilized, and (ii) the chitosan molecules surround the silk fibroin nanoparticles mainly through electrostatic interactions at well defined sites. In this case, the stabilizing effect of chitosan is limited by the screening effect of salt ions, which decrease the effect of repulsive electrostatic forces. The use of chitosan derivatives could overcome this constraint, transforming the lyophobic character of the colloidal particle into lyophilic.

Chapter V: Key role of chitosan in size of complex polysaccharide nanocomposites

Introduction

The inability to synthesize insulin is the sixth most common cause of death in the world (Sonia & Sharma, 2012). Surprisingly, only 20% of subcutaneously administered insulin reaches its target (Fonte et al., 2015) and oral bioavailability of insulin is even lower, 1-2% (Chen, Sonaje, Chen, & Sung, 2011). Thus, the development of a drug delivery system which protects insulin from the acidic environment of the digestive system and enzymatic degradation, while enhancing uptake by the intestinal cells is a much sought goal (Sonia & Sharma, 2012).

Biopolymers have gained much attention for the development of drug delivery systems. For that purpose, Woitiski, Veiga, Ribeiro & Neufeld (2009) reported the synthesis of nanocomposites composed of chitosan (CS), alginate (ALG), dextran sulfate (DS), Poloxamer 188[®], poly (ethylene glycol) (PEG) 4000 and bovine serum albumin (BSA) for the delivery of insulin (Woitiski, Veiga, Ribeiro, & Neufeld, 2009). Woitiski's method, which could be considered our reference, yielded nanocomposites with a hydrodynamic diameter of around 300 nm. However, after a few hours, nanocomposites in water aggregated and the vast majority of the particles were of micrometric and even millimetric size. As a consequence, improvement of the stability is needed.

Several attempts have been done using chitosan and other polyanions, such as CS-ALG (Mukhopadhyay, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu, 2015), CS-DS (Chaiyasan, Srinivas, & Tiyaboonchai, 2013), or CS-Poloxamer[®] (Calvo, Remuñán-López, Vila-Jato, & Alonso, 1997). Typically, these systems were of nanometric size; however, their zeta potential (ζ) ranged in values included in the instability region. In water, polyelectrolyte nanocomposites with ζ between -20 mV and 20 mV tend to self-aggregate due to the disappearance of repulsive electrostatic forces.

The characteristics of nanostructures depend on their components. Thus, CS has been used in oral delivery due to its biocompatibility, biodegradability and mucoadhesiveness (Mukhopadhyay, Mishra, Rana, & Kundu, 2012). CS is a linear polycationic polysaccharide which consists of glucosamine residues linked to N-acetyl-glucosamine (Aranaz et al., 2009), with a pKa of 6.5 (Chen et al., 2011). CS can yield nanocomposites when interacting with polyanions (Fonte, Araújo, Reis, & Sarmiento, 2013). ALG is a linear polyanionic polysaccharide composed of mannuronic acid residues (M) which are linked by β -1-4 linkage to guluronic acid residues (G). ALG has been used to develop nanoparticles due to its capacity of gelation. Besides, ALG favors the loading of insulin in CS-based nanoparticles, resists the acidic pH of the stomach and swells in the intestinal pH (Fonte et al., 2015; Goycoolea, Lollo, Remuñán-López, Quaglia, & Alonso, 2009). DS is a branched polyanion polysaccharide consisting of glucose residues which interacts electrostatically with CS (Chaiyasan et al., 2013; Schatz, Domard, Viton, Pichot, & Delair, 2004). Poloxamer[®] 188 is an amphiphilic molecule which is incorporated in gels through hydrogen bonds (Calvo et al., 1997), stabilizing the gels sterically by reducing the aggregation (Woitiski et al., 2009).

Poly(ethyleneglycol) (PEG) 4000 acts by stabilizing the nanocarrier system and enhancing the penetration of nanoparticles through the mucus layer of the intestine (Chen et al., 2011). BSA is a protein which prevents aggregation and protects protein loaded in nanostructures from acidic and enzymatic degradation (Woitiski et al., 2009).

In search of improving stability of this kind of nanocomposites, our hypothesis is based on the results of our previous work, where we achieved the stabilization of gold nanoparticles and silk fibroin nanoparticles by using chitosan (Collado-González et al., 2015, 2017a). In those works we demonstrated the key role of chitosan in stabilizing negatively charged nanoparticles and also showed that the size of the nanocomposites depended on the proportion of chitosan. Then, we postulated that it is possible to improve the size and stability of complex composites as Woitiski's varying the proportion of chitosan. Furthermore, the influence of the molecular weight of chitosan has not been determined yet. For that reason, we used two different molecular weight chitosans.

Materials and methods

Materials

Low viscosity alginic acid sodium salt from brown algae, which has an M/G ratio of 1.56 (Díaz Baños et al., 2014) (A2158; for a 2% solution at 25 °C, $\eta=100-300$ cP; data from the manufacturer), LMW CS (448869-250G) with an MW in the range 50000 to 190000 Da, and MMW CS (448877-250G) with an MW in the order of 250000 Da with viscosity equal to 20-300 cP in case of LMW and 300-800 cP in case of MMW, both of them measured at 1% in 1% acetic acid at 25°C. Degree of acetylation was around 20% in both cases (data from manufacturer), and BSA (A1933-25G) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (France). BSA has a MW equal to 66 KDa approximately.

Dextran sulfate sodium salt from *Leuconostoc* spp. (5000 Da) is a polymer of anhydroglucose composed of approximately 95% alfa-D-linkages in main chain and 5% approximately in branching linkages. DS contains approximately 17 % sulfur which is equivalent to approximately 2.3 sulfate groups per glycosyl residue. Low MW DS exhibit slightly less branching and have a more narrow range of MW distribution (data from manufacturer).

Poly(vinylpyrrolidone) (PVP) K 90 were purchased from Fluka (Switzerland). PVP K90 is a pH stable linear nonionic polymer that is soluble in water and organic solvents. Average M_w is 360 KDa. Viscosity of PVP K90 was equal to 150 cP at 5% in water at 25°C (data from manufacturer); poloxamer[®] 188 (Kolliphor 188) which structure consists of a hydrophobic propylene oxide (PPO), which is surrounded by two hydrophilic parts of polyethylene oxide (PEO) has a M_w equal to 102 KDa, approximately (data from manufacturer) was kindly supplied by BASF (Germany).

PEG 4000 was purchased from Fisher Scientific (UK), viscosity of PEG 4000 is 114-142 cP at 50% in water at 20 °C, hydroxyl value is 25-32 mg KOH/g, melting point is 58-61 °C (data from manufacturer); calcium chloride was from Riedel-de-Haën (Germany); lactic acid 90% was from VWR BDH Prolabo (France); hydrochloric acid 37 % and sodium hydroxide were from Merck KGaA (Germany); and recombinant human insulin 100 IU/mL Actrapid[®] from Novo nordisk A/S (Denmark).

Stock solutions were prepared in milliQ water. CS was dissolved in 0.5% (v/v) of lactic acid solution. Solutions were filtered through Millipore #2 filter paper (pore diameter of 0.7 µm) under vacuum. SnakeSkin[®] dialysis Tubing 10000 MWCO (regenerated cellulose membrane) was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Vivaspin 20 100000 MWCO PES for ultrafiltration was purchased from Sartorius. Spectra/Por[®] dialysis membranes 100000 MWCO for the release assays were acquired from Biotech CE Tubing.

Methods

Stock solutions

Five stock solutions were prepared:

- A solution, that we shall call A, of a final concentration of $6 \times 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ in alginic sodium salt, $2 \times 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ DS 5000 Da, $4 \times 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ poloxamer[®] 188 and $6 \times 10^{-5} \text{ gcm}^{-3}$ insulin was obtained after stirring for 24 h at room temperature. The pH was adjusted to 4.9 with HCl 0.1 M. A similar solution without insulin was also prepared for the synthesis of blank nanocomposites.
- In parallel, a stock solution of $2 \times 10^{-3} \text{ gcm}^{-3}$ calcium chloride was prepared.
- LMW or MMW CS was dissolved at final concentration equal to 10^{-3} gcm^{-3} . Solubility was stimulated by adding 0.5% (v/v) acid lactic and stirring for 24 h at room temperature. Afterwards, the acidic pH of the solution was increased to 4.6 with NaOH 1 M. The solution was filtered through Millipore #2 paper under vacuum. Then, CS solutions were diluted with MilliQ water to reach a final concentration of 10^{-5} gcm^{-3} or 10^{-7} gcm^{-3} . After 24 h of stirring, a decrease in pH was observed and the pH was readjusted to 4.6.
- $3.5 \times 10^{-3} \text{ gcm}^{-3}$ PEG 4000 was dissolved in the solution of CS. After stirring for 24 h, the pH of the solution was readjusted to 4.6 once again. It was observed that, for solutions containing CS at final concentration 10^{-5} gcm^{-3} , the pH increased to 4.8. In these cases, the pH was readjusted with no more than 1 drop of diluted HCl. For solutions containing CS at a final concentration 10^{-7} gcm^{-3} , the pH decreased to 3.9, which was readjusted with 2 drops of diluted NaOH. The solution containing CS and PEG is denominated B.

- A $1 \times 10^{-2} \text{ g cm}^{-3}$ BSA solution was obtained after stirring for 4 hours at room temperature. Later, the pH was set at 4.6 with HCl 0.1M.

All solutions were kept at 4 °C until use at room temperature.

Nanocomposite preparation

Calcium chloride solution (7.5 cm^{-3}) was added by dropwise extrusion into 117.5 cm^{-3} of solution A. Then, 25 cm^{-3} of solution B composed of $10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ or $10^{-7} \text{ g cm}^{-3}$ of LMW or MMW CS was added dropwise. Lastly, 25 cm^{-3} of BSA was added dropwise. Nanocomposite dispersions were concentrated using regenerated cellulose membrane with tubing nominal dry thickness of 10000 MWCO and a dialysis solution of 10% poly(vinylpyrrolidone) K 90 for 24 h at 4°C.

Measurements

A Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) was used to measure the hydrodynamic size. Measurements were carried out at 25°C and 173° angle relative to the source. The time autocorrelation function of the scattering intensity fluctuations was used to estimate the hydrodynamic diameter distribution. In the case of CS measurements, each assay consisted of 100 measurements, and in case of nanocomposites, each assay consisted of 6 measurements. In both cases, the number of runs was established by the software in order to reach the quality criteria. Each run lasting 10 seconds with no delay between measurements. Nanocomposites measurements were carried out after synthesis and 21 days later. Each curve in a plot represents the average of the measurements performed, in a protocol that was confirmed to give very reproducible intensity and number distributions. Distribution by intensity allows the characterization of particle size, whereas distribution by number, which is obtained by the software assuming the particles to be spherical, the homogeneity of the sample and the accuracy of the distribution by intensity, allows the relative populations of the particles to be estimated.

The ζ potential, which is a measure of the electrical charge in the surface of a particle, was also obtained with the same apparatus. Each assay consisted of 3 automated measurements.

For the determination of the insulin entrapment efficiency, the nanocomposite suspension was ultrafiltered using a Vivaspin 20 100000 MWCO PES by centrifugation at 6000 g for 60 min at 4 °C. The recovered eluent was filtered and diluted 1:2 in absolute ethanol and measured in triplicate by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Simultaneously, the same suspension of nanocomposites was diluted in a ratio 1:6 in simulated intestinal fluid (SIF) without pancreatin (USP31-NF26) and stirred vigorously in an orbital shaker for 180 min at room temperature. Then, a sample was diluted 1:2 in absolute ethanol and centrifuged for 10 min at 13500 g at room temperature. After that,

the supernatant was filtered using filters with a size pore of 0.22 μm . Finally, the filtrate was assayed in triplicate by HPLC. The insulin entrapment efficiency is the difference between the initial amount of insulin and that measured in the supernatant of the nanocomposites suspension.

For the determination of the insulin release profile in enzyme-free simulated digestive fluids, 15 mL of suspension containing nanoparticles were incubated in 45 mL of simulated gastric fluid (SGF) without pepsin (USP31-NF26) at 37 °C for 120 min under stirring, followed by incubation in 45 mL of SIF without pancreatin (USP31-NF26) for 180 min. Sample aliquots were collected and replaced by the same volume of fresh incubation medium at predetermined times. To determine insulin released from the nanocomposites, samples were diluted 1:2 in absolute ethanol, centrifuged at 13500 g for 15 min, and the supernatant was analyzed for insulin quantification in triplicate by HPLC.

Insulin was assayed using an LC-2010 HT HPLC system (Shymadzu Co., Japan) equipped with a quaternary pump, a UV detector set at 214 nm, a reversed-phase X-Terra RP 18 column 5 μm , 4.6 x 250 mm (Waters Co., USA), and Purospher STAR RP-18 precolumn 5 μm , 4 x 4mm (Merck KGa, Germany). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) aqueous solution (B) operated in gradient mode at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ set at 30:70 (A:B) changed to 40:60 (A:B) in 5 min for elution during 5 min, and changed to 30:70 (A:B) in 1 min for elution during 1 min. The chromatograms were recorded and the peak area responses were measured using an automatic integrator. The method was validated and reported to be linear in the range 1.4-112 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2=0.9998$).

Stability over centrifugation was determined by LUMiSizer[®] 611/610 photometric pulsed NIR-LED, at 870nm (LUM GmbH, Germany). LUMiSizer[®] is a new methodology used to test the stability of the particles present in a sample. This technique takes advantage of the capacity of the particles in a suspension to reduce the transmittance, which depends on the concentration in terms of mass per volume (gcm^{-3}), through the sample in which they are suspended. Combining this feature with the migration of particles in a suspension as a consequence of the centrifugation force, the migration of particles along the sample can be seen. Measurements were carried out at 25 °C in rectangular polyamide cell with 10 mm optical path length and PP stopper (110-135XX). Samples were centrifuged at 1056 RCA until 200 profiles were recorded, taking one every 60 seconds. In total, 300 profiles were then recorded at 1878 RCA, taking one every 90 seconds. The instability index is calculated based on the clarification (increase in transmission due to phase separation by sedimentation) at a given separation time, divided by the maximum clarification. The instability index ranges from 0 (more stable) to 1 (more unstable). Relative instability allows comparison of the aggregation and sedimentation speed of nanocomposites, which were centrifuged in the same way. The calculus of the instability index was made by choosing a range in the region of interest in a cell where instability was evident. The analysis time, was

fixed according to the period of time during which changes in instability were linear for each sample.

The size determination of the particles in a sample was also made possible by LUMiSizer[®]. For this, the analyses were made in three positions of the region of interest in the cell in which the changes in profiles were most pronounced. Thus revealing greater instability of the system. As a result, the software yielded statistical values of the size of the particles of the sample expressed as the harmonic mean in nm, and some percentage distributions of size particles in nm.

LUMiSizer[®] also allowed the velocity of sedimentation of the particles to be measured in μms^{-1} . For this it was necessary to fix the range in the region of interest in the cell where the most significant changes were detected. Then, a time interval was chosen where particle migration is linear, and the software calculates the velocity of migration of the particles in that region for the time period selected.

Results and discussion

Polymeric nanocomposites based on CS are commonly synthesized for drug delivery purposes. (Woitiski et al., 2009) developed a system based on CS and ALG which contained poloxamer[®] 188, PEG 4000, SD and BSA as stabilizers and enhancers of drug loading. This reference method showed good encapsulation efficiency (Woitiski et al., 2009). However, the aggregation that occurred resulted in undesired microcomposites.

In this work, we have introduced three main changes in the reference method (see below) to improve the nanocomposites obtained. We have also studied the optimum amount of CS in the system in order to obtain nanocomposites. The results indicate that any reduction in the concentration of CS with no regard to its MW yields particles in the nanometric range.

Because of the different electrostatic natures of the polymers used (Table V-1), polyelectrolyte chains with opposite charges became attached in the synthesis process, entrapping hydrophilic drugs, such as insulin, in the process. Once the nanocomposites are synthesized, the BSA bound to the surface is expected to prevent the aggregation of the nanocomposites. However, at pH 5.1, the BSA-BSA interaction allows the approach of the structures in which this protein is adsorbed (Valle-Delgado et al., 2004) and as a consequence the aggregation of the entire structure is promoted. The first change was to lower the pH to 4.6. Therefore, the ζ potential was slightly increased to 10 ± 3 mV and no aggregation is observed.

The second change involved elimination of the phosphate buffer. The reason for this is based on our knowledge that by increasing the ionic force of the medium, the electrostatic forces that keeps nanocomposites separate are reduced or eliminated, and as a result, aggregation occurs (Collado-González et al., 2015; Pamies et al., 2014).

Table V-1. . ζ potential of polymeric species implicated in the synthesis of nanocomposites.

Polymeric species	pH	ζ potential (mV)
Alginate	4.9	-52±6 89.7 % 3±4 7.2 % -11±3 3 %
Dextran sulfate	4.9	-54±8 81.2 % -119±5 5.4 % -100±4 5.2 %
Poloxamer[®] 188	4.9	-41±6 69.9 % -22±5 30.1 %
LMW CS 7x10⁻⁴ gcm⁻³	4.6	42±8*
LMW CS 1x10⁻⁵ gcm⁻³	4.6	35±6 76.8% 8±6 23.2%
MMW CS 1x10⁻⁵ gcm⁻³	4.6	35±8 70.6% 58±2 11.0% 69± 3.13%
PEG 4000	4.6	29±7 83.3 % 5±4 16.7 %
BSA	5.1	2±5*
BSA	4.6	10±3*

* when percentage is equal to or higher than 99 %, no value is shown

The last change in the methodology was to change the concentration of CS, since, as previously reported, this parameter is important for obtaining smaller nanocomposites (Collado-González et al., 2017; Mukhopadhyay et al., 2015; Woitiski et al., 2009). Special attention was paid to this aspect.

In the reference system, the concentration of the stock solution of CS was 7x10⁻⁴ gcm⁻³, a concentration at which, according to results obtained by Collado-González *et al.* (2017, 2015), a significant portion of the CS chains will become entangled. The size distribution in LMW CS solution at 7x10⁻⁴ gcm⁻³ reveals the presence of a population in tens of nanometers (Figure V.1) . Although there is a second peak in hundreds of nanometers in the distribution size by intensity, the distribution by number indicates that the number of these particles is very small. A third peak of very large particles is observed, but is totally negligible in terms of the number of particles.

The stock solutions used in the new methodology (10^{-5} and 10^{-7} gcm^{-3}) were the same as those used by Collado-González et al. (2017; 2015). According to

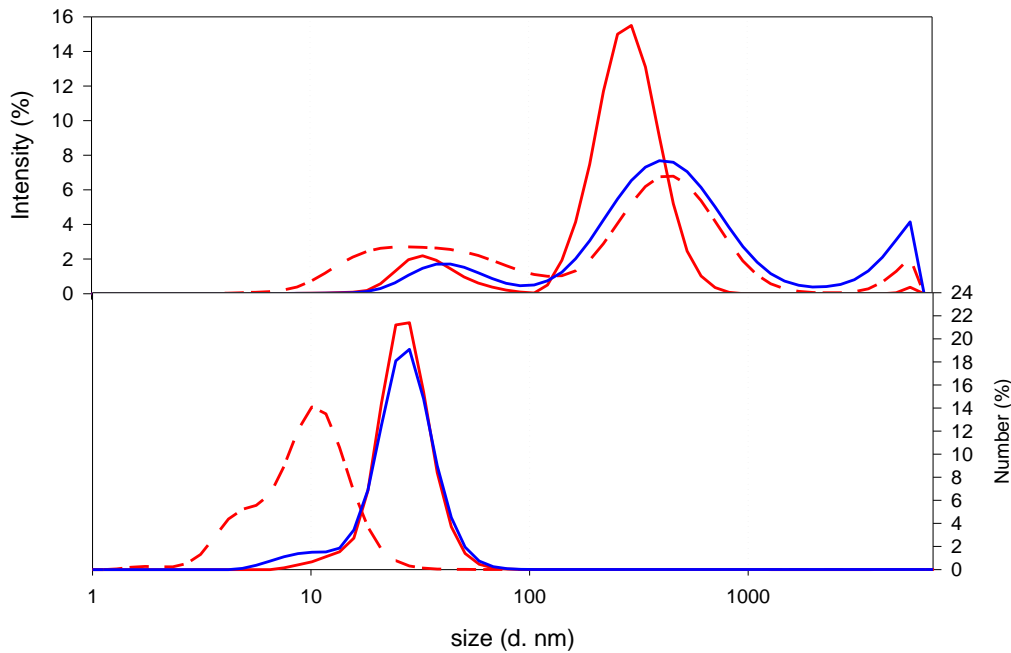


Figure , LMW CS 10^{-5} gcm^{-3} shows only two populations centered in tens and hundreds of nm. Moreover, the distribution is narrower than that of the 7×10^{-4} gcm^{-3} solution.

In order to check the effect of the molecular weight of the polyelectrolyte, nanocomposites were also prepared with MMW CS. According to Figure V.1, the distribution of MMW CS 10^{-5} gcm^{-3} is similar to that of LMW CS at the higher concentration measured. However, the number distribution fits better with LMW CS at the same concentration.

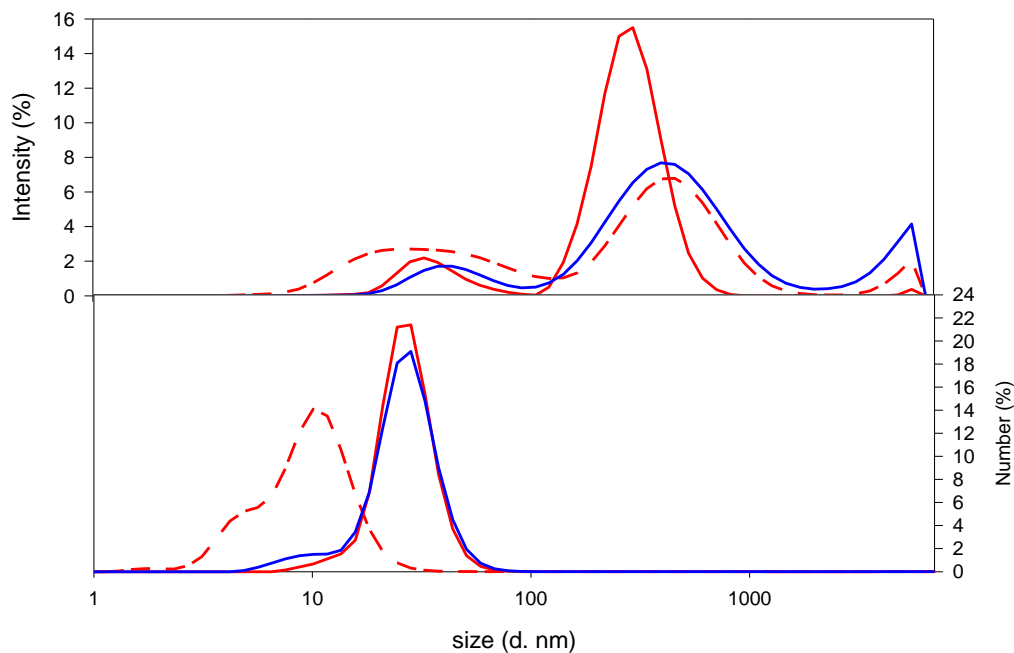


Figure V.1. Comparison of the size of CS in solution at pH 4.6. LMW CS $7 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ is represented by red dashed line, LMW CS $10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ is represented as red solid line and MMW CS $10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ is represented as blue solid line.

The volumes of the solutions in the methodology was kept unchanged so, we lowered the total amount of CS in the nanocomposites synthesis from the 17.5 mg used in the reference method to 250 μg or 2.5 μg , which represents a decreasing factor of 70 or 7000, respectively.

According to Figure V.2, this represents the size distribution of nanocomposites which contained 250 μg of either LMW CS or MMW CS obtained with broad peaks in the range of a few hundreds of nanometers. This is 300 nm for LMW CS and 500 nm for MMW CS. When the amount of polymer was reduced to 2.5 μg for both, LMW CS and MMW CS, the maximum peak slightly increased, again in the same region of size, for both cases. That was 900 nm for both cases. There were differences in particle size when these formulations were compared with those used in the established methodology, which were prepared with 17.5 mg of LMW CS. No significant amount of particles larger than 1 μm were detected. The reference system yielded a principal population of nanocomposites of 300 nm, but also a significant amount of microcomposites in the orders of 1500 μm and 4300 nm.

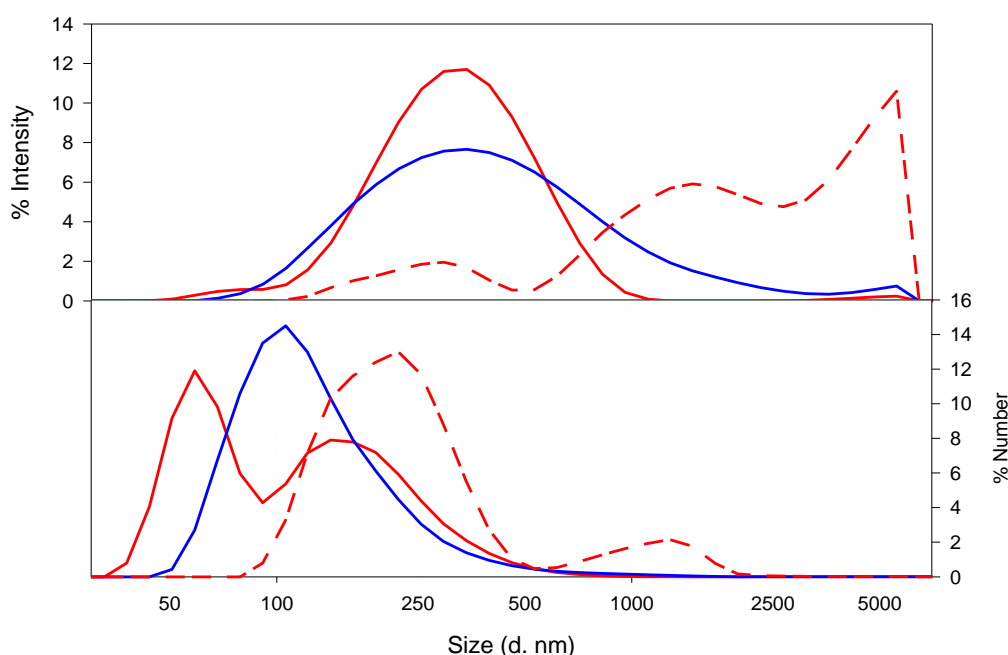


Figure V.2. Size of nanocomposites as a function of the type and amount of CS. Nanocomposites composed of LMW CS following the Woitiski protocol (red dashed line) or the new protocol containing 250 μg of LMW CS (red solid line) or 250 μg of MMW CS (blue solid line) were plotted.

According to the ζ potential, all the synthesized nanocomposites were negatively charged (Table V-2). Our hypothesis was that CS acts as “glue” between the different structures formed by ALG, DS, poloxamer and insulin. The ζ potential of the nanocomposites would reveal the presence of negatively charged polymers at the surface. Since ALG resists the acidic pH, it would prevent the degradation of CS in the acidic environment of the gut. However, as the BSA was added once the

nanocomposites were formed, and no peak was found in the range of tens of nanometers, which is the hydrodynamic diameter of BSA; BSA should be on the surface of the nanocomposites. For the sake of the completeness, BSA showed a positive charge when in solution at pH 4.56 (Table V-1) but when added to the nanocomposites, this positive character did not change the negative ζ potential of the final structures formed. It is important to note that the ζ potential of the formed nanocomposites revealed that these structures were stable. The size of the nanocomposites present in the samples remained almost unchanged for 21 days following their synthesis when kept in a refrigerator.

The migration of nanocomposites containing 2.5 μg or 250 μg of LMW CS is plotted in Figure V.3. On that basis, the instability index, hydrodynamic size and velocity of sedimentation can be determined.

The instability index is a relative parameter which is used for comparing the stability and lack of change in size of different samples centrifuged in the same measurement event. According to the analysis (

Table), nanocomposites with higher amount of CS (250 μg), regardless of their MW, showed higher stability than the ones containing a lower amount of CS (2.5 μg). The hydrodynamic sizes of the nanocomposites analyzed with LUMiSizer[®] are quite similar to those obtained with DLS (Table V-3). Again, the nanocomposites containing lower amounts of CS were bigger than those composed of higher amounts.

Table V-2 ζ potential of nanocomposites composed following the reference system (Woitiski *et al.*, 2009) and nanocomposites composed following the new methodology, in which LMW CS or MMW CS was used. The total amount of CS in each batch is indicated. The results correspond to the average of 6 measurements.

	Z potential (mV)
Reference system; LMW CS 17.5 mg	-28±9
LMW CS 250 μg	-28±5
LMW CS 2.5 μg	-30±11
MMW CS 250 μg	-31±5
MMW CS 2.5 μg	-33±10

Calculations of the migration velocity yielded four values in the case of nanocomposites with a higher amount of polymer and two values in those with a lower amount. As a result, it is assumed that the nanocomposites composed of 250 μg of CS had 4 populations after being exposed to stress, probably very similar in size since the velocities of migration were similar. Also, it can be assumed that for nanocomposites composed of 2.5 μg of CS, only 2 populations were obtained after exposure to stress. In

this case, the nanocomposites were not similar since their velocities were not similar (Figure V.4). This result reinforces the broad peak obtained in DLS.

Based on the centrifugation process and assuming a spherical shape for the particles, there is a quadratic relation between sedimentation velocity and the particle radius. $k \cdot r^2 = v_m$, in which k is a constant, r is the radius of the particle and v_m is the sedimentation velocity. Our experimental results, shown in Table V-3 and Figure V.4 fit this description well. More specifically, nanocomposites containing 2.5 μg of CS showed a 10 fold higher velocity than those which contained 250 μg of CS (Figure V.4)

In summary, according to the LUMiSizer[®] analysis, nanocomposites obtained with 250 μg of CS yielded very similar populations of nanocomposites which were smaller and showed a lower migration velocity, which is translated into higher stability, than those obtained with 2.5 μg of CS. This result was also obtained independently of the MW of the CS.

These results resemble to that obtained by Collado-González *et al.* (2017). These authors found a proportion between AuNP:CS or CS:SFN that gave a population with an optimum distribution of sizes of nanocomposites in each system. In both cases, nanocomposites were obtained as a result of the electrostatic interaction between polyelectrolytes. If the proportion of CS or the polyanion in the system was low, large aggregates were obtained. Only a narrow range of proportions yielded nanocomposites with a stable size.

In summary, the reference system, which contains CS at a concentration of $7 \times 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ yields nanocomposites, microcomposites and also some millimetric composites which cannot be detected by DLS. By reducing the concentration of the solution of CS to 10^{-7} gcm^{-3} , a broad peak which spans from tens of nanometers to microns in hydrodynamic diameter is obtained. Between these two situations, when the concentration of CS is 10^{-5} gcm^{-3} , the nanocomposites obtained had a range of nanometric size.

Table V-3. Instability index and particle size distribution of the nanocomposites prepared. Analysis was carried out with LUMiSizer[®]. The instability index and span are adimensional parameters.

Sample	Instability index	Median (nm)	Span (x90-x10)/x50
LMW CS 250 μg	0.155	485.4	0.7741
LMW CS 2.5 μg	0.560	857.3	0.7879
MMW CS 250 μg	0.125	465.4	0.7004
MMW CS 2.5 μg	0.625	924.1	0.7980

The release profiles of all the nanocomposites are plotted in Figure V.5 and appear quite similar. Insulin was present in a very low level at time zero in the supernatant,

indicating the good encapsulation efficiency for this drug. The incubation of nanocomposites in SGF without pepsin for 2 hours resulted in the low release of insulin from the nanocomposites: 42 % and 34 % in the case of nanocomposites composed of 250 μg and 2.5 μg LMW, respectively, and 39 % and 36 % in the case of composites composed of 250 μg and 2.5 μg MMW, respectively. The nanocomposites were then transferred to SIF without pancreatin up to 24 hours. In the first 3 hours of incubation, insulin release was roughly 80% in each case: 81% and 79 % in the case of nanocomposites composed of 250 μg and 2.5 μg LMW, respectively, and 82 % and 82 % in case of composites composed of 250 μg and 2.5 μg MMW, respectively. The calculations of the amount of released insulin were made using the maximum value released (at 24 hours) as reference for each nanocomposite.

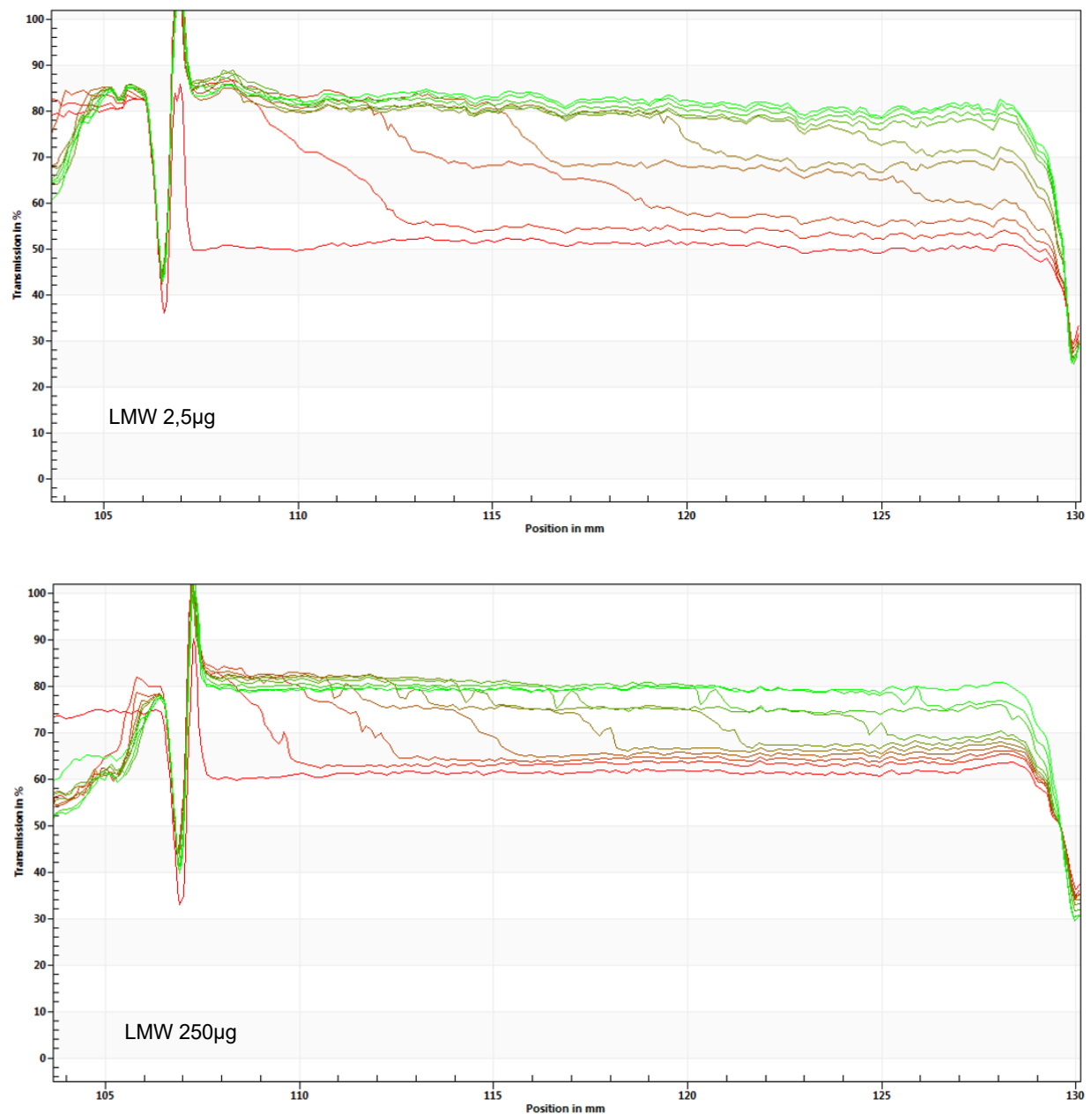


Figure V.3. Transmittance plots of the light passing through the suspensions of nanocomposites containing 2.5 μg (top) or 250 μg (bottom) of LMW CS. Each line represents a transmittance profile over time. The first one is shown in red and is around 60%. As the centrifugation progresses the color transitions changes to green.

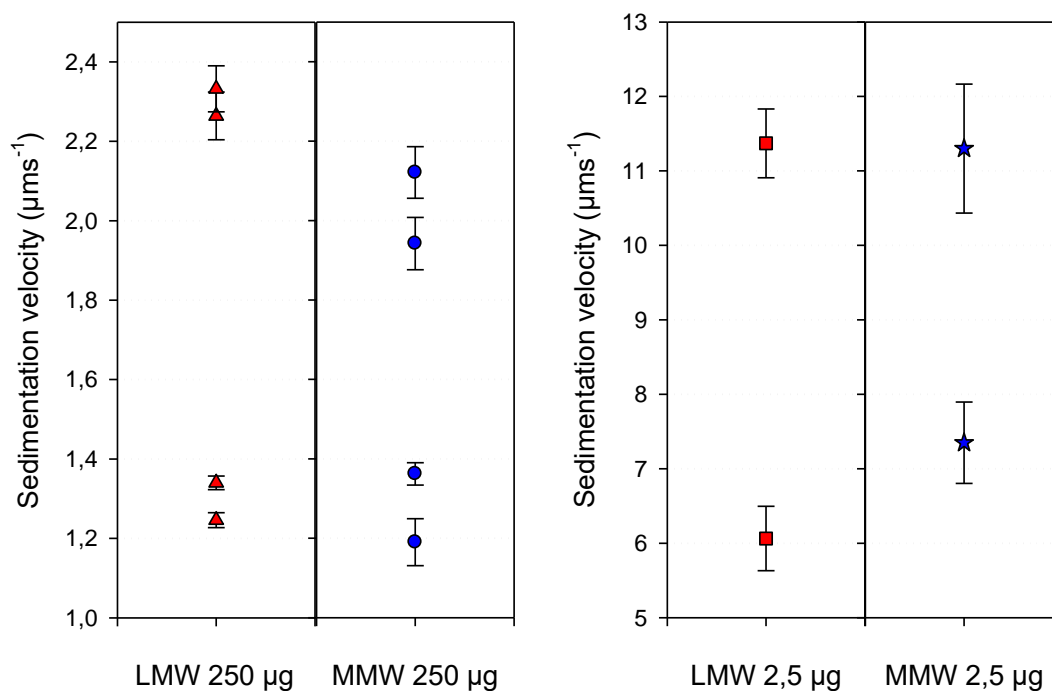


Figure V.4. Velocity of sedimentation of the synthesized nanocomposites. This parameter was analyzed with LUMiSizer after the samples were centrifuged, as indicated in the methods section.

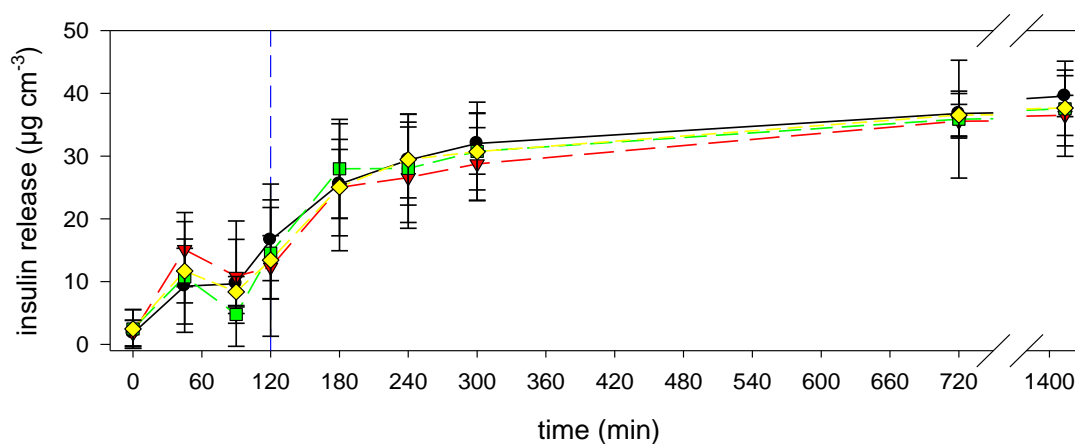


Figure V.5. Insulin release from nanocomposites containing 250 µg (black circles long dashed line) or 2.5 µg (red triangles down short dashed line) of LMW CS or 250 µg (green squares short dashed line) or 2.5 µg (pink diamonds short dashed line) MMW CS. Vertical blue line represents the change from SGF to SIF. Experiments were carried out as indicated in methods.

To study the morphology of nanocomposites, they were analyzed using a Scanning electronic microscope. As shown in Figure V.6, round shaped nanocomposites were obtained for each formulation.

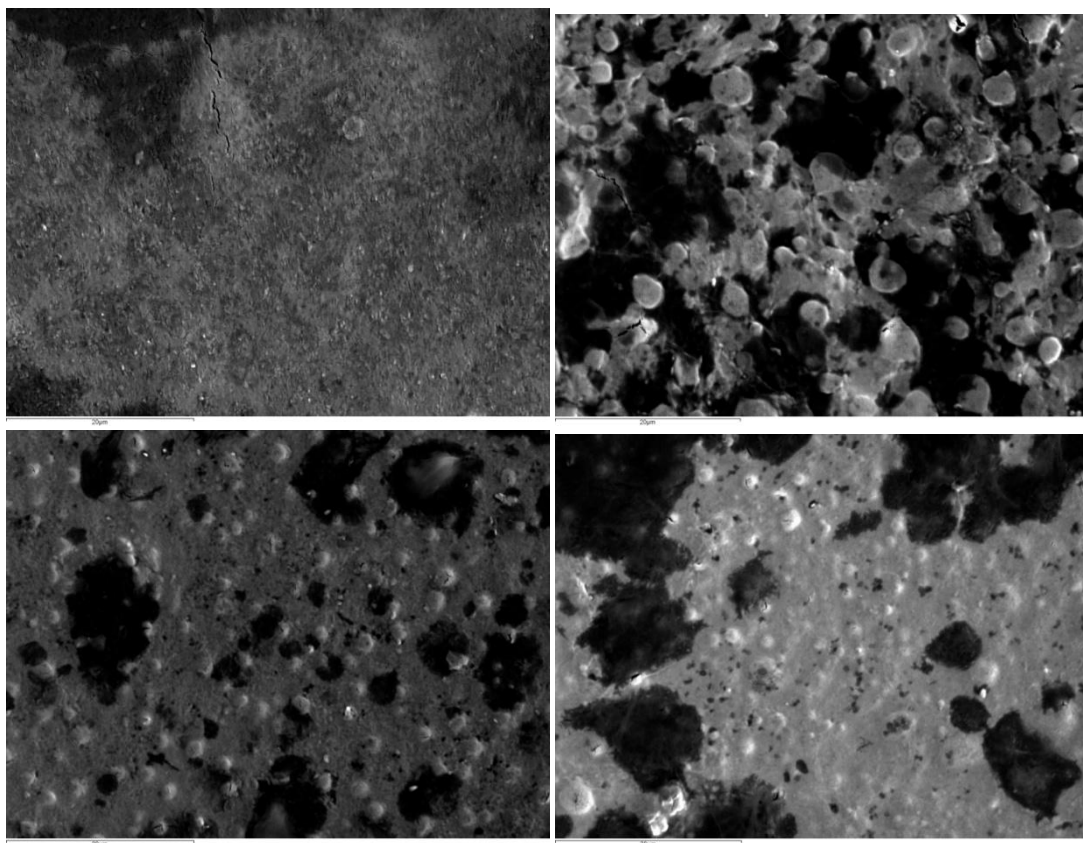


Figure V.6. Scanning electron microscope images of nanocomposites composed of 250 μg (upper left) or 2.5 μg (upper right) of LMW CS or 250 μg (lower left) or 2.5 μg (lower right) of MMW CS. All images were made at a magnification of 2000x.

Conclusions

We are reporting the synthesis of improved release systems after producing nanocomposites and studying the influence of CS concentration on their size. Nanocomposites formulated with low amounts of CS (2.5 μg) are bigger than those formulated with higher amounts of this polymer (250 μg), regardless of the MW of the polymer. More specifically, for LMW CS there is a 2.5 fold increase in size when the amount of the polymer is decreased 100 times. In the case of MMW CS there is a 1.7 fold increase when the amount the polymer is decreased by the same amount.

Nanocomposites formulated with either 2.5 μg or 250 μg of CS, regardless to the MW, showed no aggregation during both the time and the exposition to centrifugation. These results point to the high stability of these nanocomposites.

Chapter VI: Cytotoxicity assays

Introduction and objectives

Drug delivery systems usually suffer aggregation in physiological conditions, a phenomenon it is important, to avoid. For this reason, we have developed nanocomposites (NC) in which medium molecular weight chitosan (MMW CS) acts as stabilizing agent to prevent aggregation of gold nanoparticles coated by citrate (AuNP) or silk fibroin nanoparticles (SFN). In this chapter, we study the cytotoxic effect of these nanodevices.

Ionic liquids (ILs) are salts formed by an organic anion and an inorganic cation. ILs are liquid at temperatures lower than 100 °C (Ghandi, 2014) and are used in a great variety of technological processes and applications (Hayes, Warr, & Atkin, 2015; Keskin, Kayrak-Talay, Akman, & Hortaçsu, 2007) due to their thermal and chemical stability, among other reasons (Lu, Yan, & Texter, 2009). Because of their low vapor pressure, ILs are known as green solvents and they can be easily recovered after use. ILs are also called design solvents because their properties can be modulated as a function of their ionic composition.

There are several methods available to obtain SFN. Traditionally, ionic salt solutions (Asakura, Watanabe, Uchida, & Minagawa, 1984) or hydroalcoholic solutions (Ajisawa, 1997) were used, along with organic solvents (Rockwood et al., 2011). Recently, a new method has been described to obtain SFN involving the use of ILs and ultrasounds. The new method is a shorter process than traditional ones and yields SFN with better mechanical properties (Lozano-Pérez et al., 2015).

There are several studies in the literature that evaluate the toxicity of ILs using various biological models, such as the bacteria *Vibrio fischeri* (Pinto, Costa, Lima, & Saraiva, 2012; Stolte et al., 2003; Ventura et al., 2014). These studies revealed that the EC₅₀ value, that is the concentration of a compound which causes the death of 50% of the population under study, was lower for monocationic ILs than for dicationic ones. According to the EC₅₀ value, dicationic ILs show similar toxicity to organic solvents. And, due to the properties of dicationic ILs, these solvents could be an alternative to using organic solvents. However, studies on the cytotoxicity of dicationic ILs on different cell culture lines are still needed.

The objectives of this work:

1. To study the cytotoxicity of several dicationic ILs on HeLa cells in order to find an IL with a low toxic effect, which could be used to prepare SFN.
2. To study the cytotoxicity of the nanostructures MMW CS, AuNP and SFN, and the nanosystems developed with them. That is, NC composed of MMW CS and AuNP, and NC composed of MMW CS and SFN.

Materials and methods

Gold nanoparticles coated by citrate were purchased from Ted Pella, Inc. (Redding, CA). The suspension concentration was 5.7×10^{12} particles/cm³, with a hydrodynamic diameter was 13 nm (nominal value 10 nm).

SFN were prepared as indicated in Lozano-Pérez et al., 2015. Briefly, silk fibroin was dissolved in IL and high-power ultrasounds were applied. The SFN suspension was freeze-dried. Then, SFN was solved at a final of 10^{-4} g/cm³ and subjected to pulsating ultrasonication of 15 seconds steps at 30% amplitude for a total time of 3 minutes in a Sonifier Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation. Dansbury, USA). These SFN were stable over a period of approximately 3 months before aggregation occurred.

Chitosan was obtained from Sigma-Aldrich (448877-250G). The molecular weight is in the order of 250000 Da and the degree of acetylation is around 20% (data from the manufacturer). Chitosan solutions at $c=10^{-3}$ gcm⁻³ were prepared at pH set to 3.5 using glacial acetic acid from Panreac. The solution was stirred for 24 h, before being filtered and diluted to final concentrations equal to 10^{-5} gcm⁻³.

HeLa cells from human cervix carcinoma (Catalogue number: 86012803) and MCF7 cells from human breast cancer (Catalogue number 86012803) were purchased from the European collection of authenticated cell cultures. MEM (Minimum Eagle's medium), DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) with a high glucose content, 4500 mg/L without red phenol (D1145), glutamine 200 mM (G7513-100ML), penicillin and streptomycin solution (P4333), no essential aminoacids, FITC (Fluorescein isothiocyanate, F7250-50MG), DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, D4592), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenophenyltetrazolium bromide, M5655), and DMSO (dimethyl sulfoxide, W387520) were purchased from Sigma-aldrich. Handling and maintenance followed the guidance on good cell culture practice (Coecke et al., 2005).

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays consisted of evaluating of the reduction of a tetrazolium salt (MTT) (Mosmann, 1983). According to this methodology, the reduction of MTT by a cell culture in exponential growth phase is proportional to the viable cells in the culture.

HeLa cells were seeded in 96 well-plates at a density equal to 3000 cells/well. Twenty four hours after seeding the culture medium was replaced by fresh medium in which the compound under study was added. The range of concentrations evaluated was from 10^{-3} M to 10^{-1} M in the case of ILs C₄ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MPyrr)₂ Br₂, C₈ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MIm)₂ Br₂, and in the range from 10^{-3} M to 3×10^{-2} M in the case of ILs C₄ (Pyr)₂ Br₂, C₆ (Pyr)₂ Br₂, C₈ (Pyr)₂ Br₂, C₄ (MIm)₂ Br₂, and C₈ (MIm)₂ Br₂. In the cytotoxicity study of MMW CS, the concentrations tested were in g/mL: 5.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2.0×10^{-4} , 2.5×10^{-4} y 3.0×10^{-4} . In the case of AuNP, the concentrations applied were, in

particles/mL, the followings: 2.9×10^{11} , 5.7×10^{11} , 8.6×10^{11} , 1.1×10^{11} , 1.4×10^{11} , and 1.7×10^{11} . For SFN, the concentration applied, in g/mL, were: 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 1.5×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 2.5×10^{-5} and 3.0×10^{-5} . For NC composed of AuNP:CS 1:10 particle:particle and NC composed of CS:SFN 1:1.6 mg:mg, the volumes added were (5×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1.5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 2.5×10^{-1} and 3×10^{-1}) mL of a suspension of NC per mL of culture medium. Three independent assays with six replicates each per treatment were applied but in the case of AuNP and NC composed of AuNP and CS, the results correspond to one assay carried out in triplicate. In all cases, cells were incubated at 37 °C, 5 % CO₂ and 90 % HR. The MTT assay was carried out 24 h, 48 h and 72 h after the addition of the compound to the cell culture.

Proliferation controls were developed as a function of the dilution of the medium and the osmolality after adding the compound under study. Osmolality is the increase in the osmotic pressure due to the increase in concentration of the solute in a solution and is measured in mmol/kg. Osmolality proliferation controls were developed by adding saccharose to the medium until it reached an osmolality value of 400, 500 or 600 mmol/kg. These proliferation controls were studied in order to discard any effect of the high osmotic pressure on the proliferation of cells.

Confocal microscopy assays

SFN loaded with FITC was prepared as follows: 10 mL of an FITC in DMSO at 10^{-2} g/mL was added to a suspension of SFN at a concentration of 10^{-3} g/mL. The suspension was kept from the light and stirred for 2 h. Then, the excess of FITC was eliminated by centrifugation at 13400 g for 10 min and eliminating the supernatant. Later, MilliQ water was added and the cleaning cycle was repeated until the supernatant showed no fluorescence.

MCF7 cells were seeded at 10^4 cells per cm² using 4-well plates for cell cultures. 24 h after seeding, the medium was replaced by fresh medium and SFN-FITC was added. The cells were incubated for 72 h. Then, the cells were fixed by applying glutaraldehyde 2.5% for 6 min. After removing the fixer, the cultures were cleaned with PBS and 2% Tween 20 was applied for 5 min. After removing the Tween 20, the cultures were washed with PBS and a solution of DAPI 1/500 was applied for 3 min. Then, the cultures were washed again with PBS. After that, 80% glycerol was used in order to visualize samples in a confocal microscope monted with 80% of glycerol (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Heidelberg, Germany), with a PL APO 40X/1.3 AN objective.

Statistical analysis

Statistical analysis consisted of comparing of the absorbance results in each condition tested against the corresponding proliferation control. The Kruskal-Wallis method was applied to evaluate the variability of variances of groups: the null hypothesis was that the medians of the compared groups are equal ($H_0: \theta_1 = \theta_2 = \theta_3$) and the alternative hypothesis was that there were differences, at least among one pair of medians in the

population under study ($H_1: \theta_1 \neq \theta_2 \neq \theta_3$) (Sheshkin, 2004). When H_0 was rejected and H_1 accepted, a Tukey HSD test was applied in order to find which conditions produced a significant difference from the proliferation control. In the Tukey test, the null hypothesis was equal averages among samples ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$) and the alternative hypothesis was that there were differences in the averages among samples ($H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$) (Utts & Heckard, 2012). Differences were significant when $p < 0.05$. According to this test, the probability of making a mistake when rejecting H_0 was 5%. To develop the statistical analysis, SigmaPlot 12.5 was used.

Results and discussion

Proliferation controls: dilution and osmolality

The dilution control was carried out by adding 30% of autoclavated MilliQ water to the culture medium. This proliferation control showed similar proliferation to the culture in which the medium was not diluted (Table VI-1). Statistical analysis showed no differences between the two conditions. The absorbance level was lower when MilliQ water was added (Figure VI.1). And so, the maximum dilution of the medium applied was 30% in all cases studied.

Table VI-1. Absorbance percentages of culture with diluted medium with respect to standard conditions (100%).

	24 h	48h	72 h
% Absorbance	80	72	83

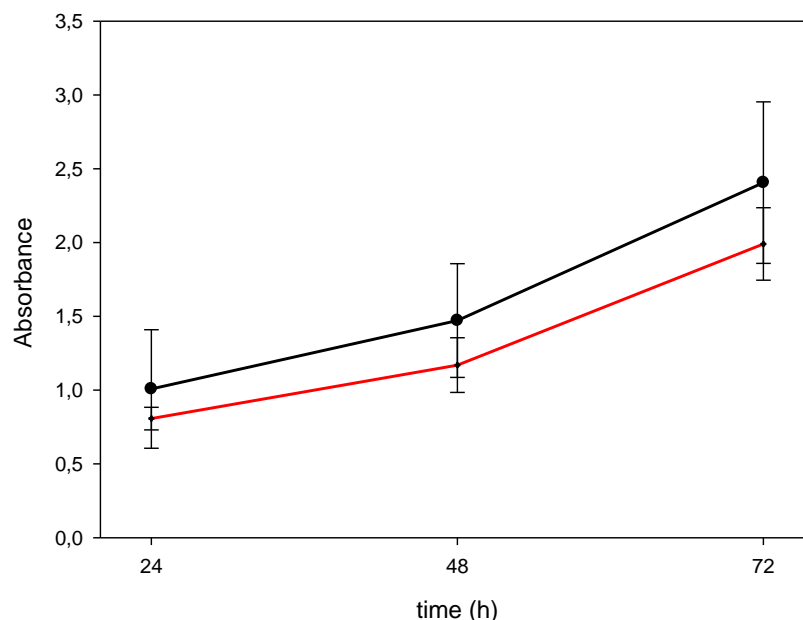


Figure VI.1. Cell proliferation of HeLa cells in standard conditions (black) and with diluted medium (red).

MEM medium showed an osmolality equal to 291 mmol/kg. According to the proliferation results (Figure VI.2), the proliferation of cells exposed to a culture medium whose osmolality increased to 400 mmol/kg showed the same proliferation profile as in

the original. However, increasing the osmolality to 500 mmol/kg the proliferation rate decreased in a marked way. And, if the osmolality reached 600 mmol/kg, the cell culture did not show proliferation. Thus, the maximum value of osmolality applied in the cytotoxicity assays was 400 mmol/kg.

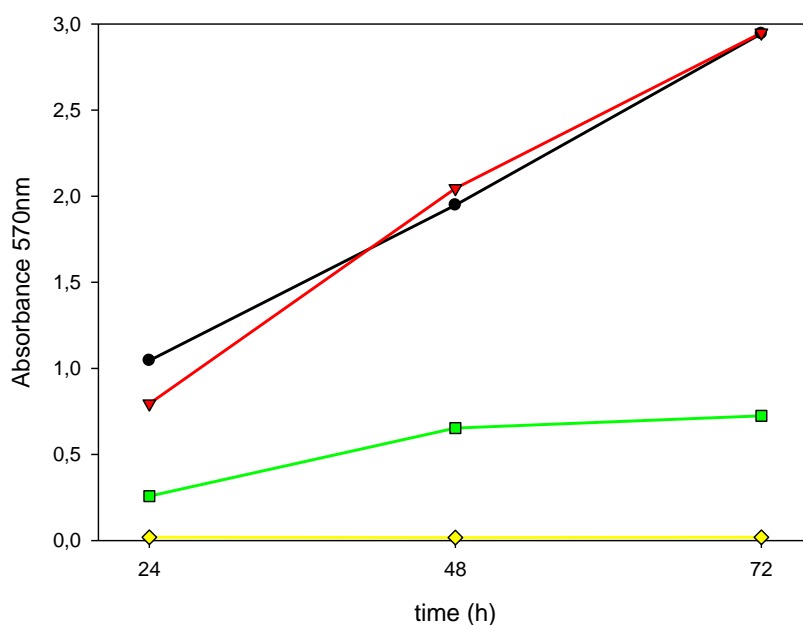


Figure VI.2. Proliferation of HeLa cells as a function of the osmolality of the culture medium: 291 mmol/kg (black), 400 mmol/kg (red), 500 mmol/kg (green) and 600 mmol/kg (yellow).

Ionic liquids cytotoxicity

Dicationic ILs composed of imidazolium, pyrrolidinium and pyridine was used. The length of the lateral chain was 4, 6 or 8 C. In all cases, the anions were two bromide ions (Figure VI.3).

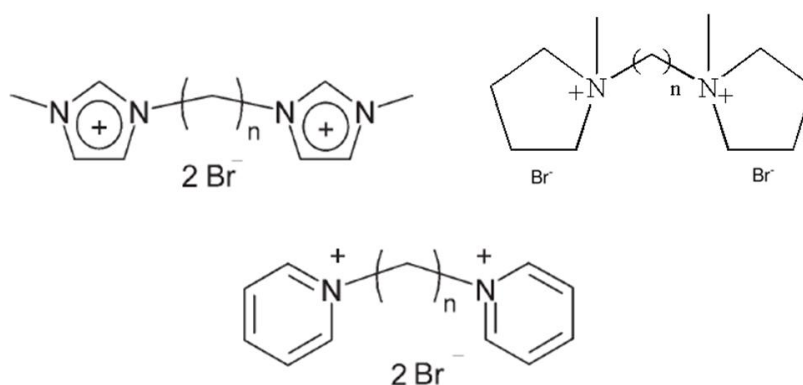


Figure VI.3. Dicationic ILs formulated with imidazolium (top left), pyrrolidonium (top right) or pyridine (bottom).

Table VI-2 shows the osmolality values of the culture medium after adding ILs at a final concentration of 0.03 M. Although the osmolality always increased, the value was always lower than 400 mmol/kg.

Table VI-2. Osmolality of culture medium MEM after adding IL at a final concentration of 0.03M.

Length of the lateral chain	(MPyrr) ₂ Br ₂	(Pyr) ₂ Br ₂	(MIm) ₂ Br ₂
C ₄	385	355	345
C ₆	343	312	379
C ₈	363	313	356

Cytotoxic assays at 24, 48 and 72 h were carried out and the EC₅₀ value was calculated for every IL tested (Tables VI-3 and VI-4). The results obtained revealed that the larger the lateral chain, the higher the cytotoxicity of the IL and the lower the EC₅₀. Besides, for a given length of the lateral chain, imidazolium based-ILs showed higher toxicity than pyridinium based-ILs. The ILs demonstrating the lowest toxicity were those which contained pyrrolidone in their structure, which coincides with the found in the literature (García Montalbán, 2016).

Table VI-3. EC₅₀ values in HeLa cell cultures treated with IL for 48 hours. The values indicate concentration in M.

48 hours	C ₄	C ₆	C ₈
C _n (Mim) ₂ (Br) ₂	0,022±0,004	0,006±0,003	0,003±0,002
C _n (Pyr) ₂ (Br) ₂	0,022±0,004	0,012±0,003	0,008±0,006
C _n (MPyrr) ₂ (Br) ₂	0,015±0,004	0,015±0,005	0,007±0,004

Table VI-4. EC₅₀ values in HeLa cell cultures treated with IL for 72 hours. The values indicate concentration in M

72 horas	C ₄	C ₆	C ₈
C _n (Mim) ₂ (Br) ₂	0,012±0,003	0,004±0,003	0,0004±0,0002
C _n (Pyr) ₂ (Br) ₂	0,012±0,003	0,0062±0,0004	0,0014±0,0014
C _n (MPyrr) ₂ (Br) ₂	0,013±0,002	0,009±0,001	0,005±0,004

Cytotoxicity of nanostructures

The osmolality of the culture medium was measured after adding the nanostructures. In all cases, the osmolality values were lower than the osmolality for the control (results not shown). The results could be explained as the interaction of the components of the medium with the nanostructures.

MMW CS cytotoxicity

The MMW CS cytotoxic assay revealed that the polymer has no antiproliferative effect (Figure VI.4). There were no statistical differences between the dilution control of proliferation and each condition at 24 h. At 48 h only the lower concentration conditions showed a significant difference from dilution control of proliferation. And at 72 h, there were significant differences between dilution control of proliferation and the concentrations applied. At this time, 72 h, the proliferation of the culture with the highest polymer content was 64% with respect to the proliferation control.

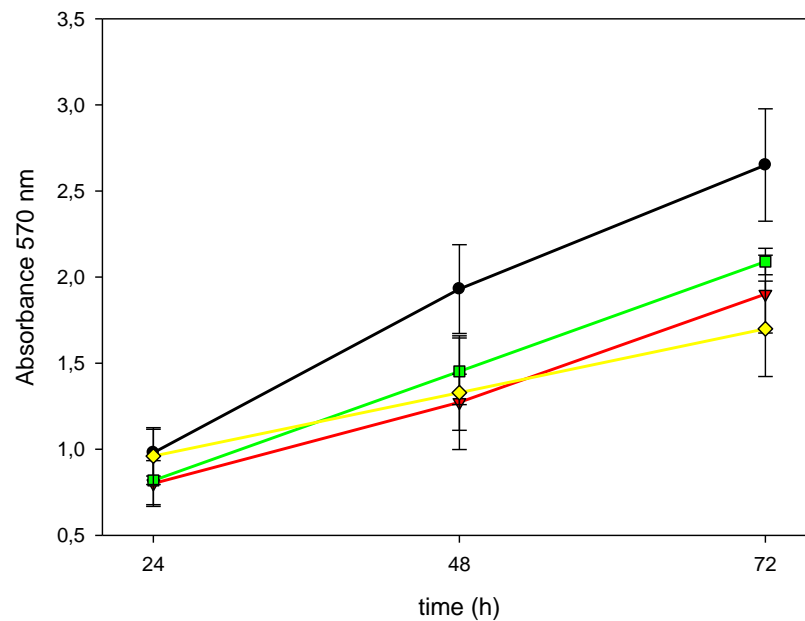


Figure VI.4. HeLa cell proliferation as a function of the MMW CS concentration in the medium. Curves correspond to proliferation of dilution control (black circles), or to a MMW CS equal to 1×10^{-4} g/mL (red triangles), 2×10^{-4} g/mL (green square) or 3×10^{-4} g/mL (yellow diamonds).

SFN Cytotoxicity

SFN cytotoxicity assays showed that fibroin did not have any antiproliferative effect against HeLa (Figure VI.5). This result confirms the biocompatibility properties of fibroin described in the literature (Altman et al., 2003; Leal-Egaña & Scheibel, 2010; Numata & Kaplan, 2010). Although fewer in number, there are also some publications which describe how silk fibroin has an antiproliferative effect. Some of these publications attributed this result to the presence of sericine in the medium (Altman et al., 2003). Kundu et al. attributed the antiproliferative effect of fibroin to the concentration of the protein (Kundu, Chung, Kim, Tae, & Kundu, 2010), marking the limit to decreasing proliferation at a concentration of 2×10^{-4} g/mL. Perhaps, due to the lower concentration of SFN we applied, no antiproliferative effect of the protein was observed in our study. Yan and collaborators (2016) developed hydrogels using fibroin, in order to use them as scaffolds. When they applied the structures in cell cultures, HeLa showed a decrease in the viability and metabolic activity from the first day of the study (Yan et al., 2016). In this case, the authors explained their results as a conformational change of the fibroin in the culture medium.

Our results indicated that HeLa cell proliferation in the presence of SFN at a concentration equal to or higher than 2.5×10^{-5} g/mL was significantly different at 24 h with respect to the dilution control of proliferation, a difference that was also observed at 48 h and 72 h. Similar results were found in a publication by Hakimi and collaborators, who indicated that although the presence of fibroin fibers caused a decrease in cell proliferation, the presence of fibroin allowed of cells to proliferate for 15 day (Hakimi et al., 2010). Our results showed that the increase in absorbance from

48 h to 72 h culture in the presence of the maximum concentration of SFN was 50% of the increase observed for the proliferation control in the same period.

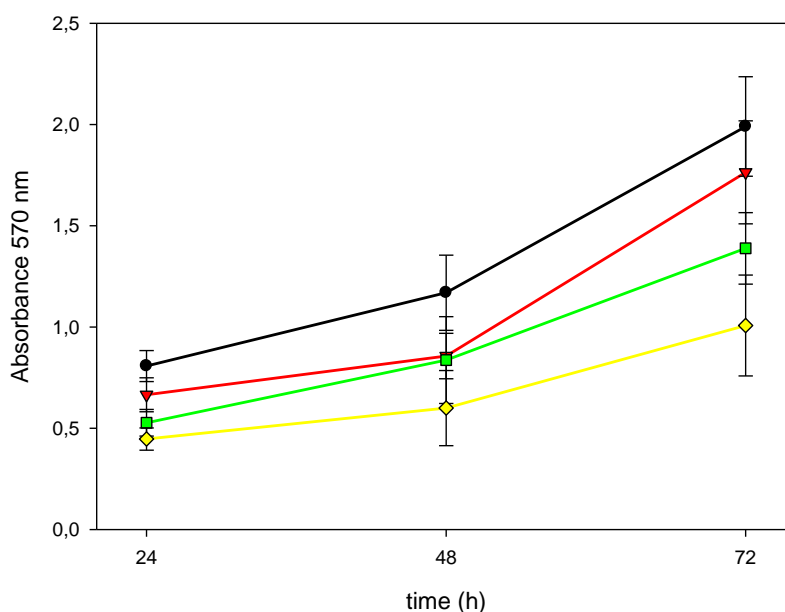


Figure VI.5. HeLA cell proliferation as a function of the SFN concentration in the medium. Curves correspond to proliferation of dilution control (black circles), or to a SFN equal to 1×10^{-5} g/mL (red triangles), 2×10^{-5} g/mL (green square) or 3×10^{-5} g/mL (yellow diamonds).

SFN internalization

MCF7 cells were used to ascertain whether SFN-FITC are internalized in cells. After incubating cells with FITC-loaded fibroin nanoparticles, the confocal images revealed (Figure VI.6) SFN-FITC inside cells, since green signals came from localized zones in the images and the background was black indicating that no fluorophore was present. The cell nucleus appeared blue as a consequence of the presence of DAPI.

Cytotoxicity of nanocomposites composed of MMW CS and SFN

NC MMW CS:SFN 1:1.6 mg:mg as in Collado-González et al., 2017 were prepared. NC MMW CS:SFN was added to the culture in the same conditions as previously tested (Table VI-5).

Results indicated that the absorbance value was roughly the same in all the conditions assayed, although the value was lower than the value of the dilution proliferation control. Only the 20% and 25% dilutions showed significant difference from the control proliferation. From 24 h to 48 h, the higher the concentration of NC in the culture, the lower the proliferation of the culture. In this case a significant difference could be detected at a dilution equal to or higher than 15%. Lastly, at 72 h of treatment, the dilution equal to or higher than 20% showed a significant difference (Figure VI.7). In general, an increase in the content of NC MMW CS:SFN caused a decrease in the proliferation of the cell culture. The absorbance value detected when applying a dilution

equal to 30% was the same at 48 h and 72 h, i.e. 37%. This result indicates that NC MMW CS:SFN 1:1.6 mg:mg applied to cell culture had a concentration-dependent effect. The null rate of proliferation found at a dilution equal to 30% can be defined as an cytostatic effect of the nanocomposites.

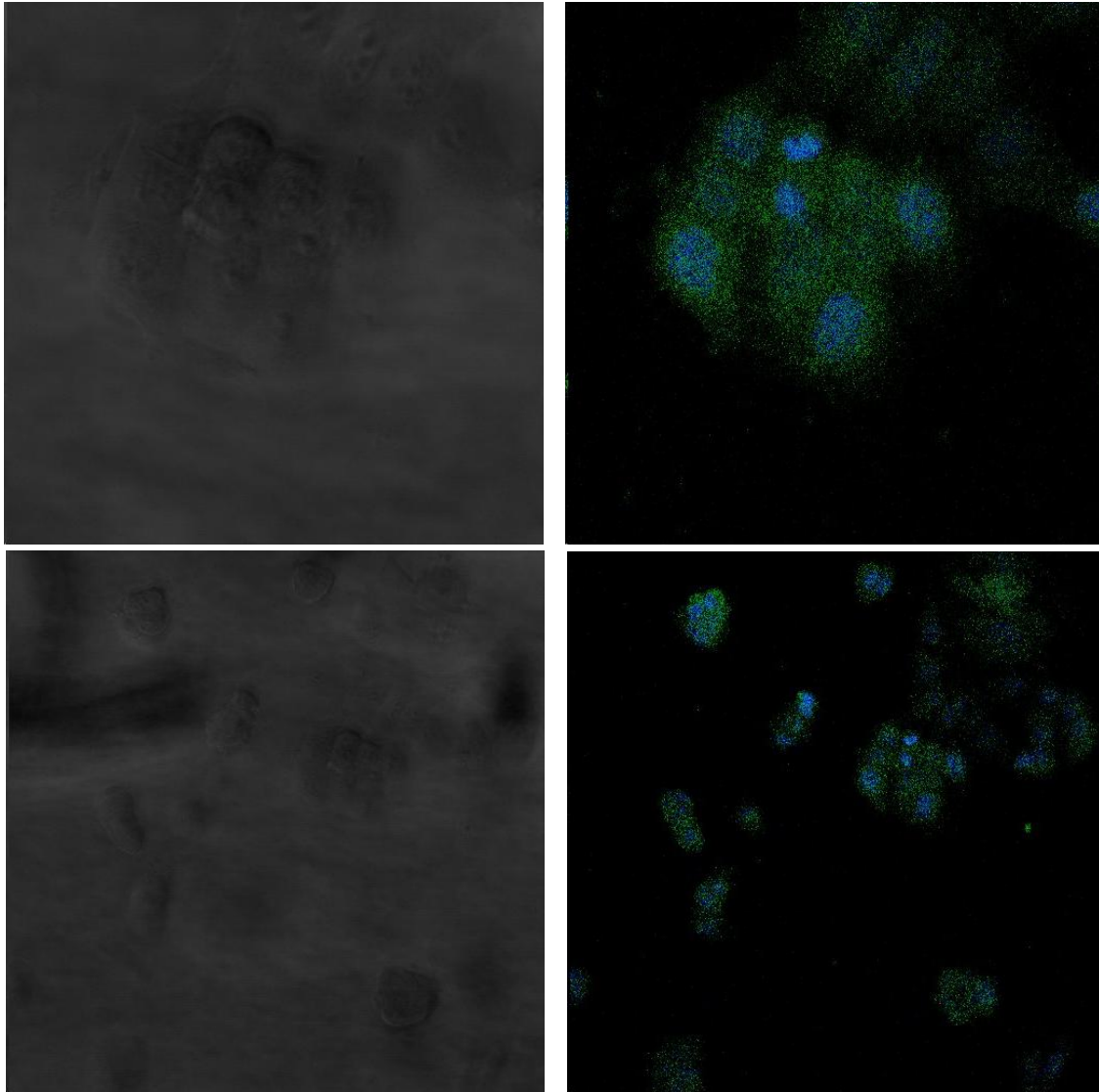


Figure VI.6. MCF7 cells confocal microscope images. Fluorofores used were FITC (green) and DAPI (blue). Images on the left correspond to trasmittance images and images on the right corresponds to the fluorescence image of the same area.

Table VI-5. Equivalences between NC composed of MMW CS and SFN suspensions and their counterparts. Absorbance percentages of the medium respect to the dilution control as a function of the content of NC MMW CS:CS 1:1.6 mg:mg. Significant differences are indicated as * for $p < 0.05$.

Dilution of NC in cell culture (%)	Equivalent to C_{SFN} ($\times 10^{-5}$ g/mL)	Equivalent to C_{CS} ($\times 10^{-4}$ g/mL)	24 h	48h	72 h
5	0.5	0.5	65.7 Nd	68.9 Nd	62.8 Nd
10	1	1	53.8 Nd	64.7 Nd	63.4 Nd
15	1.5	1.5	63.7 Nd	55.2*	55.9 Nd
20	2	2	46.5*	57.3 Nd	51.0*
25	2.5	2.5	43.4*	48.1*	46.6*
30	3	3	50.3 Nd	47.6*	37.3*

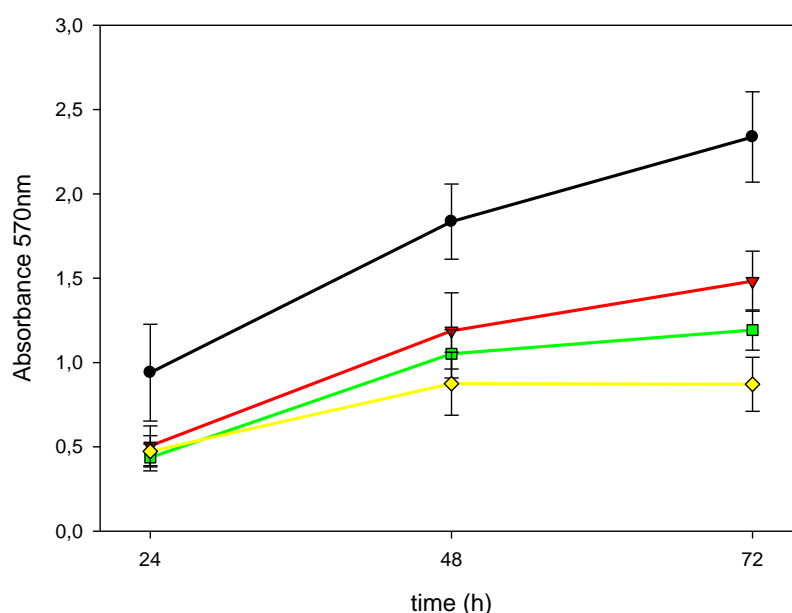


Figure VI-7. HeLa proliferation in presence of NC MMW CS:SFN 1:1.6 mg:mg. Curves represent dilution control of proliferation (black circles), and a dilution of NC MMW CS:SFN equal to 10% (red triangles), 20% (green squares), and 30% (yellow diamonds).

AuNP cytotoxicity

An analysis of the result of the cytotoxicity assays for AuNP revealed that these structures had no cytotoxic effect on HeLa cells for 72 h (Figure VI.8). No significant difference was found. The biocompatibility of the AuNP has been widely documented in the literature. Hühn and collaborators indicated that the cytotoxic effect of these nanoparticles can be seen when the concentration is higher than 20 nM (Hühn et al., 2013). Prado-Gotor estimated that the average number in atoms per AuNP of 10 nm (the same as we used) was 30687 (Prado-Gotor et al., 2014). Taking into account that the maximum applied concentration was 1.7×10^{12} particles/mL, the atomic mass of gold and considering null the mass of citrate, the AuNP concentration applied was 2.84 pM. Thus, according to the results of Hühn, AuNP had no cytotoxic effect.

Cytotoxicity of NC composed of AuNP and MMW CS

NC MMW CS:AuNP 1:10 particle:particle was synthesized as in (Collado-González et al., 2017). The equivalences among free AuNP, free CS and NC composed of MMW CS and AuNP appear in Table VI-6.

The results revealed that NC composed of AuNP and MMW CS had no antiproliferative effect (Figure VI.9), as occurred in cases of free AuNP and MMW CS. Neither were there significant differences between the different conditions tested. These results fit well with previously obtained results because the content of AuNP in NC AuNP:MMW CS was comparable to that of the lower content of free AuNP. As regards cytotoxicity effects of the polysaccharide, the amount of CS was 150-fold higher in the above study and did not show any cytotoxic effect.

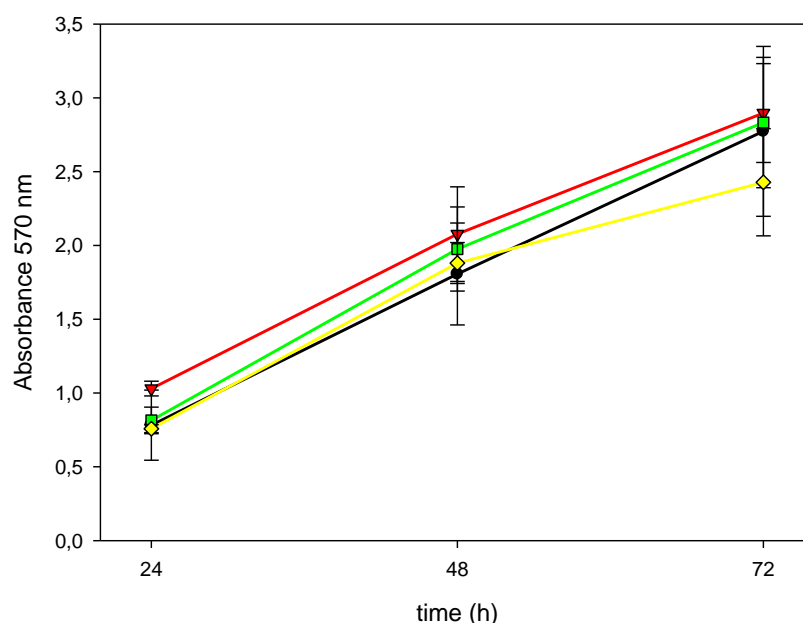


Figure VI.8. HeLa proliferation exposed at different concentrations of AuNP. Curves represent the dilution control (black circles), or an AuNP concentration equal to 5.7×10^{11} particles/mL (red triangles), 1.14×10^{12} particles/mL (green squares) and 1.71×10^{12} particles/mL (yellow diamonds).

Table VI-6. Equivalences between NC composed of AuNP and MMW CS suspensions and their counterparts. Absorbance percentages of the medium with respect to the dilution control as a function of the content of NC AuNP:MMW CS 1:10 particle:particle. Significant differences are indicated as *for $p < 0.05$

Proportion of NC in the culture (%)	Equivalent to C_{AuNP} ($\times 10^{11}$ particles/mL)	Equivalent to C_{CS} ($\times 10^{-6}$ g/mL)	Absorbance percentages of the medium with respect to the dilution control		
			24 h	48h	72 h
5	1	0.3	110.5 Nd	125.5 Nd	100.1 Nd
10	1.9	0.7	108.4 Nd	104.0 Nd	92.3 Nd
15	2.9	1	119.8 Nd	98.1 Nd	89.3 Nd
20	3.8	1.3	117.0 Nd	95.9 Nd	91.7 Nd
25	4.8	1.7	79.0 Nd	86.1 Nd	82.1 Nd
30	5.7	2	92.6 Nd	79.4 Nd	86.3 Nd

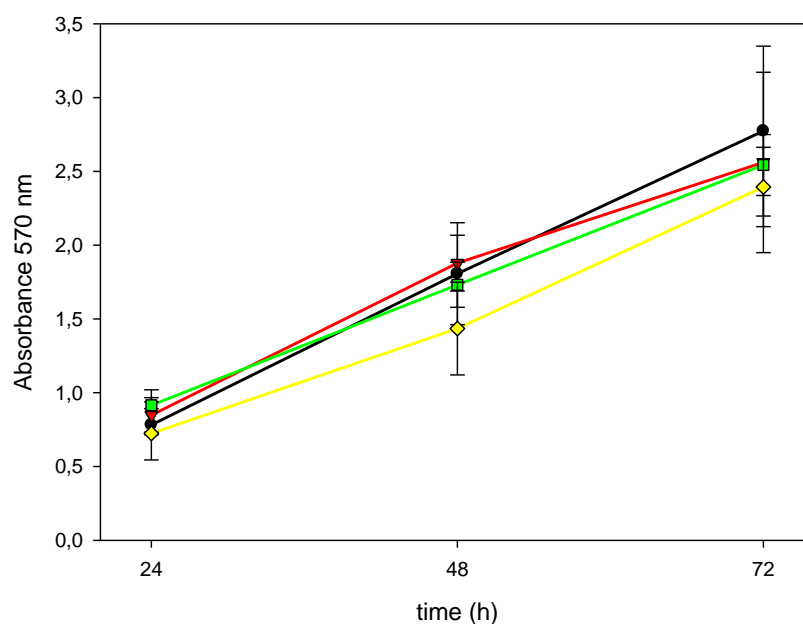


Figure VI.9. HeLa proliferation in presence of NC AuNP:MMW CS 1:10 particle:particle. Curves represent dilution control of proliferation (black circles), and a dilution of NC MMW CS:SFN equal to 10% (red triangles), 20% (green squares), and 30% (yellow diamonds).

Conclusions

The toxicity of ILs increase as the length of the lateral chain in the cations increases. Regarding the cytotoxicity of the functional group, imidazolium-based ILs were the most toxic of the ILs tested, while pyridine-based ILs were more toxic than pyridinium-based ILs.

As regard nanometric devices, the nanostructures of MMW CS, AuNP and SFN showed biocompatible properties, allowing the proliferation of the HeLa cell cultures for 72 h following application. Nanocomposites composed of MMW CS:SFN 1:1.6 mg:mg showed biocompatibility at low dilutions, 10% and 20%, while at 30% dilution cytostatic effects were recorded. Lastly, nanocomposites composed of AuNP:MMW CS 1:10 particle:particle showed biocompatibility at all the dilutions tested.

SFN-FITC were internalized in MCF7. Confocal images showed a dotted pattern in the cytoplasm which indicated that SFN underwent endocytosis but did not aggregate inside the cell.

Chapter VII: General conclusions

In this work we have used MMW CS to obtain nanostructures. The main conclusions of this work are:

1. An MMW CS solution at a concentration of 10^{-5} g/mL and pH lower than 6.5 mainly shows nanostructures, whose hydrodynamic diameter is reduced at high ionic strength as a result of the screening effect on their surface.
2. MMW CS in acidic solution is a polycationic polymer capable of stabilizing polyanionic structures. Derivatives of the polymer such as glycol-CS maintain the stabilizing properties of the polymer.
3. The nanostructures obtained as a result of the interaction of the biopolymer and negatively charged nanoparticles depend on the polyelectrolyte concentrations and the proportions between the biopolymer and polyanionic nanoparticles.
4. MMW CS acts as a scaffold where AuNP becomes attached and is protected from aggregation in low pH or high I conditions.
5. MMW CS is located on the surface of SFN where it protects the protein from aggregation. The SFN is postulated as a promising material in nanotechnology because in addition to its biocompatibility, it can be stabilized with polycationic polysaccharides such as MMW CS and glycol-CS.
6. MMW CS has a stabilizing effect in complex polysaccharidic nanocomposites formulated with alginate or dextran sulfate, among others.
7. MMW CS and the nanocomposites synthesized with it in this work showed biocompatibility, at least, at low concentrations in HeLa cell cultures.

Chapter VIII: References

- AbdElhady, M. M., & M., M. (2012). Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/840591>
- Ajisawa, A. (1997). Dissolution aqueous of silk fibroin with calciumchloride / ethanol solution, 91–94.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., ... Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401–416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203–230.
- Asakura, T., Watanabe, Y., Uchida, A., & Minagawa, H. (1984). NMR of Silk Fibroin . 2 . I3C NMR Study of the Chain Dynamics and Solution Structure of Bombyx mori Silk Fibroin, 20, 1075–1081.
- Baños, F. G. D., Díez Peña, A. I., Hernández Cifre, J. G., López Martínez, M. C., Ortega, A., & García De La Torre, J. (2014). Influence of ionic strength on the flexibility of alginate studied by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.023>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2011). Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 85, 325–333.
- Bhattacharai, S. R., K.C., R. B., Aryal, S., Bhattacharai, N., Kim, S. Y., Yi, H. K., ... Kim, H. Y. (2008). Hydrophobically modified chitosan/gold nanoparticles for DNA delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9233-7>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Chaiyasan, W., Srinivas, S. P., & Tiyaboonchai, W. (2013). Mucoadhesive Chitosan–Dextran Sulfate Nanoparticles for Sustained Drug Delivery to the Ocular Surface. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), 200–207. <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0193>
- Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K., & Paria, S. (2014). Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 8–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>
- Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous Behaviour of Chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/939536>
- Chen, M.-C., Sonaje, K., Chen, K.-J., & Sung, H.-W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 32(36), 9826–9838. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.087>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
- Cho, J., Heuzey, M.-C., Bégin, A., & Carreau, P. J. (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 500–515. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047>

- Christensen, B. E., Vold, I. M. N., & Vårum, K. M. (2008). Chain stiffness and extension of chitosans and periodate oxidised chitosans studied by size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.012>
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., ... Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. (2005). Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 33(3), 261–87.
- Collado-González, M., Fernández Espín, V., Montalbán, M. G., Pamies, R., Hernández Cifre, J. G., Díaz Baños, F. G., ... García de la Torre, J. (2015). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in presence of chitosan. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(6), 268. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3069-3>
- Collado-González, M., Montalbán, M. G., Peña-García, J., Pérez-Sánchez, H., Villora, G., & Díaz Baños, F. G. (2017). Chitosan as stabilizing agent for negatively charged nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 161, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.043>
- Corzo Luzioni, A. (2012). Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H[AuCl₄]. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 78(2), 79–90.
- Cunha, R., Franca, E., Pontes, F., Luis, R., Soares, T., & Rusu, V. (2012). The molecular structure and conformational dynamics of chitosan polymers: an integrated perspective from experiments and computational simulations. *INTECH Open Access Publisher*.
- d'Angelo, I., Casciaro, B., Miro, A., Quaglia, F., Mangoni, M. L., & Ungaro, F. (2015). Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide, 135, 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.027>
- Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2015). The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 127, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>
- Domard, A. (2011). A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.083>
- Fonte, P., Araújo, F., Reis, S., & Sarmiento, B. (2013). Oral Insulin Delivery: How Far are We? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 7(2), 520–531. <https://doi.org/10.1177/193229681300700228>
- Fonte, P., Araújo, F., Silva, C., Pereira, C., Reis, S., Santos, H. A., & Sarmiento, B. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1342–1354. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.010>
- García Montalbán, M. (2016). *Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda*. University of Murcia.
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids , Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 4(February), 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remuñán-López, C., Quaglia, F., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), 1736–1743. <https://doi.org/10.1021/bm9001377>
- Hakimi, O., Gheysens, T., Vollrath, F., Grahn, M. F., Knight, D. P., & Vadgama, P.

- (2010). Modulation of cell growth on exposure to silkworm and spider silk fibers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 92(4), 1366–1372. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32462>
- Hayes, R., Warr, G. G., & Atkin, R. (2015). Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 115(13), 6357–6426. <https://doi.org/10.1021/cr500411q>
- Hu, Y., Du, C., Li, Y., Fan, L., Li, X., Jurjanz, S., ... Kannan, K. (2015). A gold nanoparticle-based colorimetric probe for rapid detection of 1-hydroxypyrene in urine. *The Analyst*, 140(13), 4662–4667. <https://doi.org/10.1039/C5AN00722D>
- Huang, H., & Yang, X. (2003). Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 226(1–3), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00382-0)
- Huang, H., & Yang, X. (2004). Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 5(6), 2340–2346. <https://doi.org/10.1021/bm0497116>
- Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S. J. H., ... Parak, W. J. (2013). Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano*, 7(4), 3253–3263. <https://doi.org/10.1021/nn3059295>
- Jin, Y., Li, Z., Hu, L., Shi, X., Guan, W., & Du, Y. (2013). Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.018>
- Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U., & Hortaçsu, Ö. (2007). A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), 150–180. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.05.013>
- Korchagina, E. V., & Philippova, O. E. (2010). Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. *Biomacromolecules*, 11(12), 3457–3466. <https://doi.org/10.1021/bm100990u>
- Kundu, J., Chung, Y. Il, Kim, Y. H., Tae, G., & Kundu, S. C. (2010). Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.052>
- Laaksonen, T., Ahonen, P., Johans, C., & Kontturi, K. (2006). Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid-Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size. *ChemPhysChem*, 7(10), 2143–2149. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600307>
- Larguinho, M., & Baptista, P. V. (2012). Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics — From genomics to proteomics. *Journal of Proteomics*, 75(10), 2811–2823. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.007>
- Leal-Egaña, A., & Scheibel, T. (2010). Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(3), 155–167. <https://doi.org/10.1042/BA20090229>
- Leiva, A., Bonaridd, S., Pino, M., Saldías, C., Kortaberria, G., & Radić, D. (2015). Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. *European Polymer Journal*, 68, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.032>
- Linlin Wu, Chunsheng Shi, Liangfei Tian, and, & Zhu*, J. (2007). A One-Pot Method to Prepare Gold Nanoparticle Chains with Chitosan. <https://doi.org/10.1021/JP076733O>
- Lozano-Pérez, A. A., Montalbán, M. G., Aznar-Cervantes, S. D., Cragolini, F., Cenis,

- J. L., & VÍllora, G. (2015). Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *Journal of Applied Polymer Science*, *132*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.41702>
- Lu, J., Yan, F., & Texter, J. (2009). Advanced applications of ionic liquids in polymer science. *Progress in Polymer Science*, *34*(5), 431–448. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.12.001>
- Luo, Y., Teng, Z., Li, Y., & Wang, Q. (2015). Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.084>
- Mackerell, A., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R., Evanseck, J., & Field, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modelling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, *102*, 3586–3616.
- Mironov, A. V., Vikhoreva, G. A., Kil'deeva, N. R., & Uspenskii, S. A. (2007). Reasons for unstable viscous properties of chitosan solutions in acetic acid. *Polymer Science Series B*, *49*(1–2), 15–17. <https://doi.org/10.1134/S1560090407010046>
- Morariu, S., Brunchi, C. E., & Bercea, M. (2012). The behavior of chitosan in solvents with different ionic strengths. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *51*(39), 12959–12966. <https://doi.org/10.1021/ie301309g>
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., & Harding, S. E. (2009). Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach. *Carbohydrate Polymers*, *76*(4), 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.025>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1–2), 55–63.
- Mottaghitlab, F., Farokhi, M., Shokrgozar, M. A., Atyabi, F., & Hosseinkhani, H. (2015). Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, *206*, 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.020>
- Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Bhattacharya, S., Mishra, R., & Kundu, P. P. (2015). pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.040>
- Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D., & Kundu, P. P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, *37*(11), 1457–1475. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.004>
- Navarro-Fernández, J., Pérez-Sánchez, H., Martínez-Martínez, I., Meliciani, I., Guerrero, J., Vicente, V., ... Wenzel, W. (2012). In silico discovery of a compound with nanomolar affinity to antithrombin causing partial activation and increased heparin affinity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*, 6403–6412.
- Numata, K., & Kaplan, D. L. (2010). Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62*(15), 1497–1508. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.009>
- Ojea-Jiménez, I., & Puentes, V. (2009). Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: The role of citrate ions. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(37), 13320–13327. <https://doi.org/10.1021/ja902894s>
- Pamies, R., Cifre, J. G. H., Espín, V. F., Collado-González, M., Díaz Baños, F. G., & de la Torre, J. G. (2014). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline

- aqueous media. *Journal of Nanoparticle Research*, *16*(4), 2376. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2376-4>
- Pamies, R., Volden, S., Kjniksen, A.-L., Zhu, K., WR, G., & Nyström, B. (2010). Adsorption of Cationic Hydroxyethylcellulose Derivatives onto Planar and Curved Gold Surfaces. *Langmuir*, *26*, 15925:15932.
- Pinto, P. C. A. G., Costa, S. P. F., Lima, J. L. F. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2012). Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *80*, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.013>
- Popa-Nita, S., Alcouffe, P., Rochas, C., David, L., & Domard, A. (2010). Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms. *Biomacromolecules*, *11*(1), 6–12. <https://doi.org/10.1021/bm9012138>
- Prado-Gotor, R., López-Pérez, G., Martín, M. J., Cabrera-Escribano, F., & Franconetti, A. (2014). Use of gold nanoparticles as crosslink agent to form chitosan nanocapsules: Study of the direct interaction in aqueous solutions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *135*, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.005>
- Raftery, R. M., Tierney, E. G., Curtin, C. M., Cryan, S.-A., & O'Brien, F. J. (2015). Development of a gene-activated scaffold platform for tissue engineering applications using chitosan-pDNA nanoparticles on collagen-based scaffolds. *Journal of Controlled Release*, *210*, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.005>
- Regiel, A., Irusta, S., Kyzioł, A., Arruebo, M., & Santamaria, J. (2013). Preparation and characterization of chitosan–silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*, *24*(1), 15101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/1/015101>
- Rinaudo, M. (2006). Non-covalent interactions in polysaccharide systems. *Macromolecular Bioscience*, *6*(8), 590–610. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600053>
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature Protocols*, *6*(10), 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *Journal of Cell Biology*, *188*(6), 759–768. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910104>
- Sánchez-Linares, I., Pérez-Sánchez, H., Cecilia, J., & García, J. (2012). High-throughput behaviours of chitosan in aqueous solution. *Bioinformatics*, *13*(Suppl.1), S13.
- Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules*, *5*(5), 1882–1892. <https://doi.org/10.1021/bm049786+>
- Schatz, C., Lucas, J. M., Viton, C., Domard, A., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*, *20*(18), 7766–7778. <https://doi.org/10.1021/la049460m>
- Sheshkin, D. J. (2004). *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*.
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2016). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *17*(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>

- Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today*, 17(13), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>
- Sönnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J., & Alivisatos, A. P. (2005). A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nature Biotechnology*, 23(6), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nbt1100>
- Stolte, S., Matzke, M., Arning, J., Bösch, A., Pitner, W.-R., Welz-Biermann, U., ... Thöming, J. (2003). Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Aquat. Toxicol.*, 63(11), 43–63. <https://doi.org/10.1039/B711119C>
- Sun, C., Qu, R., Chen, H., Ji, C., Wang, C., Sun, Y., & Wang, B. (2008). Degradation behavior of chitosan chains in the “green” synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 343, 2595–2599.
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461.
- Utts, J. M., & Heckard, R. F. (2012). *Mind on statistics*.
- Valle-Delgado, J. J., Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F., Gálvez-Ruiz, M. J., Feiler, A., & Rutland, M. (2004). Interactions between bovine serum albumin layers adsorbed on different substrates measured with an atomic force microscope. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(7), 1482–1486. <https://doi.org/10.1039/B314060C>
- Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Gonçalves, A. M. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Coutinho, J. A. P. (2014). Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.003>
- Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a Biomaterial. *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>
- Wang, S., Xu, T., Yang, Y., & Shao, Z. (2015). Colloidal Stability of Silk Fibroin Nanoparticles Coated with Cationic Polymer for Effective Drug Delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*.
- Woitiski, C. B., Veiga, F., Ribeiro, A., & Neufeld, R. (2009). Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.002>
- Yan, L.-P., Silva-Correia, J., Ribeiro, V. P., Miranda-Gonçalves, V., Correia, C., da Silva Morais, A., ... Reis, R. L. (2016). Tumor Growth Suppression Induced by Biomimetic Silk Fibroin Hydrogels. *Scientific Reports*, 6(1), 31037. <https://doi.org/10.1038/srep31037>
- Yang, J., Han, S., Zheng, H., Dong, H., & Liu, J. (2015). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 123, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.029>
- Yavuz, M. S., Cheng, Y., Chen, J., Cobley, C. M., Zhang, Q., Rycenga, M., ... Xia, Y. (2009). Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nature Materials*, 8(12), 935–939. <https://doi.org/10.1038/nmat2564>
- Zakaria, H. M., Shah, A., Konieczny, M., Hoffmann, J. A., Nijdam, A. J., & Reeves, M. E. (2013). Small Molecule- and Amino Acid-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 29(25), 7661–7673. <https://doi.org/10.1021/la400582v>
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. Bin. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4880–4903.

<https://doi.org/10.3390/ijms16034880>

Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>