

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**NANOPARTÍCULAS DE ORO MULTIFUNCIONALIZADAS
PARA LA LIBERACIÓN DE UN PÉPTIDO ANTITUMORAL
MEDIADA POR FOTOTERMIA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Química por:**

RODRIGO ANDRÉS VÁSQUEZ CONTRERAS

Directores de Tesis
Dr. Marcelo Javier Kogan
Dra. Eyleen Araya Fuentes

SANTIAGO
2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

RODRIGO ANDRÉS VÁSQUEZ CONTRERAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen público rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo J. Kogan _____

Dra. Eyleen Araya Fuentes _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Nicolás Yutronic S. (Presidente) _____

Dra. Fanny Guzmán Q. _____

Dr. Cristian Tapia V. _____

Dr. Luis Marcelo Vilches H.. _____

Agradecimientos

Hay mucha gente que tiene un lugar en estas líneas, pero quisiera agradecer en particular a mi hermana por ayudar en este proceso y a mis sobrina Constanza, quien quizá aún no entiende por qué está acá, pero ha alegrado y vuelto más amena esta etapa.

A mis tutores, la Dra. Eyleen Araya y el Dr. Marcelo Kogan, quienes me han respaldado en este proceso muchas veces árido, y de quienes he aprendido mucho a nivel profesional. Y probablemente más importante, me han ayudado a ser una mejor persona tras esas largas conversaciones que se dieron en este período.

A mis compañeros de laboratorio, tanto a los presentes como a los que han tomado otros rumbos, a pesar de no haber compartido tanto se les agradece por esas charlas de pasillo y por su ayuda en distintas circunstancias.

A mis amigos de toda la vida, por acompañar, hacer reír al recordar antiguas anécdotas y hacer más llevadera esta etapa.

A mis padres, que mientras estuvieron incentivaron mi avanzar y como algunos saben han motivado este trabajo, no soy el doctor que alguna vez dije que sería, pero creo que de alguna manera podré ayudar a la gente, tal como alguna vez les dije.

A la comisión, por las críticas constructivas al trabajo y disposición para ayudarme a lo largo de estos años.

Finalmente, a todos aquellos que de alguna manera estuvieron conmigo y saben que no los olvido expofeso, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Listado de Abreviaturas	V
Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tablas.....	XIII
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV
Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos.....	1
1.1. Cáncer.....	2
1.2. Péptidos y nanotecnología para el direccionamiento de fármacos.	4
1.3. Nanopartículas de oro.....	6
1.4. Resonancia de plasmón superficial en AuNPs	7
1.5. Estabilidad coloidal de nanopartículas de oro	11
1.6. Uso de AuNPs para la liberación espacial y temporalmente de fármacos.....	13
1.7. Uso de espaciadores unidos covalentemente a AuNPs para la liberación controlada espacial y temporalmente de agentes activos	15
1.8. Uso del péptido BH3 como potencial agente antitumoral en la terapia contra el cáncer	17
1.9. Uso de biomoléculas para el direccionamiento activo de nanopartículas de oro	19
1.10. Hipótesis	23
1.11. Objetivos Generales	24
1.12. Objetivos Específicos.....	24
Capítulo 2: Metodología de síntesis de nanobarras de oro y diseño de modelo de liberación.	26

2.1. Síntesis de nanobarras de oro (GNRs).....	27
2.2. Caracterización de los GNR	29
2.2.1. Espectrofotometría de Absorción Molecular	29
2.2.2. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	29
2.2.3. Potencial Z (pZ)	29
2.2.4. Microscopía electrónica de Barrido-Transmisión (STEM).....	30
2.3. Carboxifluoresceína como modelo de liberación desde los GNR	30
2.3.1. Reactivos y disolventes	32
2.3.2 Síntesis de amidas y uso de activadores.....	32
2.3.3. Síntesis de aductos de Diels-Alder	33
2.3.4. Síntesis del Dieno (1)	34
2.3.5. Síntesis de espaciadores (Dienófilos 2 y 3)	36
2.3.6. Síntesis de aductos Diels-Alder de CF (compuestos 4 y 5).....	38
2.3.7. Conjugación de GNR con aductos de Diels-Alder de CF	39
2.3.8. Determinación del número de moléculas conjugadas al GNR	40
2.3.9. Estabilidad de los GNRs funcionalizados con 4 o 5	41
2.3.10. Mediciones de Raman y Dispersión Raman aumentada por superficie (SERS)	41
2.3.11. Determinación de la liberación fototérmica desde GNRs-4, GNRs-5.....	42
Capítulo 3: Resultados y discusión: síntesis de nanobarras de oro y diseño de modelo de liberación.	44
3.1. Síntesis de nanobarras de oro (GNR)	45
3.2. Síntesis de los aductos de Diels-Alder derivado de carboxifluoresceína	50
3.2.1. Síntesis del derivado de carboxifluoresceína	50
3.2.2. Síntesis de espaciadores	52
3.2.3. Síntesis de aductos de Diels-Alder de CF (compuestos 4 y 5)	58
3.3. Funcionalización de GNRs con los aductos 4 y 5	60
3.4. Estudio de la orientación de los aductos en los GNRs funcionalizados	65
3.5. Liberación fototérmica del fluoróforo desde GNRs4 y GNRs-5.....	71
Capítulo 4: Metodología de síntesis de péptidos y liberación de BH3 mediante	

irradiación	77
4.1. Síntesis de péptidos	78
4.2. Tests de identificación grupos funcionales en péptidos	79
4.2.1. Test cualitativo de Kaiser o ninhidrina	79
4.2.2. Test de cloranoilo	80
4.3. Metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida	80
4.3.1. Incorporación del primer aminoácido	81
4.3.2. Determinación del grado de unión del primer aminoácido:	82
4.3.3. Eliminación del grupo protector Fmoc	83
4.3.4. Incorporación de los aminoácidos	83
4.3.5. Eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y liberación del péptido de la resina.	85
4.3.6. Liberación del péptido con sus aminoácidos protegidos de la resina.	87
4.4. Formación del BH3-aducto Diels-Alder.	89
4.4.1. Reacción de Diels-Alder entre furfurilamina y los espaciadores	89
4.4.2. Reacción de Diels-Alder en fase sólida	90
4.4.3. Síntesis de BH3-furfurilamida (BH3-FAM).....	91
4.4.2. Desprotección de los grupos laterales del péptido BH3-FAM.....	92
4.4.3. Síntesis de aductos Diels-Alder de BH3-FAM (compuestos 6 y 7)	94
4.5. Funcionalización de los GNRs con los péptidos TAT, DV3 y BH3-aducto Diels-Alder	95
4.6. Determinación de la liberación fototérmica desde GNRs funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y aducto de BH3	95
4.7. Evaluación de los efectos de las nanopartículas y del producto de irradiación sobre la viabilidad celular en células tumorales HeLa.	97
Capítulo 5: Resultados y discusión: síntesis de péptidos y liberación de BH3	
mediante irradiación	99
5.1. Síntesis e identificación de los péptidos TAT, DV3 y BH3-Boc protegido.....	100
5.1.1 Síntesis de los péptidos TAT, DV3 y BH3.....	100
5.2. Formación de BH3-aducto Diels-Alder.....	108

5.2.1. Síntesis e identificación de BH3-furfurilamida (BH3-FAM).	108
5.2.2. Síntesis de aductos Diels-Alder de BH3-FAM (compuestos 6 y 7)	110
5.3. Funcionalización de los GNRs-CTAB con los péptidos TAT, DV3 y el aducto de BH3 (Compuesto 6) para obtener GNRs-6	112
5.4. Determinación de la liberación fototérmica de BH3-FAM desde GNRs-6 funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y aducto de BH3.	115
5.5. Evaluación del efecto del péptido BH3 liberado por la irradiación de las nanopartículas multifuncionalizadas sobre la citotoxicidad de células HeLa	120
Capítulo 6: Conclusiones y proyecciones	122
6.1. Conclusiones	123
6.2. Proyecciones	124
Referencias	125

Listado de Abreviaturas

2CTC: 2-Chlorotriyl chloride

AuNE: Nanoesferas de oro

AuNPs: Nanopartículas de oro

Boc: tert-Butyloxycarbonyl

CF: Carboxifluoresceína

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DCM: Diclorometano

DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida

DIEA: Diisopropiletilamina

DLS: Dispersión dinámica de la luz

DMF: N,N'-Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPR: Enhanced permeation and retention

FAM: Furfurilamida

Fmoc: Fluorenylmethoxycarbonyl

FR: Receptor de folato

Gln: Glutamina

GNRs: Nanobarras de oro

HBTU:(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium

hexafluorophosphate, Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium)

His: Histidina

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

ICP-OES: Espectrofotometría de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo

LSPR: Resonancia de plasmón superficial localizada

MALDI-TOF: Desorción-Ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo.

NIR: Infrarrojo cercano

NPs: Nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

Oxyma-Pure®: Cianhidroxiiiminoacetato de etilo

PUMA: Modulador de apoptosis sobre-regulado por p53

RMN: Resonancia magnética nuclear

SERS: Dispersión Raman aumentada por superficie

STEM: Microscopía electrónica de transmisión con unidad de barrido

tBu: terbutil

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: Triisopropilsilano

Índice de Figuras

Figura 1: Representación esquemática de los mecanismos de direccionamiento de nanopartículas hacia los tumores. El direccionamiento pasivo se produce por el efecto EPR, mientras que el direccionamiento activo se consigue funcionalizando las nanopartículas con ligandos que permitan el reconocimiento por parte de las células.....	5
Figura 2: Ejemplos de nanopartículas de oro usadas en diagnóstico y tratamiento. (Imagen adaptada de Ajnai et al.).....	7
Figura 3: Origen del LSPR. a) Los electrones de la banda de conducción del metal interactúan con la luz incidente, produciéndose la resonancia en la misma frecuencia que la luz incidente. b. Dependencia del desplazamiento plasmónico con la forma y simetría de las AuNP, observada por espectroscopía UV-Vis-NIR.....	8
Figura 4: Mecanismo de conversión de luz en calor por parte de nanopartículas plasmónicas. Figura realizada por Webb and Bardhan.....	9
Figura 5: Perfil espectral de las especies con mayor absorción de luz (Hb: hemoglobina, HbO ₂ : oxihemoglobina, H ₂ O: agua) dentro de la primera ventana biológica.....	10
Figura 6: Potencial Z. El plano de corte está representado por el círculo gris, y la letra C. La línea roja representa el radio de la partícula. Sobre la línea verde, K^{-1} es la longitud de Debye, y el potencial Z es el potencial eléctrico a la distancia C.....	12
Figura 7: Distribución de bicapa de CTAB respecto a la superficie de oro. En magenta: iones Br ⁻ . (Imagen obtenida desde modelo teórico).....	13
Figura 8: Esquema de los métodos de liberación fototérmica de fármacos. a) El fármaco (en verde) está inserto en una matriz polimérica que rodea a la nanopartícula. b) Fármaco y nanopartícula están embebidos en liposomas. c) El fármaco es unido covalentemente a un espaciador, unido a su vez a la nanopartícula. d) El fármaco no está unido covalentemente a la nanopartícula.....	15

Figura 9: Liberación de fluoresceína desde la superficie de AuNP- <i>coreshell</i> mediante efecto fototérmico.....	16
Figura 10: Dominio efector de la proteína transactivadora de transcripción que ha mostrado tener la capacidad de transportar moléculas al interior de la célula con una alta efectividad a través de macropinocitosis.....	21
Figura 11: Internalización vía endocitosis del péptido DV3 mediada por el receptor CXCR4.....	22
Figura 12: Esquema resumen de la propuesta de trabajo. En ésta se sintetizaron GNRs, las cuales fueron funcionalizadas con los péptidos DV3, TAT y BH3, siendo este último modificado para permitir su unión a los GNRs mediante un espaciador que contiene un aducto de Diels-Alder. Finalmente, este sistema es irradiado con láser para producir el efecto fototérmico en las nanopartículas y que el calor liberado permita producir la reacción de retro-Diels-Alder y así liberar de modo exclusivo al péptido antitumoral BH3.....	23
Figura 13: Síntesis de GNR por crecimiento de semillas.....	28
Figura 14: Esquema de irradiación de los GNR-CF y liberación de la CF. La CF está unida a los GNR a través de un espaciador de dos largos diferentes. Las muestras fueron irradiadas a 808 nm.....	31
Figura 15: Esquema de síntesis de amidas mediante activación con HBTU.....	33
Figura 16: Esquema de síntesis del aducto de Diels-Alder-Carboxifluoresceína.....	34
Figura 17: Esquema de síntesis de la carboxifluoresceína-furfurilamida (1).....	35
Figura 18: Esquema de síntesis del compuesto 3	37
Figura 19: Esquema de síntesis del compuesto 4	37
Figura 20: Esquema de síntesis del compuesto 5	38
Figura 21: Espectro de absorción molecular característico para GNRs-CTAB (espectro representativo).	39
Figura 22: Espectro de absorción molecular característico para GNRs-CTAB (espectro representativo).	46
Figura 23: Microscopía electrónica de GNRs. A) Micrografía electrónica de GNRs	

obtenidas por crecimiento de semillas, donde la regla (en celeste) corresponde a 100 nm y B) Histograma de relación de aspectos.	46
Figura 24: Distribución de tamaños característica para GNRs-CTAB obtenida mediante DLS.	47
Figura 25: Distribución de carga superficial de las GNRs-CTAB.....	49
Figura 26: Esquema de síntesis del derivado de carboxifluoresceína (1). i: HBTU, DIEA, DMF, 0 °C, 15 min. ii: Furfurilamina, t.a., 12 h.....	50
Figura 27: HPLC y HPLC-MS del compuesto (1). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 20 min (A = 0.1% ác. fórmico en H ₂ O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.....	51
Figura 28: Esquema de síntesis de los espaciadores (2) y (3) (n = 4 o 9 respectivamente). i: Cistamina clorhidrato, DMF, 4 °C. ii: HBTU, DIEA, temperatura ambiente, 72 h.....	52
Figura 29: HPLC y HPLC-MS del compuesto (2). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H ₂ O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.....	53
Figura 30: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 1.30 (m, 4H); 1.57-1.70 (m, 8H); 2.21 (t, J = 7.5 Hz, 4H); 2.83 (t, J = 6.4 Hz, 4H); 3.51 (t, J = 7.2 Hz, 4H); 3.56 (q, J = 6.3 Hz, 4H); 6.37 (s, 2H); 6.69 (s, 4H). Espectro de ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 173.19 (3, 15); 170.80 (9,12,21,24); 134.03 (10,11,22,23); 38.33 (2,14); 37.78 (8,20); 37.59 (4,16); 36,20 (1,13); 28.22 (7,19); 26.27 (5,17); 25.00 (6,18).	54
Figura 31: HPLC y HPLC-MS del compuesto (3). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H ₂ O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.	56
Figura 32: ¹ H-RMN (400 MHz, DMSO): δ 1.15 (s, 24H); 1.40 (m, 8H); 1.98 (t, J = 7.3,	

4H); 2.69 (t, J = 6.6 Hz, 4H); 3.24 (q, J = 6.5 Hz, 4H); 3.31 (t, J = 7.0, 4H); 6.93 (s, 4H); 7.87 (s, 2H). ¹³ C-RMN (400 MHz, DMSO): δ 172.76 (3,20); 171.53 (14,17,31,34); 134.90 (15.16.32.33); 38.32 (2,19); 37.85 (13,30); 37.50 (4,21); 35.81 (1,18); 29.31 (8,9,25,26); 29.21 (7,24); 29.09 (10,27); 28.94 (6,23); 28.36 (11,28); 26.58 (5,22); 25.68 (12,29).....	57
Figura 33: Esquema de formación de los aductos de Diels-Alder.....	58
Figura 34: HPLC y HPLC-MS del compuesto (3). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 40 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H ₂ O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.....	59
Figura 35: HPLC y HPLC-MS del compuesto (5). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 40 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H ₂ O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.....	60
Figura 36: Espectros UV-Vis-NIR de GNRs antes y después de funcionalización con los aductos de Diels-Alder.	62
Figura 37: Esquema de la forma geométrica de los GNRs y cálculo de área superficial.....	64
Figura 38: Espectros Raman de los compuestos (4) y (5) antes (en rojo) y después (en negro) de conjugar sobre nanobarras de oro.....	66
Figura 39: Esquema hipotético de la orientación de (4) perpendicular y (5) inclinado sobre la superficie de los GNR.....	71
Figura 40: Perfil de liberación del compuesto (1) desde los GNRs conjugados mediante calentamiento.....	72
Figura 41: Perfil de liberación del compuesto (1) desde la superficie de las nanobarras mediante fototermia irradiando las nanobarras con un láser de 808 nm (350 mW).....	72
Figura 42: Espectro de masas del compuesto liberado desde los GNRs. La masa	

observada corresponde al derivado de carboxifluoresceína.....	73
Figura 43: Espectros Raman de GNRs-4 y GNRs-5 antes y después de irradiar.....	74
Figura 44: Espectro UV-Vis-Nir de GNRs-4 antes y después de irradiar.....	75
Figura 45: Equipo empleado para la síntesis de péptidos en fase sólida.....	78
Figura 46. Representación de la unión del primer aminoácido a la resina.....	82
Figura 47: Estructura del péptido TAT.....	86
Figura 48: Estructura del péptido DV3.....	87
Figura 49: Estructura del péptido BH3 protegido. En la forma abreviada las cadenas laterales y sus grupos protectores se denotan con R e Y, en azul y verde respectivamente.....	88
Figura 50: Esquema de reacción de Diels-Alder entre furfurilamina y espaciadores.....	90
Figura 51: Esquema de reacción de Diels-Alder en fase sólida entre furfurilamina y los ácidos maleimidoheptanoico o maleimidoundecanoico.....	91
Figura 52: Esquema de síntesis del péptido BH3-FAM protegido.....	92
Figura 53: Esquema de eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales (Y) del péptido BH3-FAM.....	93
Figura 54: Esquema de síntesis de los aductos de Diels-Alder entre el péptido BH3-FAM y los espaciadores 2 y 3 (n = 4 y 9, respectivamente)	94
Figura 55: Sistema de irradiación. La muestra, que se encuentra en el tubo, es irradiada longitudinalmente con un láser de 808 nm y de 350 mW de potencia.....	96
Figura 56: evaluación de los efectos de BH3-FAM (proveniente de la irradiación de GNRs-6), BH3, y GNRs-6 sobre células HeLa.....	97
Figura 57: Mecanismo de reacción entre un aminoácido y la resina cloruro de 2-clorotritilo.....	100

Figura 58: Mecanismo de reacción del test de ninhidrina con un aminoácido. La coloración azul denota la presencia de una amina primaria libre.....	102
Figura 59: Esquema de reacción entre cloranilo y prolina. La coloración azul-verdosa indica la presencia de una amina secundaria desprotegida.....	102
Figura 60: Mecanismo de la reacción que conduce a la eliminación del grupo Fmoc con piperidina.....	103
Figura 61: a) Estructura de la secuencia peptídica de TAT (Masa molar: 1662 g/mol). b) Rt del péptido TAT a 15 min. c) Espectro de masas de TAT, con los iones cuasimoleculares $[M+2H/2]^+$ y $[M+3H/3]^+$	104
Figura 62: a) Estructura de la secuencia peptídica de DV3 (Masa molar: 1268 g/mol). b) Rt del péptido DV3 a 15 min. c) Espectrometría de masas correspondiente al ion molecular $[M+H]^+$ de 1269 y el fragmento $[M+2H/2]^+$ de 636.....	106
Figura 63: a) Estructura de la secuencia peptídica del BH3-Boc protegida con una masa molecular de 2721 g/mol. b) MALDI-MS correspondiente a la masa del péptido.....	107
Figura 64: a) Estructura de la secuencia peptídica del BH3-FAM con una masa molecular de 1544 g/mol. b) Rt del péptido BH3-FAM a 10 minutos. c) Fragmentos correspondientes al $[M+2H/2]^+$ de 773 y $[M+3H/3]^+$ de 516.....	109
Figura 65: Esquema de síntesis de los aductos de Diels-Alder (compuestos 6 y 7) entre BH3-FAM y los dienófilos de distinta longitud (compuestos 2 y 3).....	110
Figura 66: a) Estructura del compuesto 6. b) Rt del compuesto, ubicado alrededor de los 10 min. c) Espectro de masas, donde se observa el ion correspondiente a $[M + 4H/4]^+$ de 907 g/mol.....	111
Figura 67: Estructura del compuesto formado por la unión de un equivalente del péptido BH3-FAM al compuesto 2.....	112
Figura 68: Esquema de unión de los péptidos TAT, DV3 y el compuesto 6	

funcionalizados sobre la superficie del GNR.....	113
Figura 69: Espectros UV-Vis de GNRs antes y después de funcionalizar. GNRs-6 están funcionalizados con TAT, DV3 y BH3-FAM.....	114
Figura 70: Distribución de carga superficial de GNRs funcionalizados.....	115
Figura 71: Esquema de la irradiación de GNRs-6. En el costado derecho se muestra en rojo el producto liberado mediante la reacción de retro-Diels-Alder.....	116
Figura 72: Espectrometría de masas MALDI del sobrenadante obtenido después de la irradiación. Se observa el valor de 1544, asociado al compuesto BH3-FAM.....	117
Figura 73: Espectros UV-Visible de GNRs-6 con péptidos antes y después de irradiar. Se observa un desplazamiento hipsocrómico en los GNR irradiados.....	118
Figura 74: Potencial Z de GNRs-6 resuspendidos posterior a la irradiación con láser.....	118
Figura 75: Micrografía de STEM de GNRs irradiados.....	119
Figura 76: Ensayo de viabilidad de MTT. Se evaluaron los efectos de GNRs-6 1nM, BH3 2.5 μ M, sobrenadante de GNTs-6 irradiados con un láser de 808 nm y 350 mW por 24 h. Los datos fueron obtenidos al menos en triplicado, con un n = 12.....	121

Índice de Tablas

Tabla 1: Caracterización de GNR mediante DLS y Potencial Zeta.....	63
Tabla 2: Señales Raman de los compuestos (4) y (5) libres y funcionalizados a GNR (SERS).....	67
Tabla 3: Método de eliminación del grupo Fmoc.....	83
Tabla 4: Método de acoplamiento de aminoácidos.....	84

Resumen

El cáncer se ha constituido en los últimos años en la principal causa de muerte en nuestro país. Su tratamiento, además de ser poco eficiente, genera efectos secundarios graves. Por esto resulta importante el desarrollo de terapias que permitan el tratamiento sin afectar a tejidos aledaños sanos. Una posibilidad en este sentido es el uso de péptidos antitumorales, los cuales poseen una alta efectividad terapéutica pero no poseen una buena llegada a la diana biológica. Así surge el interés de utilizar nanobarras de oro (GNRs) para diseñar un sistema que permita liberar de forma espacial y temporalmente controlada un péptido antitumoral mediante fototermia. En esta tesis con el fin de desarrollar un modelo de estudio se sintetizaron GNRs, los cuales inicialmente fueron funcionalizados con dos espaciadores termolábiles de distinta longitud unidos a un fluoróforo, para así producir la liberación desde la superficie de las GNRs al ser irradiadas. Posteriormente se construyó un sistema donde los GNRs son conjugados con los péptidos DV3, TAT, que tienen como función el direccionamiento e internalización respectivamente, y el péptido antitumoral BH3 unido a un espaciador termolábil que contiene a un aducto de Diels-Alder. Este sistema fue irradiado y se comprobó que el efecto fototérmico permite liberar de manera exclusiva al agente antitumoral (BH3) mediante la reacción de Retro-Diels-Alder. Finalmente, se realizaron evaluaciones de citotoxicidad en células HeLa, las cuales indican que la nanobarra conjugada no produce una

disminución significativa de la viabilidad celular. En cambio, si estas nanobarras se irradian con un láser NIR se libera el péptido BH3 disminuyendo la viabilidad celular.

Abstract

Cancer has become the leading cause of death in our country in recent years. Its treatment, in addition to being inefficient, generates serious side effects. For this reason, it is important to develop therapies that allow the treatment to be produced without affecting healthy surrounding tissues. One possibility in this sense is the use of antitumor peptides, which have a high therapeutic effectiveness but do not have a good arrival at the biological target. Thus arises the interest of using gold nanorods (GNRs) to design a system that allows the spatial and temporal controlled release of an antitumor peptide by photothermal therapy. In this thesis, GNRs were synthesized, which were initially functionalized with two thermolabile spacers of different lengths attached to a fluorophore, in order to generate a release profile from the surface of the GNRs when irradiated. Subsequently, a system was built where the GNRs are conjugated with the peptides DV3, TAT, with a targeting and internalization function, respectively, and the antitumor peptide BH3 linked to a spacer. This system was irradiated, and it was found that the photothermal effect allows the exclusive release of the antitumor agent through the Retro-Diels-Alder reaction. Finally, cytotoxicity evaluations were carried out in HeLa cells, which indicate

that the conjugated nanorod does not produce a significant decrease in cell viability without irradiation. In contrast when the functionalized nanoparticles were irradiated the released peptide BH3 produce a diminution on the cell viability.

Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos

1.1. Cáncer

El «Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se le denomina como «tumores malignos» o «neoplasias malignas». La característica que define esta patología es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis, etapa en la cual se producen la mayoría de los decesos asociados a esta enfermedad. Así, el cáncer se ha posicionado como una importante causa de muerte y en un factor que limita el alza de la esperanza de vida en el mundo. De acuerdo a estimaciones de la Organización mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer se sitúa como la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países, y se ubica con la tercera o cuarta posición en 23 países más.^[1] En el caso de Chile, durante el en el año 2019 las defunciones asociadas a los diversos tipos de neoplasias alcanzaron la cifra de 28.492 personas, lo cual torna al cáncer como la principal causa de muerte nacional, con un 26% del total de decesos inscritos.

Las mutaciones que conducen a la formación de tumores cancerosos pueden ser producidas por numerosos factores, tales como alteraciones en el ADN por factores ambientales (contaminantes, carcinógenos, radiación de alta energía), mutaciones azarosas que no son corregidas apropiadamente, alteraciones

epigenéticas o infecciones virales. Estas mutaciones también pueden ser heredadas de los progenitores y aumentadas por procesos inflamatorios.^[2]

Para lidiar con los significativos problemas de salud que representa el cáncer, se han diseñado tratamientos apropiados mediante la investigación médica y científica. De estos, resultan ser los más utilizados a nivel clínico la quimioterapia, radioterapia, agentes moleculares específicos y las terapias quirúrgicas.^[3] El inconveniente que presentan este tipo de terapias es el de poseer una baja especificidad, por lo cual a menudo dañan tejidos adyacentes sanos, lo que finalmente incide tanto en la calidad de vida como en las tasas de sobrevivencia de los pacientes. En particular, la quimioterapia se ha mantenido como la alternativa más utilizada para el tratamiento del cáncer a pesar de los severos efectos secundarios que frecuentemente produce.^[4]

Así, queda manifiesta la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos antitumorales, así como aumentar la eficacia de los ya existentes. En relación a esto último, se han llevado a cabo varios estudios enfocados a generar una entrega eficiente de los medicamentos ya existentes, de modo de disminuir los efectos secundarios derivados de su baja especificidad, incrementando así su eficiencia terapéutica.

1.2. Péptidos y nanotecnología para el direccionamiento de fármacos.

Dentro de las múltiples posibilidades estudiadas para el direccionamiento de sistemas hacia los tumores, los péptidos han ganado un interés importante debido a su pequeño tamaño y la posibilidad de síntesis a grandes escalas. Los péptidos y proteínas exhiben una potencia excepcionalmente alta en pruebas *in vivo*, mostrando un alto grado de especificidad hacia sus objetivos, con relativamente pocos efectos secundarios.^[5] Sin embargo, estas ventajas se ven opacadas por algunos inconvenientes significativos, tales como su estabilidad *in vivo*. Tienen poca o nula resistencia a la fragmentación producida por proteasas séricas, así también como una corta vida media, baja biodisponibilidad y desafíos en cuanto a su producción y manufactura.^[6]

En este sentido, la nanomedicina provee grandes oportunidades para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer mediante el desarrollo de la nanotecnología. Los materiales obtenidos en este contexto, denominados en general como nanopartículas (NPs), presentan una serie de ventajas siendo una de las principales que debido a sus dimensiones^[7,8], pueden llegar a acumularse en tejidos tumorales debido al fenómeno de aumento de la permeabilidad y retención (EPR: *del inglés Enhanced Permeability and Retention*) que se da en los tumores a partir de su vascularización defectuosa sumado a un pobre drenaje linfático.^[9]

En relación con el efecto EPR las nanopartículas por su tamaño pueden

distribuirse por diferentes partes del organismo y acumularse selectivamente en tumores ya que estos tejidos presentan una alta permeabilidad debida a la presencia de anomalías en el endotelio y a un retorno venoso disminuido lo que permite que las nanopartículas sean retenidas allí por mayores tiempos respecto a lo que sucede en tejidos sanos. De esta manera es posible realizar lo que se denomina un direccionamiento pasivo de fármacos unidos a las nanopartículas^[10]. Por otra parte, las nanopartículas pueden funcionalizarse con moléculas que reconocen receptores sobreexpresados en células tumorales tal como es el caso del ácido fólico que puede unirse a receptores sobreexpresados en diferentes células tumorales, lo que se conoce como direccionamiento activo.^[11] (figura 1)

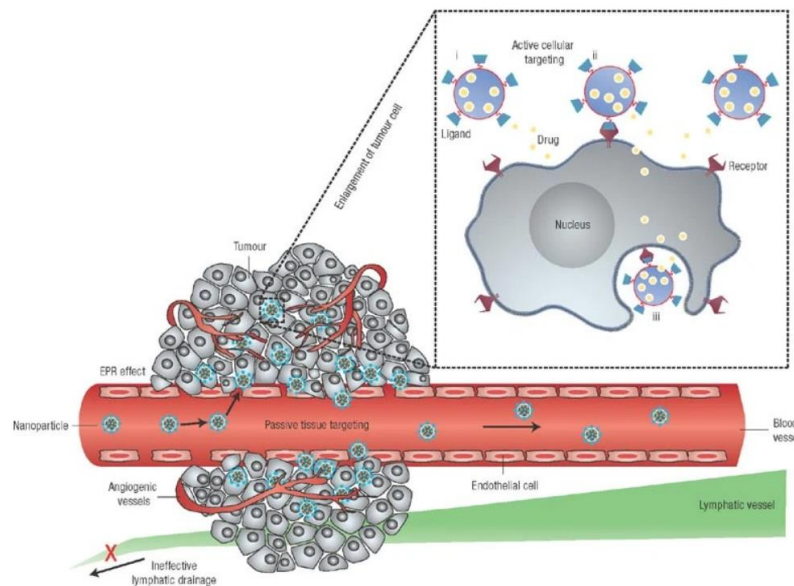


Figura 1: Representación esquemática de los mecanismos de direccionamiento de nanopartículas hacia los tumores. El direccionamiento pasivo se produce por el efecto EPR, mientras que el direccionamiento activo se consigue funcionalizando las nanopartículas con ligandos que permitan el reconocimiento por parte de las células.^[10]

1.3. Nanopartículas de oro

Entre los diversos tipos de nanopartículas que se pueden obtener, las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido ampliamente empleadas en diversas áreas de la biomedicina tales como en imagenología, biosensores y entrega de fármacos. Dichas aplicaciones son atribuidas debido a que poseen características físicas y químicas particulares. Entre éstas se encuentran el poseer una elevada área superficial y ser fácilmente funcionalizables, lo cual permite conjugar una gran variedad de moléculas, como pueden ser fármacos, polímeros o péptidos. Además, tienen la capacidad de penetrar membranas celulares mediante diversos mecanismos de internalización. Finalmente, aunque no menos importante, este tipo de nanomaterial posee propiedades ópticas inducidas por el denominado efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*).

Las AuNPs pueden ser obtenidas en variadas formas mediante el uso de estrategias de síntesis. Dentro de éstas las que han sido utilizadas con mayor frecuencia en aplicaciones biomédicas son las nanoesferas, nanobarras, nanoshells, nanojaulas y nanoprismas.^[12,13] Imágenes representativas de estas estructuras se muestran en la figura 2:

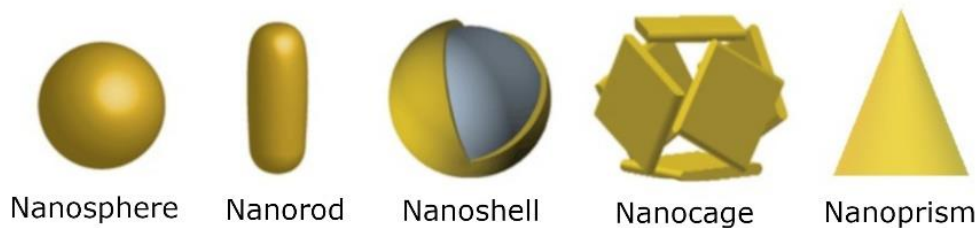


Figura 2: Ejemplos de nanopartículas de oro usadas en diagnóstico y tratamiento. Imagen adaptada de Ajnai et al. ^[12]

1.4. Resonancia de plasmón superficial en AuNPs

Las particulares propiedades de las AuNPs son generadas por la oscilación colectiva de los electrones ubicados en la superficie de la nanopartícula, los cuales corresponden a la banda de conducción del metal.^[14] Cuando esta nube de electrones interactúa y resulta desplazada por el campo eléctrico de la luz, la fuerza restauradora, correspondiente a la atracción coulombica de los electrones hacia los núcleos de la red cristalina, establece una condición de resonancia en una región del espectro relativamente estrecha, la cual es denominada como Resonancia localizada del plasmón superficial (LSPR, del inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*) o plasmón superficial.^[15] En el caso de nanopartículas que poseen esta propiedad, la excitación del plasmón superficial genera intensos campos electromagnéticos en la superficie de la nanopartícula, que exceden por mucho la intensidad del campo de la luz incidente. ^[16]

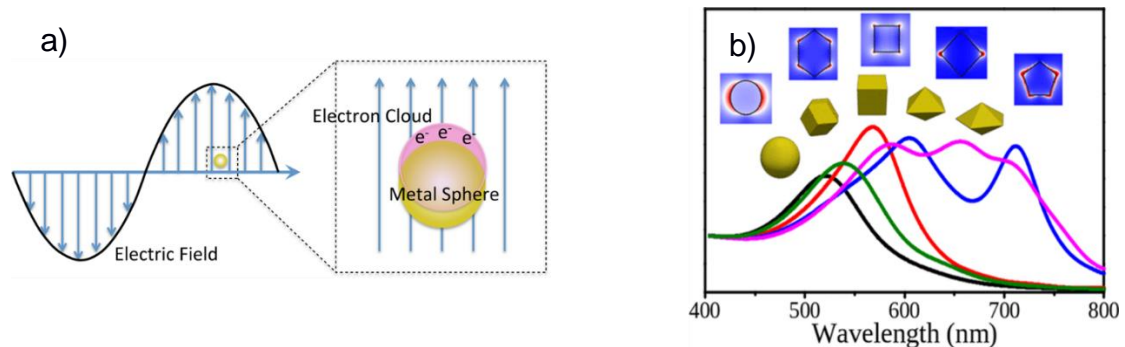


Figura 3: Origen del LSPR. a) Los electrones de la banda de conducción del metal interactúan con la luz incidente, produciéndose la resonancia en la misma frecuencia que la luz incidente.^[16] b. Dependencia del desplazamiento plasmónico con la forma y simetría de las AuNP, observada por espectroscopía UV-Vis-NIR.^[14]

La densidad de la nube electrónica en la superficie de la nanopartícula es dependiente del tamaño, forma, composición y entorno, lo que afecta directamente en la ubicación del plasmón superficial dentro del espectro electromagnético.^[17] En el caso de las nanoesferas de oro (AuNE) se observa una fuerte banda de absorción en la región visible, aproximadamente a 520 nm (línea negra en la figura 3 de arriba) debido a que la frecuencia de la radiación electromagnética incidente resuena con la oscilación colectiva de los electrones de conducción en esa longitud de onda, lo que produce la transmisión de los tonos rojizos que se observan en las suspensiones de nanopartículas esféricas.^[18]

A modo de contraste, en el caso de AuNPs anisotrópicas, como es el caso de nanopartículas con forma de barras o prismas, se observa la aparición de más de una banda. En particular, las nanobarras de oro (GNRs) poseen dos

bandas de resonancia plasmónica, las cuales están en correspondencia con los electrones resonantes de las bandas transversal y longitudinal.^[19] Dichas interacciones ocurren mayoritariamente en longitudes de onda dentro del rango visible (Vis) e infrarrojo cercano (NIR).^[20] El decaimiento de la excitación del plasmón se da principalmente por dos mecanismos: radiativo y no radiativo, lo que finalmente conduce a la dispersión y absorción lumínica, respectivamente. La dispersión de la luz producida por AuNPs ha sido usada extensivamente como herramienta de diagnóstico, medio de contraste y sonda de intensificación para Raman.^[21–23] Por otra parte, la absorción lumínica involucra relajación mediante colisiones entre electrones, o bien mediante acoplamientos electrón-fonón, lo que finalmente conduce a la conversión de luz en calor.^[24,25] (Figura 4)

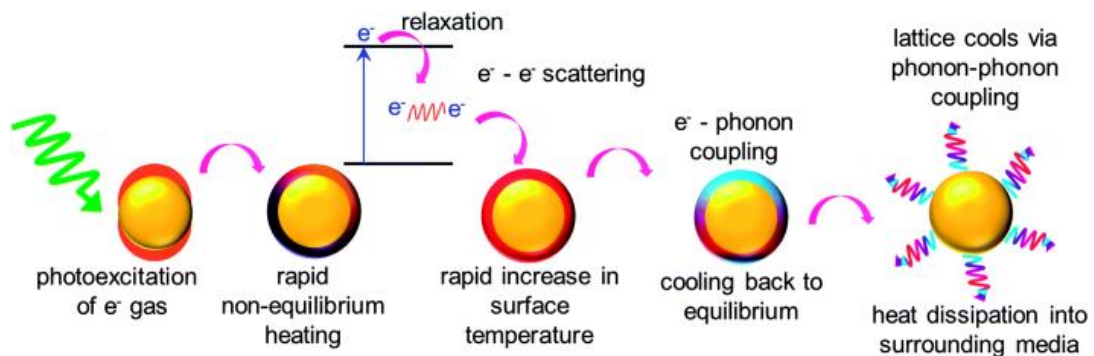


Figura 4: Mecanismo de conversión de luz en calor por parte de nanopartículas plasmónicas. Figura realizada por Webb and Bardhan.^[25]

Esta disipación localizada de la radiación absorbida ha sido utilizada para producir la destrucción selectiva de células malignas o de agregados tóxicos

proteicos, esto sin afectar tejidos aledaños sanos.^[26-30] En este sentido, los GNRs poseen la banda plasmónica longitudinal situada en la zona del infrarrojo cercano donde se ubica la primera ventana biológica, región en la que las moléculas presentes en el sistema exhiben mínimos de absorción, del modo indicado en la figura 5, lo cual posiciona a los GNRs como sistemas atractivos para aplicaciones biomédicas.^[31]

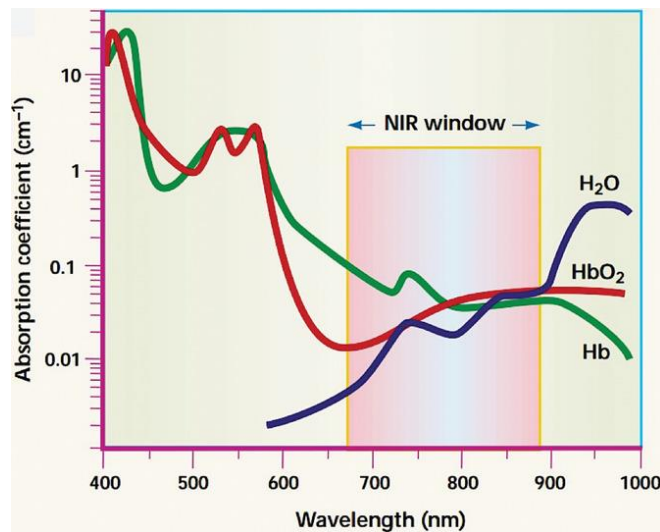


Figura 5: Perfil espectral de las especies con mayor absorción de luz (Hb: hemoglobina, HbO₂: oxihemoglobina, H₂O: agua) dentro de la primera ventana biológica. Extraída de la referencia^[31]

No obstante, lo anterior, y a pesar de estas interesantes propiedades, se han realizado diversos estudios sobre los potenciales efectos tóxicos de los GNRs, su biodistribución y su penetración celular.^[32] En general se considera a las AuNPs como no tóxicas, sin embargo, en ciertos casos y dependiendo de la dimensión física, la superficie química y su forma pueden presentar ciertos

efectos nocivos. Particularmente, el recubrimiento de las AuNPs juega un importante rol en la estabilidad y la toxicidad que estas puedan exhibir. Éste varía según el proceso de síntesis realizada para cada tipo de estructura, y para el caso de los GNRs, se ha observado que el surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que permite tanto el crecimiento anisotrópico de las GNRs así como su estabilización coloidal es responsable de la citotoxicidad observada en estas nanoestructuras.^[33]

1.5. Estabilidad coloidal de nanopartículas de oro

Las dispersiones de AuNPs se engloban dentro de los denominados coloides liofóbicos, lo cual implica que son termodinámicamente inestables, en contraste con lo observado en los coloides liofílicos donde la dispersión es más estable que los componentes. Esto implica que eventualmente se producirá la separación de las fases, esto es, las AuNPs se agregarán, flocularan o coagularán.^[34]

Uno de los principales factores que interviene en el grado de estabilidad coloidal de las nanopartículas es el potencial zeta, el cual corresponde a la diferencia de potencial entre el medio dispersante y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersada. Este potencial da cuenta de la carga eléctrica neta contenida dentro de la región limitada por el plano de deslizamiento, y también depende de la ubicación de ese plano. La magnitud

que posea este potencial resulta ser un indicador clave de la estabilidad de estas dispersiones, dado que refleja el grado de repulsión electrostática entre las partículas dispersadas. Cuando el potencial Z es pequeño, las fuerzas de atracción pueden superar esta repulsión y la dispersión se pueden reducir lo que conlleva a la floculación.^[35] Por lo tanto, los coloides con alto potencial zeta (negativo o positivo) se estabilizan eléctricamente mientras que los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular (Figura 6).

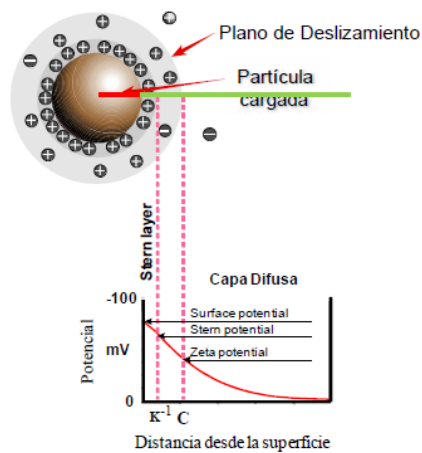


Figura 6: Potencial Z. El plano de corte está representado por el círculo gris, y la letra C. La línea roja representa el radio de la partícula. Sobre la línea verde, K^{-1} es la longitud de Debye, y el potencial Z es el potencial eléctrico a la distancia C.^[35]

En general, las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren carga superficial. En el caso de los GNR es generado por la adsorción del CTAB, el cual se sitúa formando una bicapa en torno a la superficie de oro^[36], lo cual confiere la carga positiva característica de estas partículas (Figura 7).

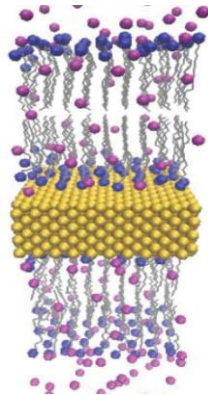


Figura 7: Distribución de bicapa de CTAB respecto a la superficie de oro. En magenta: iones Br⁻. (imagen obtenida desde modelo teórico).^[36]

Un aspecto por considerar respecto a la magnitud, positiva o negativa, que posea el valor del potencial zeta es que tiene implicancias respecto al uso de las nanoestructuras para aplicaciones médicas. En el caso de tener una carga superficial negativa podría ser rodeada por una corona de proteínas séricas y eventualmente ser reconocida por el sistema inmune, disminuyendo su llegada al sitio deseado. Además, esta carga negativa puede dificultar el traspaso de la membrana celular. Como contraparte, una carga superficial positiva puede generar daño al provocar rupturas en la membrana y por consiguiente la muerte celular.

1.6. Uso de AuNPs para la liberación espacial y temporalmente de fármacos

En los años recientes, las terapias fototérmicas basadas en nanopartículas han surgido como un potencial tratamiento contra el cáncer, particularmente en

nanoestructuras como los GNRs, que absorben luz en la región del infrarrojo cercano (NIR) para la cual los tejidos son transparentes. Así, una de las aproximaciones más prometedoras resulta de combinar la terapia fototérmica con la quimioterapia, en la que, al producirse la absorción de la radiación electromagnética, se genera la liberación del fármaco únicamente en la zona deseada, lo cual reduce los efectos secundarios asociados a un tratamiento de quimioterapia clásica.^[37]

Para este fin se han desarrollado diversos métodos para la liberación fototérmica de drogas a través del uso de AuNPs, tal como se representa en la figura 8. Dentro de éstos se pueden distinguir los siguientes tipos:^[15]

- a) El fármaco está inserto en una matriz polimérica, la cual contiene nanopartículas de oro. El calor local generado al irradiar estas induce cambios en la estructura del polímero permitiendo la liberación del fármaco.
- b) El fármaco y la nanopartícula están embebidos en liposomas, el cual es roto por el calor local generado por la irradiación nanopartícula, liberando así la droga.
- c) El fármaco se encuentra unido covalentemente a una molécula espaciadora, unida a su vez a la nanopartícula. El calor local producido rompe los enlaces, liberando el fármaco.
- d) De forma similar a la anterior, excepto que la unión fármaco-nanopartícula no es covalente. Esto se logra embebiendo la droga en una cobertura de sílice, la

que libera el fármaco por el calor generado por la irradiación de la AuNP.

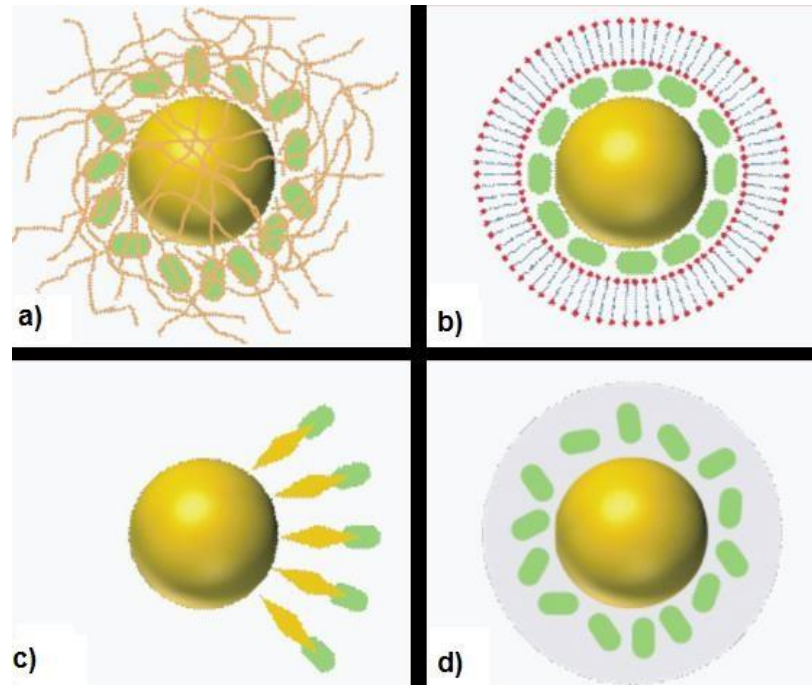


Figura 8: Esquema de los métodos de liberación fototérmica de fármacos. a) El fármaco (en verde) está inserto en una matriz polimérica que rodea a la nanopartícula. b) Fármaco y nanopartícula están embebidos en liposomas. c) El fármaco es unido covalentemente a un espaciador, unido a su vez a la nanopartícula. d) El fármaco no está unido covalentemente a la nanopartícula.^[15]

1.7. Uso de espaciadores unidos covalentemente a AuNPs para la liberación controlada espacial y temporalmente de agentes activos

Hasta la fecha, existen pocos trabajos reportados en los que se describa la aplicación de esta estrategia, por lo cual constituye un nicho a profundizar. Uno de estos trabajos, a partir del cual surge la base de esta tesis es el realizado por Bakhtiari *et al.* el cual se describe el clivaje de un aducto de Diels-Alder por el calor liberado al irradiar con un láser nanopartículas de oro del tipo esféricas

y *core-shell*. El mencionado aducto, formado por un dieno y un dienófilo, se encuentra incorporado dentro de la molécula de un espaciador diseñado para separar la superficie de la nanopartícula del principio activo a liberar. Al irradiar estas nanopartículas con un láser de longitud de onda apropiada (correspondiente a la banda plasmónica de las nanopartículas) se produjo la liberación del principio activo (un derivado de fluoresceína), tal como se muestra en la figura 9.^[38] Por lo anteriormente señalado, se puede inferir que para lograr la liberación espacial y temporalmente controlada de un principio activo se requeriría irradiar solo la zona de interés por el tiempo necesario.

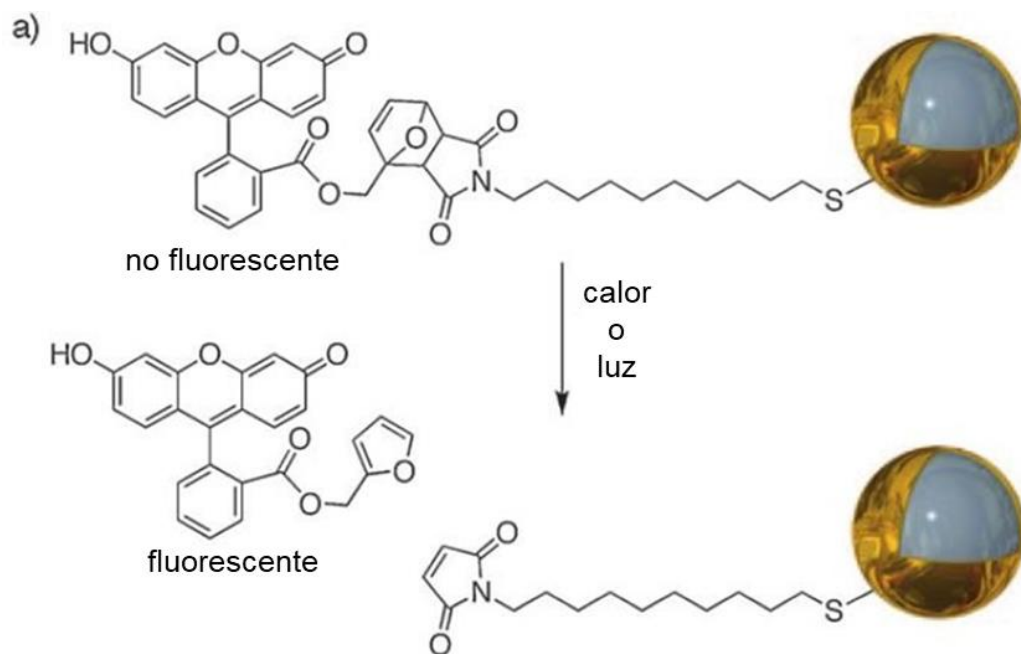


Figura 9: Liberación de fluoresceína desde la superficie de AuNP-coreshell mediante efecto fototérmico.^[38]

En la literatura no se ha reporta la influencia que pudiera tener el largo de la cadena a la cual está unida el mencionado aducto de Diels-Alder sobre el perfil de liberación del fármaco. El largo de la cadena podría afectar al tiempo durante el cual se deba irradiar para producir la ruptura del aducto y así liberar el principio activo. Esto sin mencionar la estabilidad coloidal que pueda aportar, así como la cantidad de moléculas de espaciador-principio activo que se puedan conjugar a la nanopartícula. En relación con ello, en esta tesis se estudió el efecto del largo del espaciador en relación al perfil de liberación de moléculas bioactivas. En esta tesis se evaluó el efecto del largo del espaciador en el perfil de liberación de una molécula modelo como es la carboxifluoresceína previamente al estudio de un agente antitumoral como es el péptido BH3.

1.8. Uso del péptido BH3 como potencial agente antitumoral en la terapia contra el cáncer

Recientemente, se ha producido un aumento en el interés por utilizar péptidos o proteínas como método de tratamiento para diversas patologías, dado que poseen notables ventajas respecto a moléculas pequeñas, tales como alta especificidad, elevada actividad biológica, bajo costo y una gran capacidad de penetración de membranas. Actualmente existe en el mercado una amplia gama de fármacos de este tipo, que se utilizan como antibacterianos,

antioxidantes o tratamiento hormonal. No obstante, los tratamientos de origen peptídico presentan diversos inconvenientes que dificultan su aplicación. Entre éstos se encuentran la estabilidad, toxicidad e inmunogenicidad. Varias estrategias han sido ideadas para aumentar la estabilidad, tales como la utilización de D-aminoácidos, lo cual aumenta la resistencia frente a la acción de proteasas^[39], o bien de α -aminoxiaminoácidos, que permiten generar plegamientos específicos en la estructura secundaria^[40], y finalmente la ciclación. En el caso de tratamientos contra el cáncer los que se encuentran actualmente aprobados se encuentran enfocados principalmente a tumores de próstata y mama, debido a que actúan como agonistas de la hormona que controla la liberación de la hormona luteinizante. Esto implica que no actúan directamente sobre las células malignas, por lo que eventualmente la eficiencia del tratamiento puede verse reducida.

En este contexto resulta importante señalar que la pérdida en la regulación de la apoptosis, o muerte celular programada, es un evento piloto previo al desarrollo del cáncer y juega roles importantes a favor de éste en el desarrollo de resistencia a terapias químicas. De modo que el explorar estrategias para recuperar este balance se convierte en un objetivo atractivo en la lucha contra este mal. En este contexto surge la idea de utilizar el péptido BH3, el cual constituye el dominio efector de la proteína PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*). Esta proteína en circunstancias normales se encuentra en bajas

concentraciones, pero puede ser inducida por p53 o por daño del ADN.^[41] Paralelamente, se ha señalado que la pérdida de expresión de proteínas que contienen este dominio puede contribuir a la aparición de tumores, tales como gliomas, neuroblastomas, carcinoma de seno, pulmón y colon, entre otros.^[42] Por otra parte, si bien se ha reconocido el potencial uso como antitumoral de este péptido, resulta imperativo dirigir su actividad hacia las células cancerígenas, sin mencionar que su actividad se produce a nivel del citosol, por lo que se requiere favorecer el ingreso de éste a través de la membrana celular. Por lo tanto, la mejora de estos factores es altamente deseable para incrementar sus propiedades terapéuticas, sin la necesidad de altas dosis y una frecuente administración.^[43]

1.9. Uso de biomoléculas para el direccionamiento activo de nanopartículas de oro

Además del efecto EPR por el cual las nanopartículas quedan más retenidas en el tumor para hacer la llegada más selectiva (direccionamiento pasivo), se pueden emplear diversas biomoléculas que pueden unirse a receptores que se encuentran sobre expresados en células tumorales. Un ejemplo de ellos es el receptor de folato (FR) que se ha comprobado está sobre expresado en células tumorales.^[11] Dentro de los tipos celulares tumorales donde se encuentran en mayor cantidad están: células de ovario, pulmón, mama, endometrio y renales.

Además, este receptor es un marcador de tumores más específico, ya que en general, se encuentra ausente en tejidos normales, siendo algunas excepciones el plexo coroideo y la placenta. En cuanto a su utilidad en diagnóstico, se han diseñado sistemas formados por nanoclusters de oro, en conjunto con ovoalbúmina y biopolímeros. Aquí se lograba incrementar la endocitosis del sistema, mediada por el FR. También se han diseñado nanosistemas, solo con polímeros y utilizando el folato como marcador específico de células tumorales.^[44] En los sistemas antes mencionados se logró como resultado aumentar la llegada de los nanoconjugados a las células tumorales, realizando así el denominado direccionamiento activo, el que fue comprobado mediante emisión de fluorescencia.^[45]

Así entonces para favorecer el **direccionamiento**, los nanomateriales pueden sufrir una modificación superficial con agentes que sean capaces de actuar como vectores biológicos hacia diferentes células. Uno de estos vectores es el **péptido TAT** de secuencia YGRKKRRQRRR, correspondiente al dominio efector de la proteína transactivadora de transcripción, originaria del virus de inmunodeficiencia humana 1(HIV-1)^[46], que ha mostrado tener la capacidad de transportar moléculas al interior de la célula con una alta efectividad a través de macropinocitosis,^[47] tal como se muestra en la figura 10. A modo de antecedente, Yuan et al. reportaron el uso del péptido TAT para favorecer el ingreso de nanopartículas al interior de células.^[48]

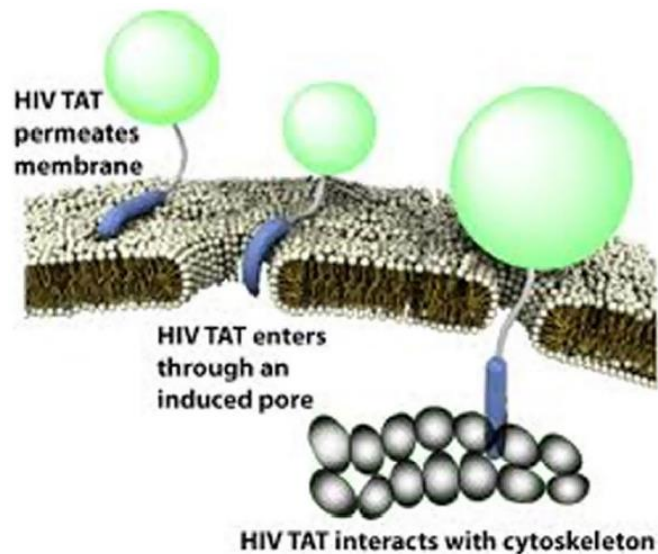


Figura 10: Dominio efector de la proteína transactivadora de transcripción que ha mostrado tener la capacidad de transportar moléculas al interior de la célula con una alta efectividad a través de macropinocitosis. ^[47,49]

Por otra parte, con el objetivo de lograr un **direccionamiento activo** es el de utilizar la secuencia DV3 (LGASWHRPDK) que es un ligando para el receptor CXCR4 (Figura 11), el cual se encuentra sobreexpresado en alrededor de veinte tipos de cáncer, entre los que se incluyen próstata, seno, páncreas, carcinoma pulmonar de células pequeñas, por mencionar algunos.^[50]

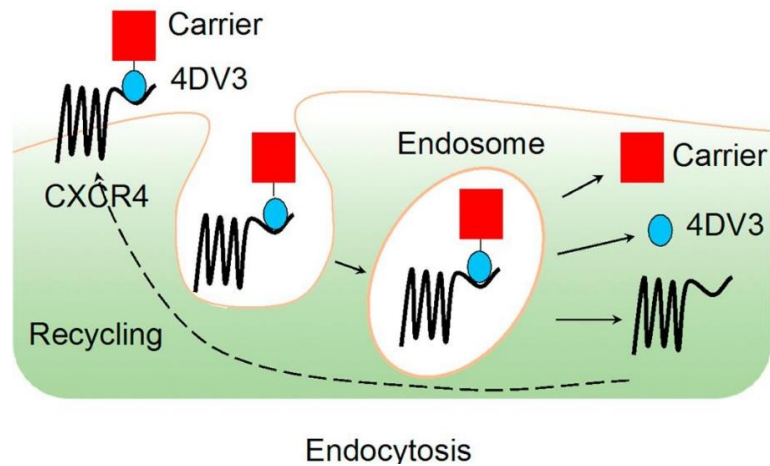


Figura 11: Internalización vía endocitosis del péptido DV3 mediada por el receptor CXCR4. ^[50]

Liu *et al* sintetizaron una molécula que contenía en su secuencia peptídica el fragmento TAT, el fragmento DV3 y la secuencia BH3 logrando de esta manera un eficaz efecto selectivo antitumoral frente a cáncer de colon.^[41]

Si bien hay variados reportes respecto a la utilización de ligandos peptídicos para producir el direccionamiento de GNR hacia las células tumorales, no se halló información respecto a la utilización del efecto fototérmico para producir la liberación de un péptido antitumoral, por lo cual resulta interesante evaluar el comportamiento de un sistema multifuncionalizado frente al proceso de irradiación.

Por lo anterior, este trabajo se enfoca en la preparación de un nanosistema en el cual se encuentren funcionalizados los péptidos DV3, TAT y BH3, siendo este último conjugado a la nanopartícula mediante la utilización de un

espaciador termolábil. Posteriormente, este constructo será irradiado con un láser de 808 nm y 350 mW para así generar la liberación exclusiva del péptido antitumoral BH3. (Figura 12)

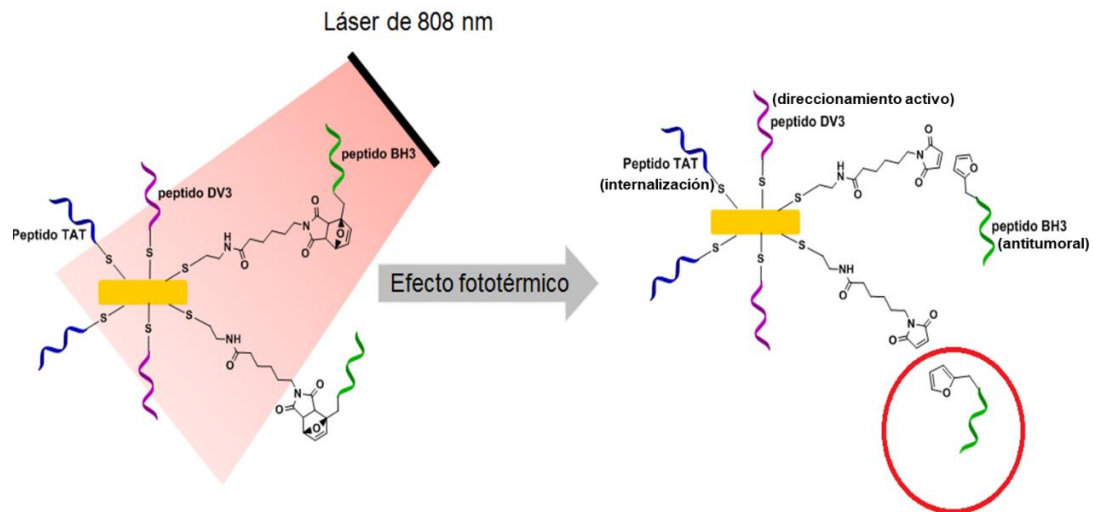


Figura 12: Esquema resumen de la propuesta de trabajo. En ésta se sintetizaron GNRs, las cuales fueron funcionalizadas con los péptidos DV3, TAT y BH3, siendo este último modificado para permitir su unión a los GNRs mediante un espaciador que contiene un aducto de Diels-Alder. Finalmente, este sistema es irradiado con láser para producir el efecto fototérmico en las nanopartículas y que el calor liberado permita producir la reacción de retro-Diels-Alder y así liberar de modo exclusivo al péptido antitumoral BH3.

1.10. Hipótesis

La irradiación de GNRs multifuncionalizados con los péptidos BH3 (antitumoral), TAT y DV3 permite producir la liberación específica del péptido antitumoral.

1.11. Objetivos Generales

- 1) Multifuncionalizar GNRs con los péptidos TAT, DV3 y BH3, este último por medio de espaciadores a través de aductos de Diels-Alder.
- 2) Generar la liberación específica de BH3 de los GNRs funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y BH3 (GNRs-6) mediante la irradiación con láser.
- 3) Evaluar la citotoxicidad del compuesto liberado en células HeLa.

1.12. Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar nanobarras de oro (GNR) que posean un plasmón longitudinal situado en la primera ventana biológica.
- 2) Sintetizar los péptidos TAT, DV3 y BH3 necesarios para la funcionalización de los GNRs.
- 3) Sintetizar los espaciadores de distinta longitud que permitan evaluar si hay influencia de la distancia en el proceso de liberación.
- 4) Sintetizar los aductos de Diels-Alder de BH3 que permitan la liberación de BH3 mediante la reacción de retro-Diels-Alder.
- 5) Multifuncionalizar GNRs con TAT, DV3 y los distintos aductos de BH3 generando un sistema estable.
- 6) Producir la liberación específica de BH3 desde los GNRs mediante

irradiación con láser a través del efecto fototérmico.

- 7) Evaluar el efecto del péptido BH3 liberado por la irradiación de las nanobarras multifuncionalizadas sobre la citotoxicidad en células HeLa.

Capítulo 2: Metodología de síntesis de nanobarras de oro y diseño de modelo de liberación.

2.1. Síntesis de nanobarras de oro (GNRs)

Proveedor	Reactivos y disolventes
Sigma-Aldrich	Ácido tetracloroáurico hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) Borohidruro de sodio (NaBH_4) Nitrato de plata (AgNO_3)

El agua Milli-Q utilizada en todos los experimentos fue obtenida mediante la purificación de agua destilada con un equipo Simplicity UV (Millipore, Molsheim, France).

Los GNRs fueron sintetizados usando un procedimiento mediado por semillas en un baño termorregulado a 27 °C. Para la formación de las semillas, a un volumen de 4,7 mL de una disolución de CTAB 0,1 M se añadieron 42,5 μL de HAuCl_4 29,4 mM (disolución A), tras lo cual se redujo el Au(III) a Au(0) mediante una disolución fría de NaBH_4 10 mM (300 μL) recién preparada. Paralelamente, se procedió a preparar una disolución de crecimiento (disolución B), añadiendo un volumen de 170 μL de HAuCl_4 29,4 mM sobre una disolución de 10 mL de CTAB 0,1 M, siendo posteriormente reducido el Au(III) a Au(I) mediante una disolución de ácido ascórbico 100 mM 75 μL en presencia

de AgNO_3 5 mM 80 μL . Posteriormente, se añadieron 120 μL de la disolución de semillas (A) sobre la disolución de crecimiento (B) y se dejó en reposo por 30 minutos en un baño a 27 °C, según esquema de la figura 13. El producto final fue centrifugado a 8000 rpm por 30 minutos, y el pellet obtenido de este modo fue resuspendido en agua Milli-Q.

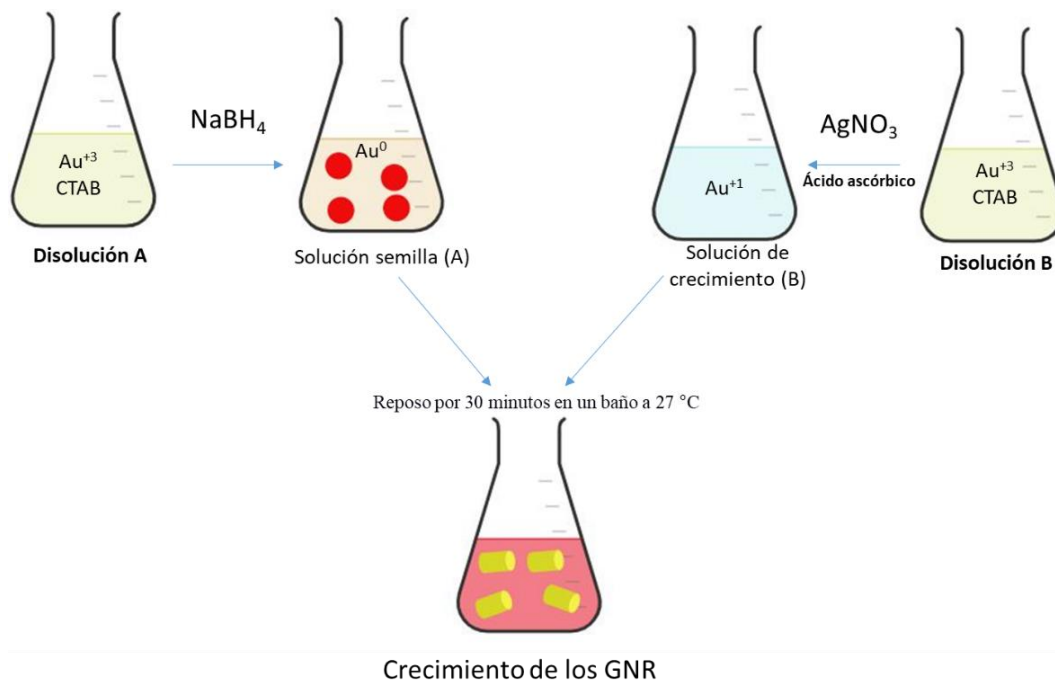


Figura 13: Síntesis de GNR por crecimiento mediado por de semillas.

Los GNR obtenidos fueron caracterizados mediante Espectrofotometría de Absorción Molecular, Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), Potencial Z (pZ) y Microscopía electrónica de Barrido-Transmisión (STEM).

2.2. Caracterización de los GNR

2.2.1. Espectrofotometría de Absorción Molecular

Los GNR fueron caracterizados mediante espectrofotometría de absorción molecular a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Analytik Jena Specord S 600 para realizar un espectro, con la finalidad de observar las dos bandas de absorción de los plasmones característicos de las GNR, el transversal aproximadamente en 520 nm y el longitudinal que abarca desde los 700 hasta los 1000 nm, dependiendo de su relación de aspecto.^[51]

2.2.2. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

Los GNR también fueron caracterizados mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos (D_h) y su estabilidad coloidal. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Zetasizer 3000 de Malvern Instruments y se usó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.2.3. Potencial Z (pZ)

La medición de potencial Z (pZ) (Zeta sizer 3000, Malvern Instruments, UK) de nanopartículas consistió en tres repeticiones de cada solución de GNR. Dado que las mediciones del potencial zeta fue realizada en agua, la aproximación

de Smolochowski^[52] ha sido usada para calcular el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética de la nanopartícula en solución. Las determinaciones electroforéticas de potencial zeta fueron comúnmente realizadas en medio acuoso y una solución moderada de electrolitos. Se usó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.2.4. Microscopía electrónica de Barrido-Transmisión (STEM)

Los GNR fueron observados por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de barrido con módulo de transmisión electrónica (STEM) FEI Inspect F50. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de GNR sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y éstas se dejaron secando a temperatura ambiente. Mediante esta técnica se determinó su tamaño y la relación de aspecto (largo/ancho) mayoritaria para la población de GNR. Para obtener datos poblacionales se midieron 100 partículas empleando el programa ImageJ representándose los datos como histogramas de frecuencia vs relación de aspecto.

2.3. Carboxifluoresceína como modelo de liberación desde los GNR

Para evaluar la factibilidad de liberación a través del efecto fototermal del antitumoral BH3, objetivo de esta tesis, primeramente, se trabajó con carboxifluoresceína (CF), como modelo de liberación. Esto se llevó a cabo

mediante el uso de dos espaciadores del tipo Diels-Alder, con dos diferentes longitudes, para estudiar el efecto de la cercanía de la CF respecto a la nanopartícula. Los GNR fueron irradiados con un láser de 808 nm provocando la liberación de la CF tal como se representa en la siguiente figura: (Figura 14)

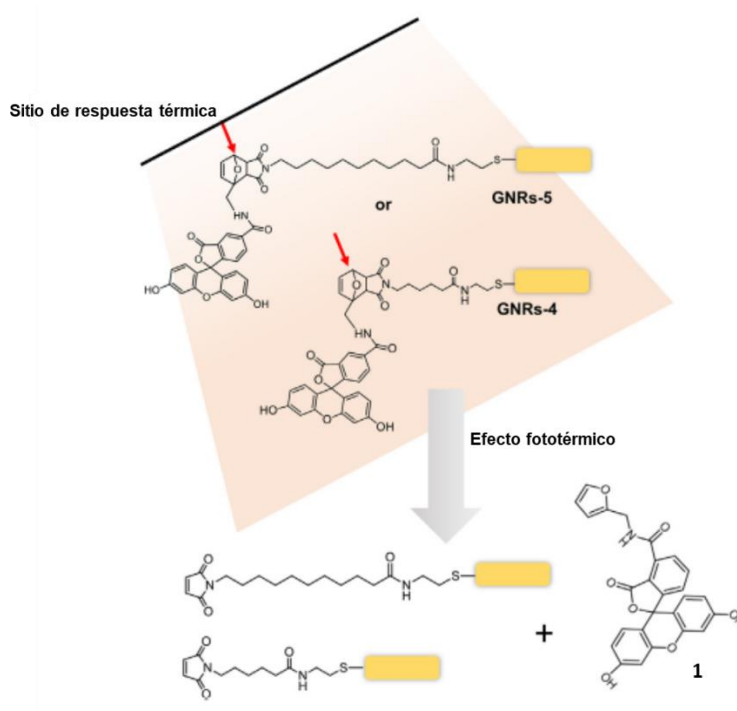


Figura 14: Esquema de irradiación de los GNR-CF y liberación de la CF. La CF está unida a los GNR a través de un espaciador de dos largos diferentes GNRs-4 y GNRs-5). Las muestras fueron irradiadas a 808 nm (350 mW).^[53]

A continuación, se expondrá la secuencia sintética de los GNR funcionalizados con carboxifluoresceína y su posterior liberación a través del efecto fototermal:

2.3.1. Reactivos y disolventes

Proveedor	Reactivos y disolventes
Merck	N,N-dimetilformamida HBTU Diisopropiletilamina 5(6)-Carboxifluoresceína
Sigma Aldrich	Furfurilamina Dimetilsulfóxido

2.3.2 Síntesis de amidas y uso de activadores

Uno de los grupos funcionales que frecuentemente se desea sintetizar corresponde al grupo amida, el cual puede entenderse como una reacción de condensación entre un ácido carboxílico y una amina (primaria o secundaria). Sin embargo, esta reacción presenta la dificultad de que sus precursores pueden reaccionar directamente, a través de un mecanismo ácido-base, con lo cual se genera la formación de sales de amonio evitando la obtención del producto deseado.

Por lo anterior es deseable convertir el ácido carboxílico en una especie que posea un mejor grupo saliente que el anión hidróxido, y con este fin se ha

desarrollado todo un conjunto de reacciones que consiguen este objetivo.

Una familia de reactivos que consiguen este objetivo son los derivados del hidroxibenzotriazol, y dentro de éstos se destaca la utilización del compuesto conocido como HBTU, que permita la activación del carboxilo para que en una segunda etapa este derivado sea atacado por una amina, generando así la formación de la amida de interés. El mecanismo de síntesis de amidas a través de la utilización de este compuesto se muestra en la figura 15.

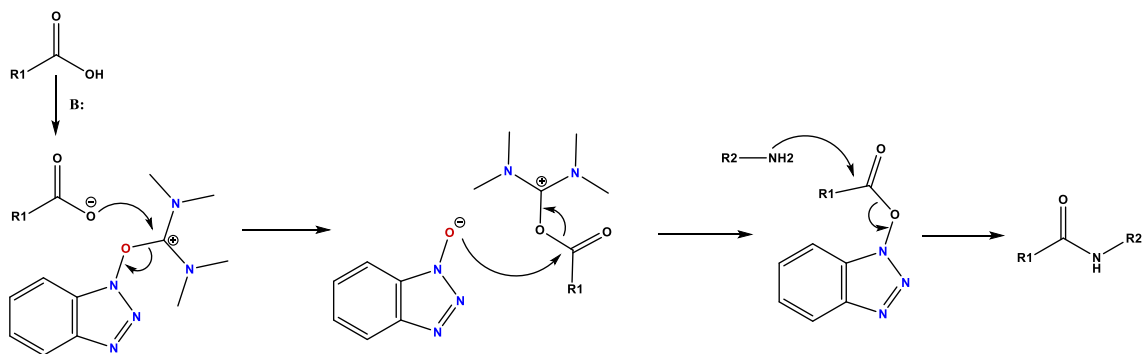


Figura 15: Esquema de síntesis de amidas mediante activación con HBTU.

2.3.3. Síntesis de aductos de Diels-Alder

La síntesis completa del aducto de Diels-Alder se realizó siguiendo el siguiente esquema de síntesis, como se muestra en la siguiente figura:

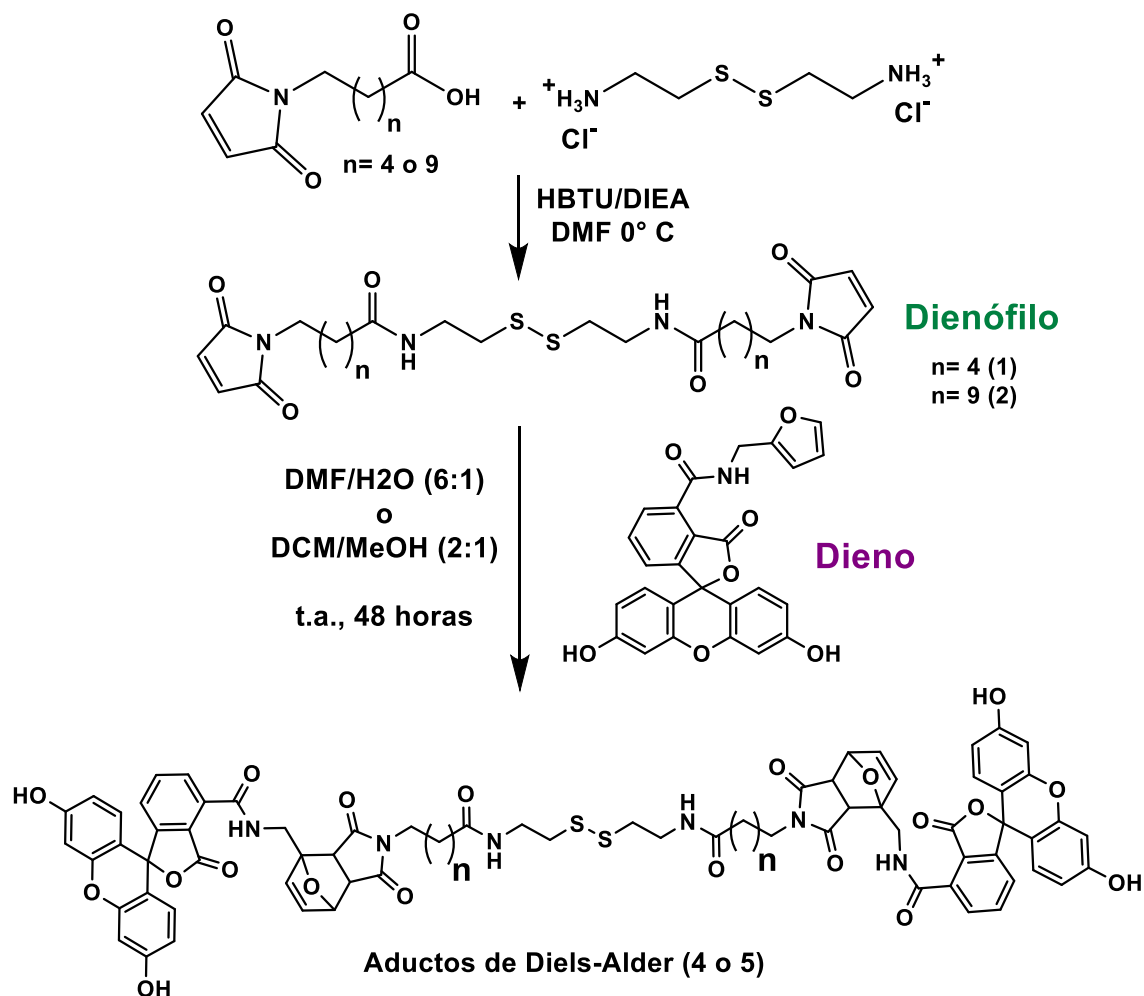


Figura 16: Esquema de síntesis del aducto de Diels-Alder-Carboxifluoresceína.

2.3.4. Síntesis del Dieno (1)

Se incubaron 5[6]-carboxifluoresceína (0.376 g), HBTU (0.379 g) y DIEA (335 μL) en 3 mL de DMF durante 15 minutos a 0°C con agitación magnética. Posteriormente, se agregó furfurylamina (90 μL) a la mezcla, la cual se agitó a temperatura ambiente por 12 horas. Finalmente, el disolvente fue evaporado y

el residuo fue purificado mediante cromatografía en silica-gel utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ [10:1]. El producto final fue identificado mediante espectrometría de masas. La figura 17 representa la ruta de síntesis.

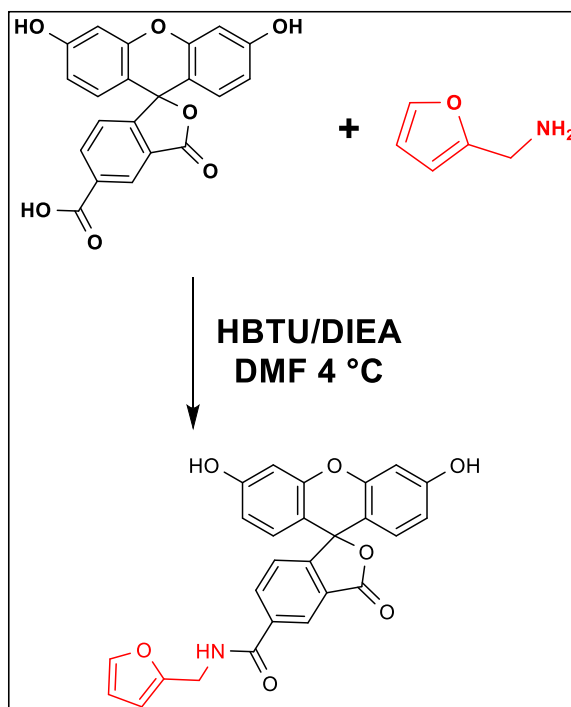


Figura 17: Esquema de síntesis de la carboxifluoresceína-furfurilamida (1).

2.3.5. Síntesis de espaciadores (Dienófilos 2 y 3)

Proveedor	Reactivos y disolventes
Merck	N,N-dimetilformamida HBTU Diisopropiletilamina
Sigma Aldrich	Ácido 6-maleimidohexanoico Ácido 11-maleimidoundecanoico Cistamina clorhidrato Furfurilamina

Se llevó a cabo la síntesis de los espaciadores N,N'-(disulfanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida) (**Compuesto 2**) y N,N'-(disulfanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(11-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)undecanamida) (**Compuesto 3**).

La síntesis del compuesto 2 (o compuesto 3) se realizó añadiendo en un balón 2 eq. de ácido 6-maleimidohexanoico (o ácido 11-maleimidoundecanoico), los cuales fueron disueltos en DMF seco. Posteriormente, se añadió 1 eq. de

clorhidrato de cistamina y esta mezcla se llevó a agitación magnética y se enfrió en un baño de hielo. Cuando se alcanzó una temperatura de 0 °C se añadieron 2 eq. de HBTU y 2 eq. de DIEA, y la reacción se completó al transcurrir 72 horas. El producto crudo obtenido de esta manera se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando CH₂Cl₂/CH₃OH [10:1] (figuras 18 y 19). El producto se concentró mediante rotavapor, se liofilizó y se almacenó a -18 °C para su posterior identificación.

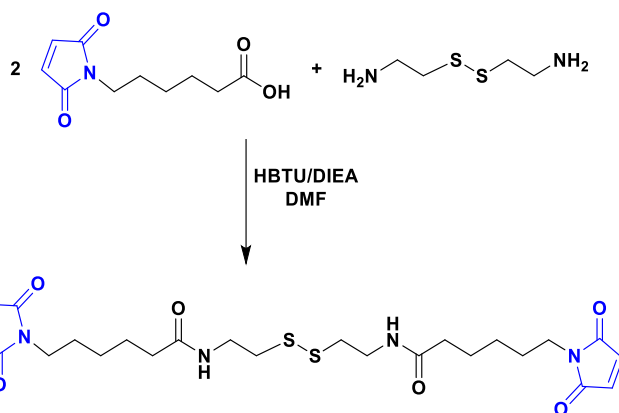


Figura 18: Esquema de síntesis del compuesto 2.

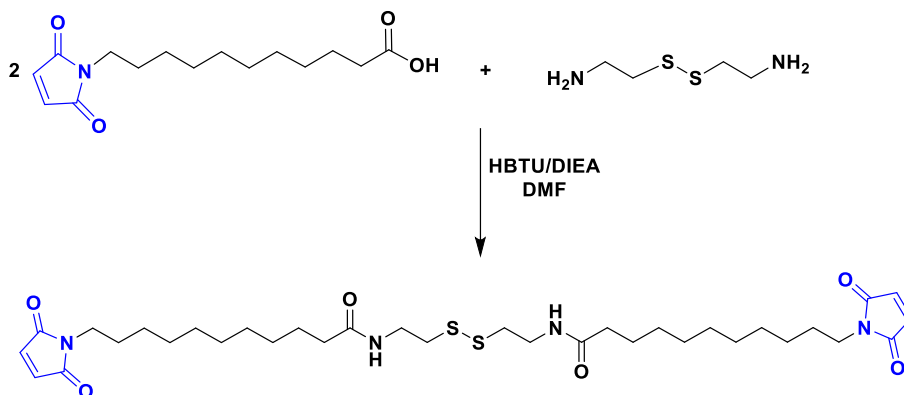


Figura 19: Esquema de síntesis del compuesto 3.

Los dos espaciadores fueron identificados mediante las técnicas de HPLC, HPLC-MS y RMN-¹H.

2.3.6. Síntesis de aductos Diels-Alder de CF (compuestos 4 y 5)

Para llevar a cabo la síntesis de los aductos de Diels-Alder se procedió de modo distinto según el espaciador utilizado.

De esta manera, para el caso del espaciador-6 se tomaron 59,6 mg de éste junto con 100 mg del derivado de CF, los cuales fueron disueltos en 500 μ L de DMF en un vial ámbar, se añadió posteriormente 3 mL de agua. La reacción se llevó a cabo con agitación magnética a temperatura ambiente por 48 horas (figura 20). El sólido formado fue filtrado y liofilizado.

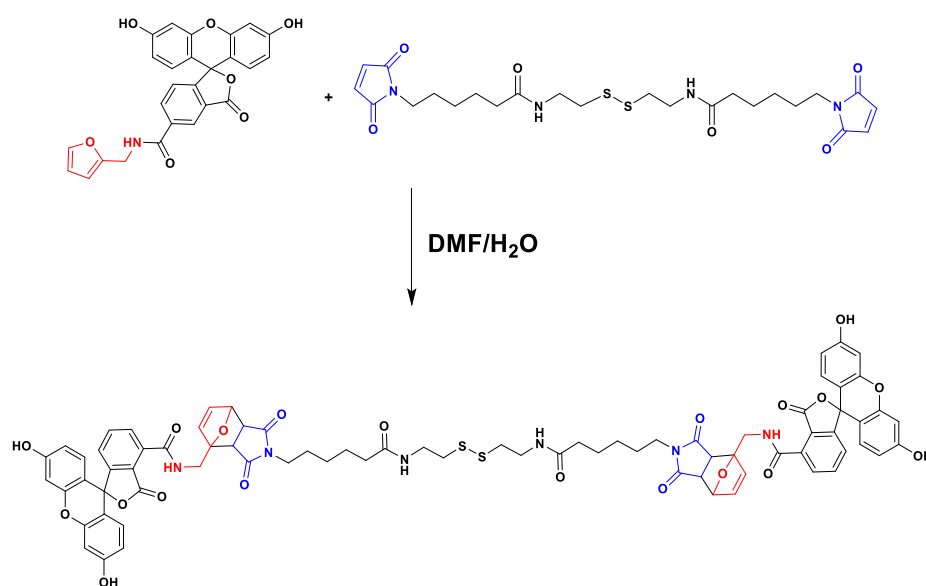


Figura 20: Esquema de síntesis del compuesto 4.

Para el caso del espaciador-11, en un tubo se disolvieron 12,6 mg del derivado de CF con 3 mL de una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃OH [2:1] y luego se añadieron 6,3 mg del espaciador. La mezcla fue incubada a 25 °C durante la noche con agitación magnética (figura 21). Finalmente, el disolvente fue evaporado a presión reducida.

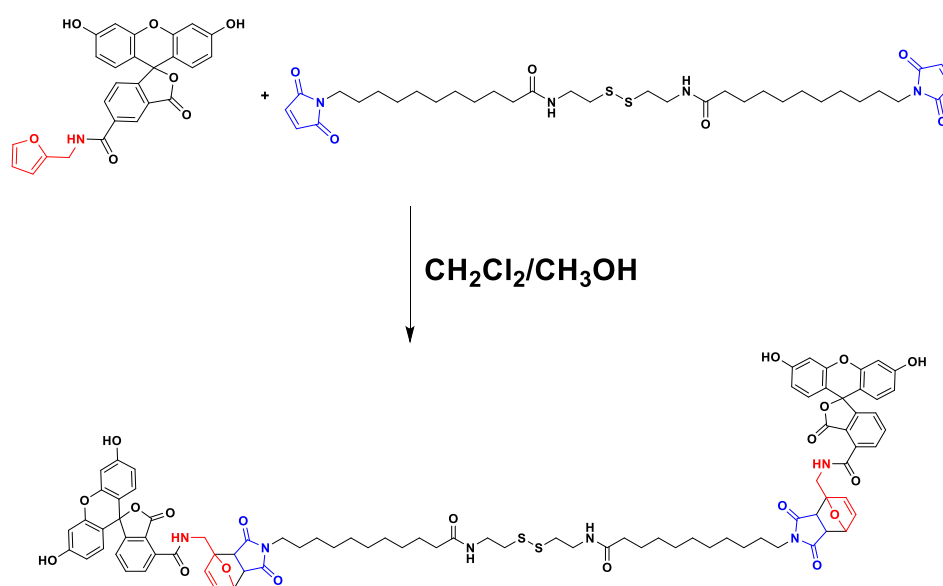


Figura 21: Esquema de síntesis del compuesto 5.

En ambos casos, los productos obtenidos fueron identificados mediante espectrometría de masas.

2.3.7. Conjugación de GNR con aductos de Diels-Alder de CF

Para llevar a cabo la funcionalización de los GNRs, se centrifugaron 4 ml de GNR-CTAB a 7.030 g por 60 minutos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* fue resuspendido en 4 ml de agua Milli-Q. A continuación, una solución de los

compuestos **4** o **5**, con una concentración de 1 mg/mL en DMF fue añadida a los GNRs resuspendidos, y la mezcla se agitó magnéticamente durante la noche. Los GNR funcionalizados fueron centrifugados a 7.030 g por 60 minutos, tras lo cual se removió el sobrenadante y el *pellet* obtenido fue resuspendido en 5 mL de agua Milli-Q.

2.3.8. Determinación del número de moléculas conjugadas al GNR

El oro presente en los GNR fue cuantificado mediante ICP-OES. Para ello, 50 μ L de muestra fueron sometidos a digestión con 1 mL de HNO₃ 60%, 500 μ L de HCl 37% y 500 μ L de H₂O₂ 30% a 90 °C por 24 horas. Las muestras digeridas se llevaron a un volumen de 50 mL utilizando tiourea 200 ppm en HCl al 1% previo al análisis por ICP-OES (Perkin Elmer Optima 3200 RL). El contenido de oro fue determinado mediante una curva de calibración del estándar. Tomando como base el dato de la concentración de oro ([Au]) y la información del largo y ancho promedio de los GNRs (los cuales fueron determinados por STEM), se pudo determinar la concentración de GNRs ([GNR]) del modo siguiente:

$$[GNR] = 4 \times \frac{[Au]}{\rho_{Au} \times \pi \times W^2 \times L}$$

Donde ρ_{Au} es la densidad de los átomos de oro en el *bulk* (59 átomos/nm³),

[Au] corresponde a la concentración de oro determinada por ICP-OES, y L y W son respectivamente, el largo y ancho de los GNRs determinados mediante STEM.

El número de moléculas de **4** o **5** por GNR fue estimado a través de mediciones de fluorescencia después de la centrifugación de los GNRs a 16.560 g por 30 minutos. Bajo estas condiciones, los GNRs conjugados con uno u otro aducto sedimentaron y el exceso de moléculas libres de **4** y **5** presentes en el sobrenadante fue determinado por fluorescencia en triplicado en tres análisis independientes.

2.3.9. Estabilidad de los GNRs funcionalizados con 4 o 5

La estabilidad de los constructos GNRs-4 y GNRs-5 fue evaluada mediante espectrofotometría UV-Vis-NIR y DLS después de almacenar las muestras por 7 días a temperatura ambiente.

2.3.10. Mediciones de Raman y Dispersión Raman aumentada por superficie (SERS)

Las mediciones de Raman y SERS fueron realizadas utilizando un espectrómetro Renishaw micro-Raman RM 1000, equipado con líneas láser de 514, 633 y 785 nm. El espectrómetro fue acoplado a un microscopio Leica DMLM y a una cámara eléctricamente enfriada CCD. La señal Raman fue

calibrada a la línea de 520 cm^{-1} del silicio y un lente con objetivo de 50x. Las muestras fueron depositadas en una lámina de oro delgada, de manera de eliminar su fluorescencia intrínseca. Se usaron diversas líneas láser para así obtener las señales Raman de los sistemas moleculares de interés. En este aspecto, los mejores resultados fueron obtenidos a los 785 nm y bajo condiciones de escaneo espectral singulares, la cual es que la potencia aplicada en la muestra (0,2 mW) fue cuidadosamente considerada y consecuentemente usada, correspondiendo ésta a menos de un 1% de la potencia total. El tiempo de adquisición fue establecido entre 10 y 20 segundos por acumulación, y el número promedio de acumulaciones fue de 5 con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron registrados entre los 100 y 1800 cm^{-1} . Los espectros Raman de los compuestos **4** y **5** fueron registrados en estado sólido, mientras que los espectros SERS de los sólidos correspondientes a GNRs-4 y GNRs-5 fueron obtenidos después de la evaporación del disolvente presente en las muestras.

2.3.11. Determinación de la liberación fototérmica desde GNRs-4, GNRs-5

Se irradiaron alícuotas de 500 μL de GNRs-4 y GNRs-5 en un tubo de vidrio (6 x 50 mm, Kimax®, código 45048-650) por 25, 50, 100, 150 y 180 minutos con un láser de diodo continuo (808 nm, 350 mW, punto de 1 mm, Power Technology® modelo IQ1A350), ubicado a 10 cm del tubo. El procedimiento

completo se llevó a cabo en una habitación oscura de manera de proteger el sistema de la luz. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g por 15 minutos, tras lo cual se midió la intensidad de fluorescencia de los sobrenadantes a 518 nm (longitud de onda de excitación: 495 nm) en un aparato Synergy MX. Además, se tomaron espectros de masa del compuesto **1** liberado después del tratamiento fototérmico.

Capítulo 3: Resultados y discusión: síntesis de nanobarras de oro y diseño de modelo de liberación.

3.1. Síntesis de nanobarras de oro (GNR)

Para la obtención de nanobarras de oro (GNRs) con una relación de aspecto aproximada de 4 se realizó una síntesis basada en una investigación anterior [54,55]. De modo general, en una fase inicial se producen los núcleos de oro reduciendo la sal de oro con borohidruro de sodio frío en presencia de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). De forma paralela se preparó una solución de crecimiento, la cual contenía CTAB, la sal de oro (HAuCl_4), ácido ascórbico y AgNO_3 . A esta solución se le agregó la disolución de núcleos de oro para así obtener los GNRs. Transcurrida media hora de reacción, las mezclas de síntesis se llevaron a centrifugación para remover el exceso de reactivos. Los *pellets* así obtenidos se almacenaron en conjunto hasta su utilización para favorecer su estabilidad. Los GNRs así obtenidos fueron caracterizados mediante a) Espectrofotometría UV-Visible, b) Microscopía electrónica de Barrido-Transmisión (STEM), c) Dispersión dinámica de la luz y d) Potencial Zeta. Para determinar la concentración molar de GNRs se cuantificó el oro presente mediante ICP-OES.

La etapa inicial de caracterización fue determinar la presencia de GNRs estabilizadas con CTAB (GNRs-CTAB) a través de espectrofotometría de absorción, mediante la cual se observaron los máximos característicos asociados a las bandas de resonancia de plasmón superficial transversal (514 nm) y longitudinal (790 nm) que han sido descritas para los GNRs.^[56] Esto se

puede apreciar en la figura 22:

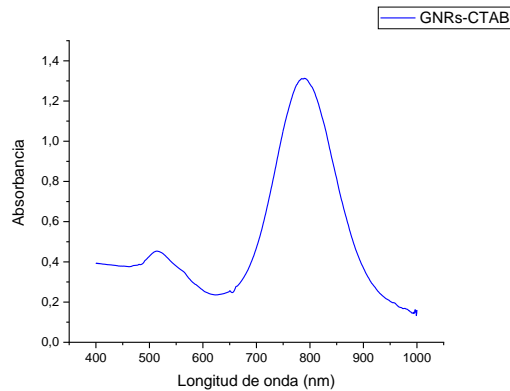


Figura 22: Espectro de absorción molecular característico para GNRs-CTAB (espectro representativo).

Una vez obtenido el espectro de absorción de los GNRs-CTAB y habiéndose demostrado la obtención de estos por la presencia de las bandas plasmónicas características, la muestra fue visualizada mediante STEM.

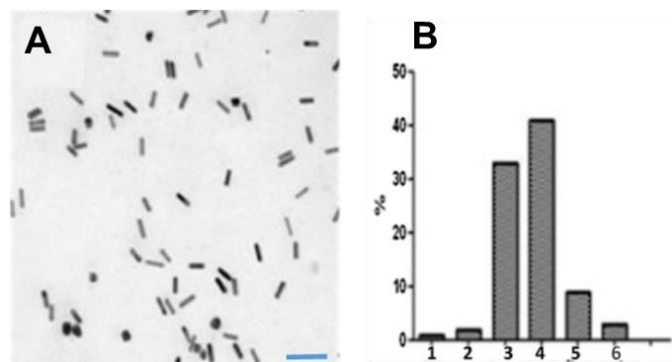


Figura 23: Microscopía electrónica de GNRs. A) Micrografía electrónica de GNRs obtenidas por crecimiento de semillas, donde la regla (en celeste) corresponde a 100 nm y B) Histograma de relación de aspectos.

En la figura 23 se puede observar una imagen de STEM de GNRs-CTAB, en el cual se aprecia la presencia predominante de nanobarras, así como un histograma de relación de aspectos largo/ancho, realizado en base a una población de 100 partículas, con el cual se determina que la población mayoritaria de GNRs-CTAB posee una relación de aspecto de 4 (dimensiones de 40 x 10 nm, largo y ancho, respectivamente). En la micrografía también se observa la presencia de estructuras similares a esferas, las cuales se ven reflejadas en relaciones de aspecto menores. No obstante, se ha constatado que tienden a ser eliminadas durante los pasos sucesivos de conjugación y centrifugación.^[57]

Otra técnica que se empleó para la caracterización de los GNRs fue la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*). Esta técnica permite determinar el diámetro hidrodinámico (Dh) de las partículas de una suspensión coloidal mediante las interferencias producidas en la luz dispersada por las mismas.

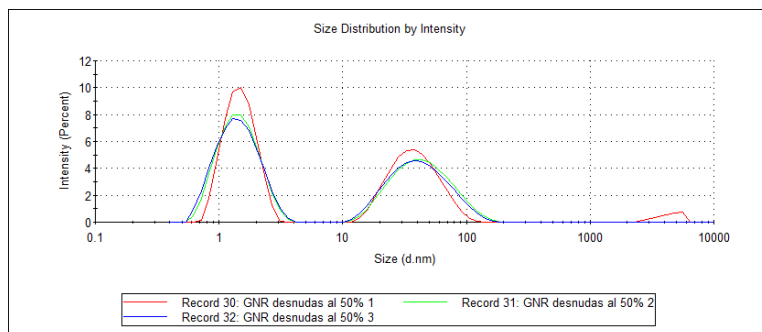


Figura 24: Distribución de tamaños característica para GNRs-CTAB obtenida mediante DLS.

La figura 24, conformada por tres mediciones de DLS, exhibe dos poblaciones, la de menor tamaño situado alrededor de los 0,7 nm y la de mayor tamaño ubicado cerca de los 30 nm. Es relevante mencionar que, a diferencia de lo que ocurre en el análisis de la micrografía de STEM, en DLS la medida obtenida corresponde al tamaño de la estructura metálica junto con su recubrimiento, el cual en este caso está dado por las moléculas de CTAB. Esto resulta ser significativo, dado que al realizar conjugaciones con otras moléculas eventualmente pueden producirse variaciones en el valor del Dh.

Finalmente, los GNR-CTAB fueron caracterizados mediante la determinación del potencial zeta, el cual se correlaciona con la carga superficial de las partículas coloidales. Esta medida se consigue a través de la movilidad electroforética de la nanopartícula, y se obtiene en el mismo equipo que entrega el diámetro hidrodinámico utilizando la misma cubeta. Esto otorga la ventaja de garantizar que en ambas mediciones se esté trabajando con la misma muestra. En la siguiente figura se muestra la distribución de carga superficial (realizada por triplicado) de una suspensión de GNRs-CTAB.

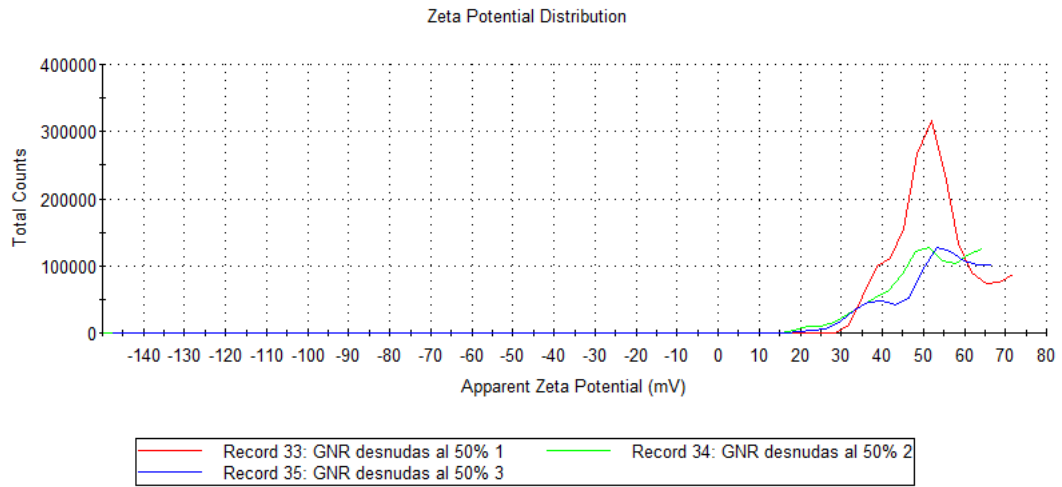


Figura 25: Distribución de carga superficial de las GNRs-CTAB.

En la figura 25 se puede apreciar que la población tiene un valor positivo, con un promedio de +52,5 mV, magnitud positiva que está asociada al carácter catiónico del surfactante CTAB que estabiliza este sistema coloidal.

El potencial zeta resulta tener una gran relevancia en las posteriores etapas de funcionalización de los GNRs, debido a que al ir sustituyendo el CTAB (catiónico) por otro tipo de estabilizantes o moléculas funcionales la magnitud del potencial zeta será alterado de acuerdo a las propiedades eléctricas que estas moléculas posean. De esta manera, se constituye en una herramienta práctica y valiosa a la hora de estudiar la funcionalización de nanopartículas.

3.2. Síntesis de los aductos de Diels-Alder derivado de carboxifluoresceína

Para generar un modelo de liberación de un compuesto mediante fototermia se requería la síntesis de una molécula térmicamente lábil como resultan ser los aductos de Diels-Alder. Con este fin, se ideó un esquema de síntesis convergente, de manera de producir de manera paralela el dieno y el dienófilo, y en una etapa posterior formar el aducto.

3.2.1. Síntesis del derivado de carboxifluoresceína

En la figura 26 se muestra el esquema de síntesis utilizado para la modificación de la carboxifluoresceína y que ha sido publicado por nosotros.^[53]

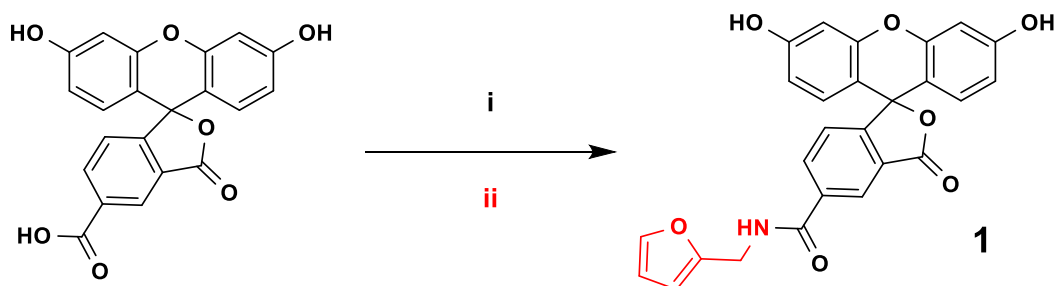


Figura 26: Esquema de síntesis del derivado de carboxifluoresceína (1). i: HBTU, DIEA, DMF, 0 °C, 15 min. ii: Furfurilamina, t.a., 12 h.

La reacción se inicia con la activación del grupo carboxilo por parte del HBTU, con lo cual se genera un buen grupo saliente. Este es desplazado mediante la

adición de furfuralamina, formándose así la amida con el dieno.

La obtención del compuesto **1** fue confirmada por medio de espectrometría de masas, con la cual se detectó el ion $[M+H]^+$ de masa 456. Además, el análisis por HPLC determinó su obtención con un 97 % de pureza (rendimiento: 74 %).

(Figura 27)

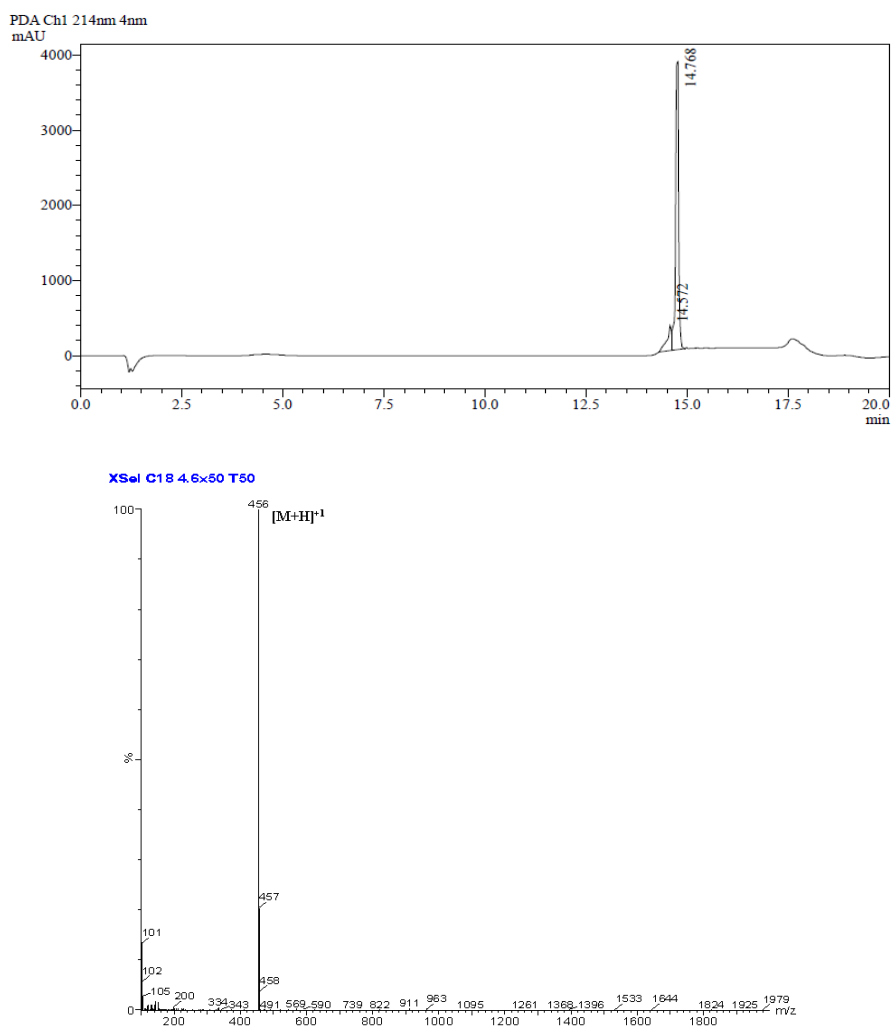


Figura 27: HPLC y HPLC-MS del compuesto (**1**). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 20 min (A = 0.1% ác. fórmico en H₂O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.

3.2.2. Síntesis de espaciadores

Los espaciadores **2** y **3**, derivados de los ácidos 6-maleimidoheptanoico y 11-maleimidoundecanoico respectivamente, fueron sintetizados siguiendo el esquema que muestra la figura 28:

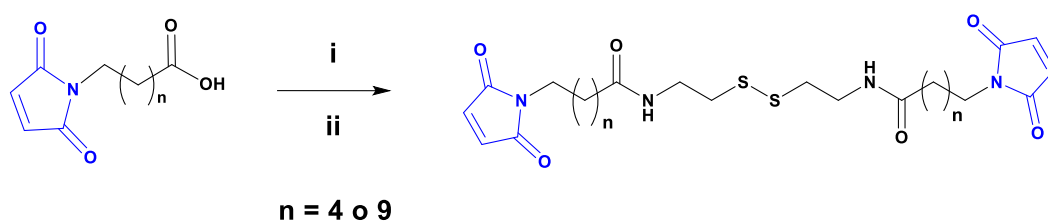


Figura 28: Esquema de síntesis de los espaciadores (**2**) y (**3**) ($n = 4$ o 9 respectivamente). i: Cistamina clorhidrato, DMF, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. ii: HBTU, DIEA, temperatura ambiente, 72 h.

Del mismo modo que en la síntesis del dieno, la reacción comienza al activarse el grupo carboxilo por medio de HBTU, favoreciendo de esta manera el ataque nucleofílico de las aminas de la cistamina. Dado el carácter bifuncional de esta última los productos formados poseen dos dienófilos en sus extremos susceptibles de producir la reacción de Diels-Alder, así como el puente disulfuro en su zona central que permite la unión de esta cadena a materiales como el oro.

El compuesto (**2**) fue obtenido con un 95 % de pureza y un 86% de rendimiento de acuerdo al análisis por HPLC. Así también, en el espectro de masas se pueden observar valores de masa de 539, 270 y 1078, los cuales corresponden

a los iones $[M+H]^+$, $[M+2H/2]^+$ y $2[M+H]^+$ respectivamente (figura 29). Por otra parte, la estructura bifuncional del compuesto fue confirmada mediante espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ y de $^{13}\text{C-RMN}$ (figura 30).

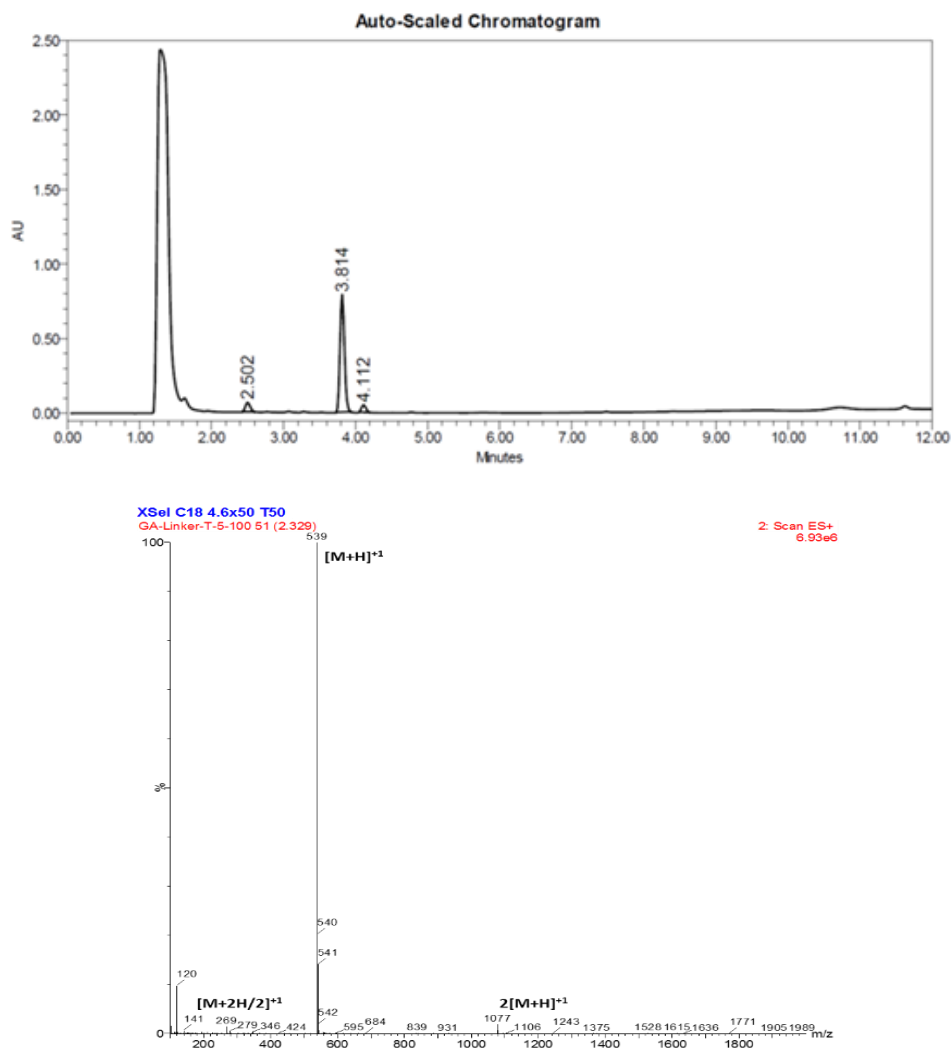


Figura 29: HPLC y HPLC-MS del compuesto (2). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H₂O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.

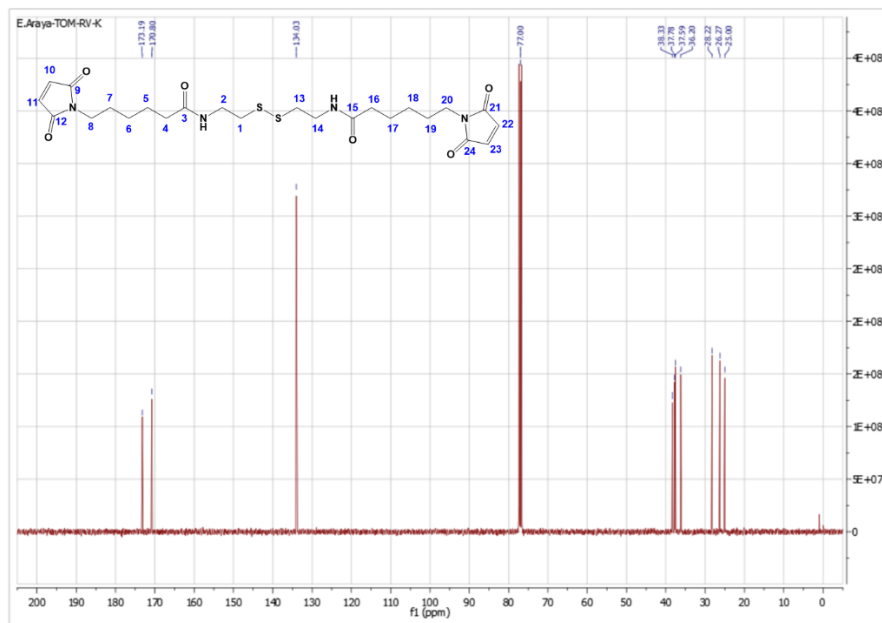
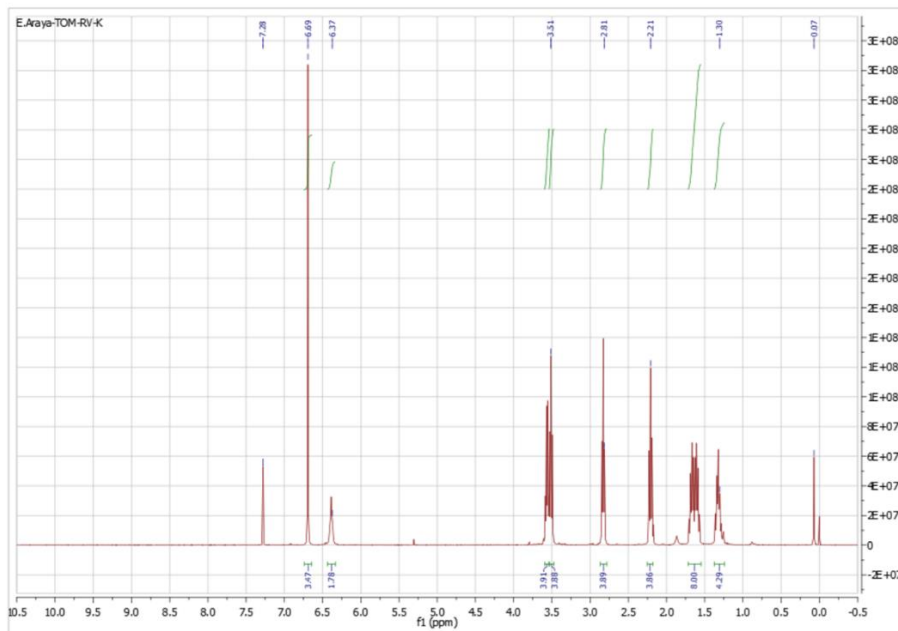
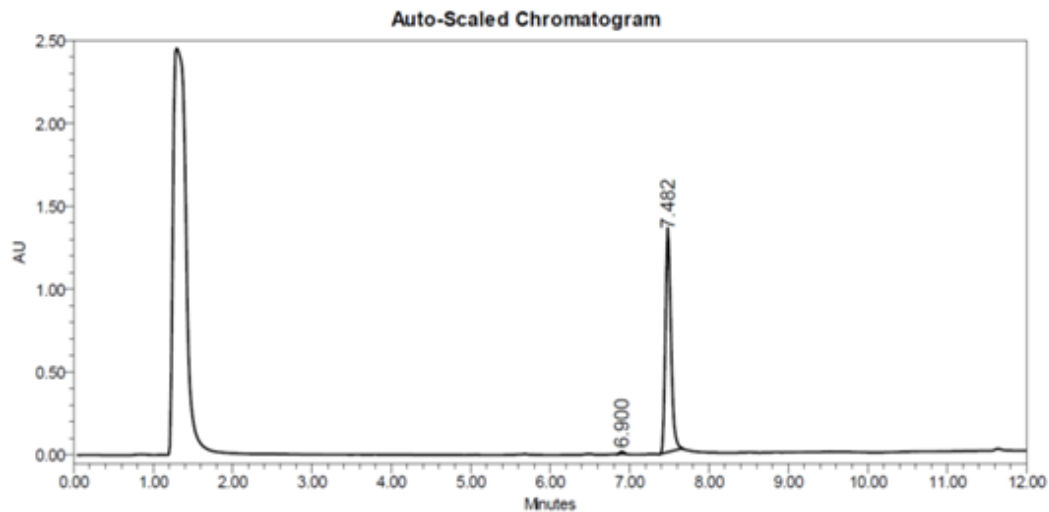


Figura 30: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.30 (m, 4H); 1.57-1.70 (m, 8H); 2.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H); 2.83 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H); 3.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H); 3.56 (q, $J = 6.3$ Hz, 4H); 6.37 (s, 2H); 6.69 (s, 4H). Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 173.19 (3, 15); 170.80 (9,12,21,24); 134.03 (10,11,22,23); 38.33 (2,14); 37.78 (8,20); 37.59

(4,16); 36,20 (1,13); 28.22 (7,19); 26.27 (5,17); 25.00 (6,18).

El compuesto (**3**) fue obtenido con un rendimiento de 82% y un 98 % de pureza de acuerdo con el análisis de HPLC (Figura 31). Así también, en el espectro de masas se pueden observar valores de masa de 679, 340 y 1358, los que corresponden a los iones $[M+H]^+$, $[M+2H/2]^+$ y $2[M+H]^+$ respectivamente. Por otra parte, el análisis por medio de espectroscopías $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ permitió identificar la estructura bifuncional característica del compuesto (Figura 32).



XSel C18 4.6x50 T50
GA-Linker-M 46 (2.078)

1: Scan ES+
3.38e6

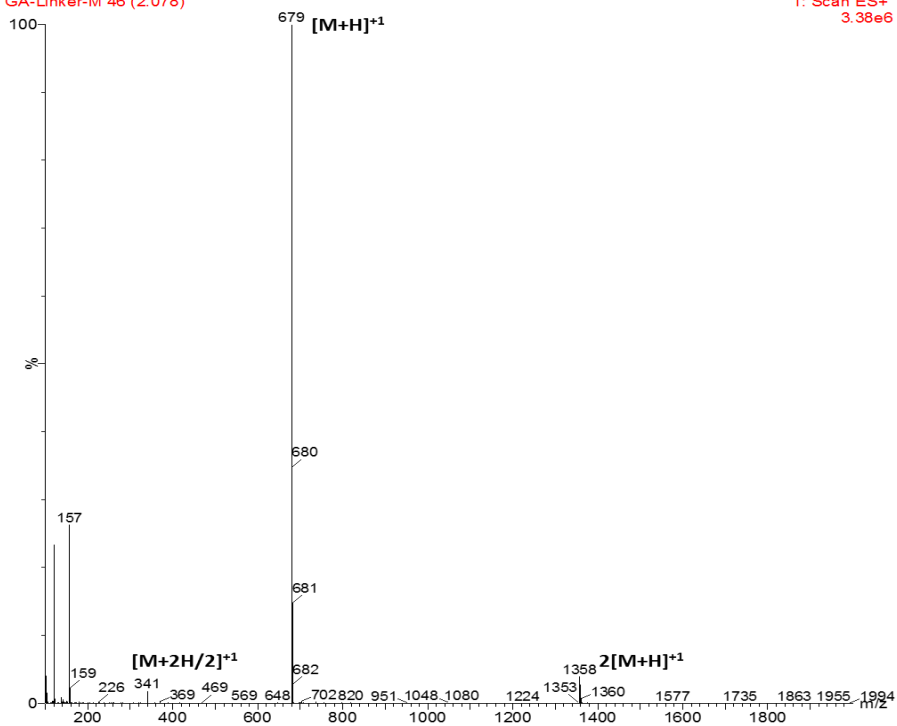


Figura 31: HPLC y HPLC-MS del compuesto (3). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 30 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H₂O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.

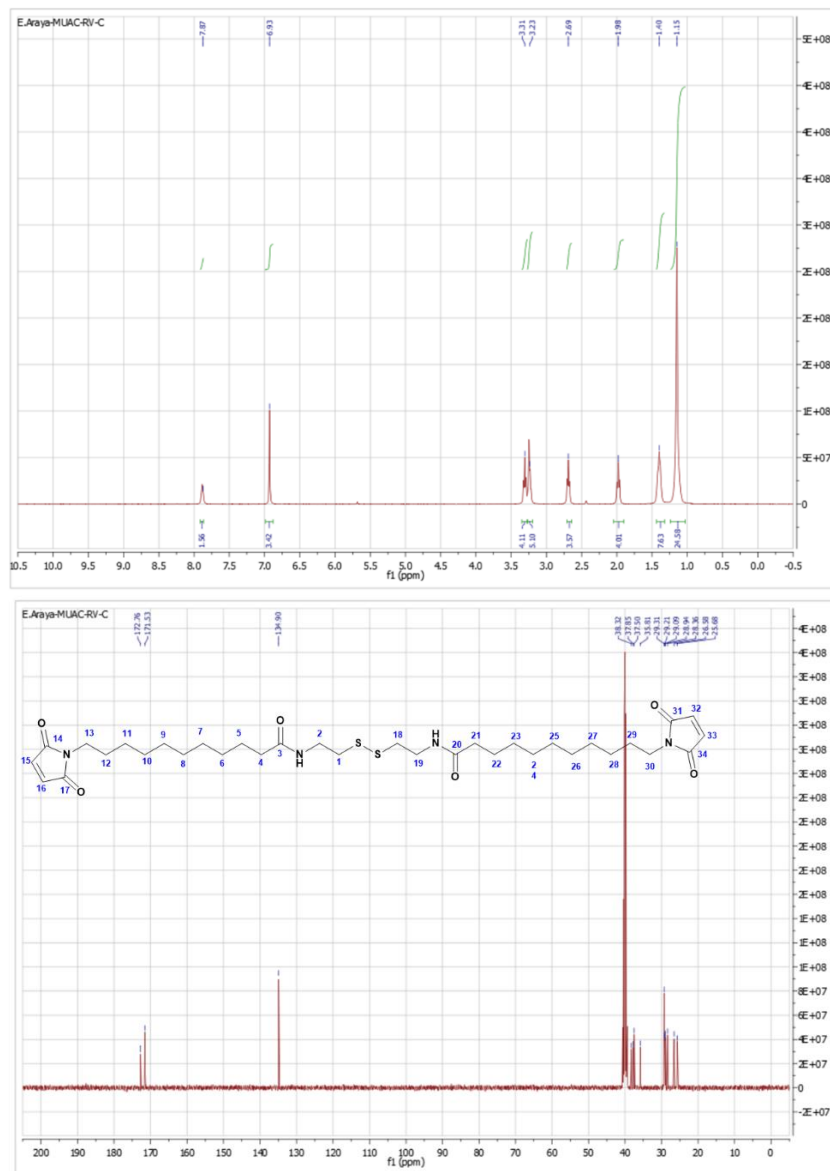


Figura 32: ¹H-RMN (400 MHz, DMSO): δ 1.15 (s, 24H); 1.40 (m, 8H); 1.98 (t, J = 7.3, 4H); 2.69 (t, J = 6.6 Hz, 4H); 3.24 (q, J = 6.5 Hz, 4H); 3.31 (t, J = 7.0, 4H); 6.93 (s, 4H); 7.87 (s, 2H). ¹³C-RMN (400 MHz, DMSO): δ 172.76 (3,20); 171.53 (14,17,31,34); 134.90 (15,16,32,33); 38.32 (2,19); 37.85 (13,30); 37.50 (4,21); 35.81 (1,18); 29.31 (8,9,25,26); 29.21 (7,24); 29.09 (10,27); 28.94 (6,23); 28.36 (11,28); 26.58 (5,22); 25.68 (12,29).

3.2.3. Síntesis de aductos de Diels-Alder de CF (compuestos 4 y 5)

Para llevar a cabo la síntesis de los cicloaductos de Diels-Alder 4 y 5 se realizó una unión directa de cada uno de los dienófilos (2 y 3) con el dieno (1) formado a partir de la carboxifluoresceína en una mezcla de disolventes adecuada para cada caso (figura 33).

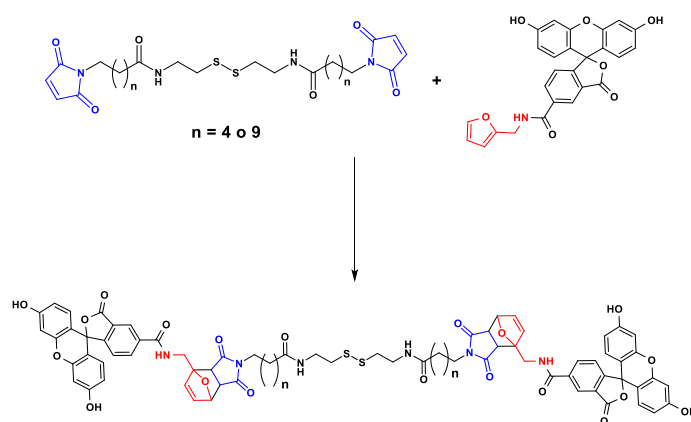
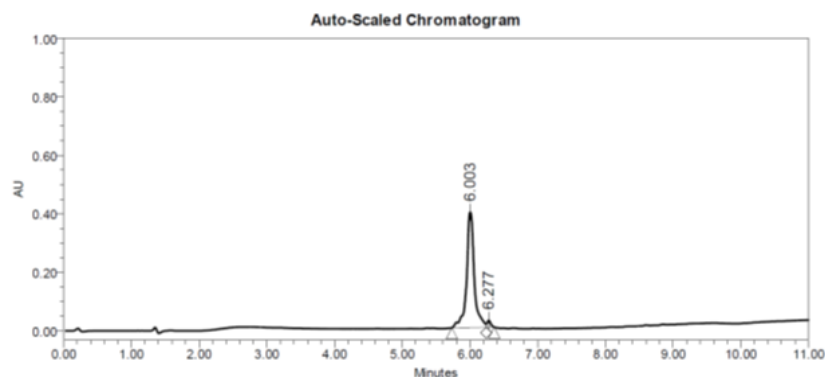


Figura 33: Esquema de formación de los aductos de Diels-Alder.

Así, en el caso del derivado del espaciador más corto (compuesto 4) se pudo evidenciar la formación del producto por la aparición de un precipitado. Este fue purificado (78 % de rendimiento) y analizado mediante HPLC-MS (Figura 34), con lo que se determinó una pureza del 97 %, y a través del análisis espectroscópico se hallaron los iones cuasimoleculares correspondientes a $[M + H]^+ = 1450$; $[M + 2H/2]^+ = 725$ y $[M + 3H/3]^+ = 484$.



XSelectC18 4.6x50 3.5µm

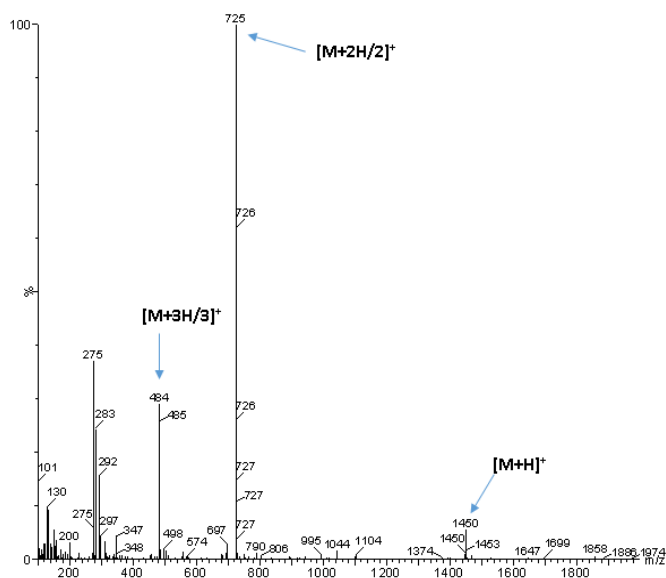


Figura 34: HPLC y HPLC-MS del compuesto (3). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 µm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 40 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H₂O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.

Por otra parte, en la reacción de síntesis del compuesto 5 no se observó la formación de un precipitado, por lo cual se obtuvo eliminando el disolvente tras dejar en agitación durante la noche. Este residuo (72% de rendimiento) fue purificado y analizado, obteniéndose el compuesto deseado con una pureza del 97 %, y a través del análisis mediante HPLC-MS se detectaron las masas

asociadas a los iones $[M + 2H/2]^{+1} = 795$ y $[M + 3H/3]^{+1} = 531$, como se muestra en la figura 35:

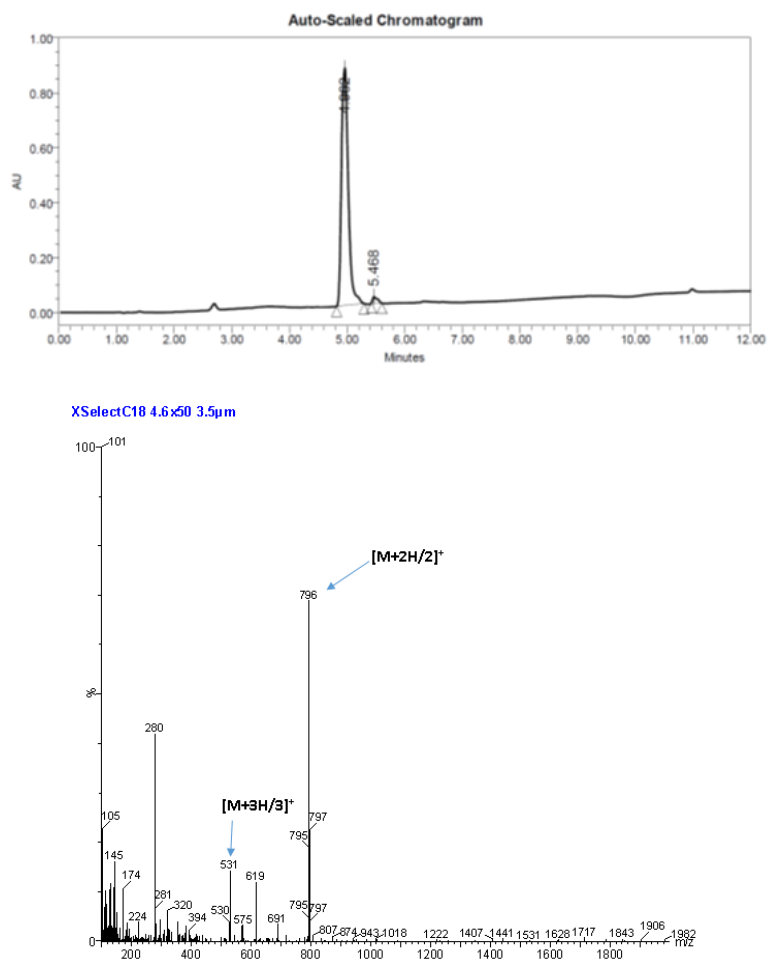


Figura 35: HPLC y HPLC-MS del compuesto (5). Para el análisis por HPLC se utilizó una columna C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 µm, 100 Å, Waters), flujo = 0.3 mL/min; gradiente = 40 – 100% B por 8 min (A = 0.1% ác. fórmico en H₂O, y B = 0.07% ác. fórmico en acetonitrilo, detector de arreglo de diodos a 214 nm.

3.3. Funcionalización de GNRs con los aductos 4 y 5

Para llevar a cabo la funcionalización de los GNRs-CTAB obtenidos previamente, estos fueron centrifugados para eliminar el exceso de CTAB

presente en la disolución, y el *pellet* fue resuspendido en agua, momento en el cual se le añadió a cada vial una disolución de los compuestos 4 o 5, siendo posteriormente incubados obteniendo de este modo los sistemas denominados GNRs-4 y GNRs-5, respectivamente. Es importante mencionar que el tiempo transcurrido desde la centrifugación inicial hasta la conjugación con los aductos debe ser el menor posible, ya que se ha observado que los GNRs pierden estabilidad al encontrarse en un entorno escaso en CTAB, lo cual es visualizado por el cambio de color de la disolución coloidal. Dado que esta situación no se presentó al funcionalizar con los compuestos sintetizados, se puede establecer que la quemisorción de los puentes disulfuro sobre la superficie de oro permitió la formación de enlaces Au-S, desplazando al CTAB desde el entorno de la nanobarra, para así producir los GNRs funcionalizados (GNRs-4 y GNRs-5). Se obtuvieron los espectros UV–Vis-NIR tanto de los GNRs-CTAB como de los GNRs conjugados, los cuales exhiben las bandas características asociadas a las bandas de resonancia de plasmón superficial transversal y longitudinal, centradas en los 530 y 800 nm, respectivamente. Por lo general, las modificaciones superficiales de los GNRs se ven reflejadas en un desplazamiento de la banda plasmónica a mayores longitudes de onda debido a cambios que ocurren en el índice de refracción y en la constante dieléctrica del sistema coloidal. Así, como se muestra en la figura 36, se pudo observar el desplazamiento característico de la banda de resonancia

plasmónica longitudinal desde los 800 nm hasta alrededor de los 850 nm. Además, se puede apreciar un ensanchamiento de la banda transversal, la cual está situada alrededor de los 530 nm, el que puede ser atribuido a la absorbanza de la carboxifluoresceína.

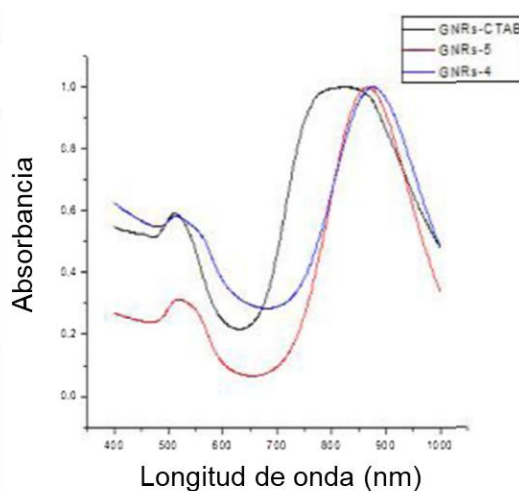


Figura 36: Espectros UV-Vis-NIR de GNRs antes y después de funcionalización con los aductos de Diels-Alder.

Cabe señalar que estos cambios ocurrieron en el transcurso de unos pocos minutos, situación que da cuenta de una rápida conjugación. Además, no se observó un ensanchamiento significativo de las bandas plasmónicas tras la conjugación.

También se llevó a cabo la determinación del diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de los GNRs funcionalizados, información que es mostrada en la Tabla 1.

Nanopartícula	Diámetro hidrodinámico promedio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
GNRs-CTAB	3/70	0,4	+43 ± 3
GNRs-4	17/175	0,4	+6 ± 3
GNRs-5	2/76	0,4	+30 ± 4

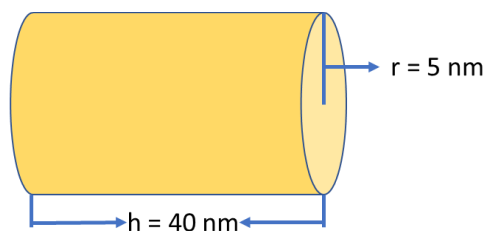
Tabla 1: Caracterización de GNR mediante DLS y Potencial Zeta.

En la tabla 1 se puede observar que la funcionalización de los GNRs con ambos aductos condujo a un incremento en el diámetro hidrodinámico, siendo este aumento más significativo para el caso de los GNRs-4. Este aumento podría ser explicado por la presencia de un proceso de agregación no permanente de las nanopartículas, producido por efecto de la concentración de la muestra analizada, tal como proponen *Gu et al.*^[58]

Por otra parte, se observa que el potencial zeta de ambos sistemas se acercó a la neutralidad, lo cual se explica por el reemplazo de moléculas de CTAB, cargadas positivamente, por los compuestos neutros 4 o 5.

Para obtener una estimación del número de moléculas de los compuestos 4 y 5 que se unieron a los GNRs se cuantificó la fluorescencia de la solución al momento de funcionalizar, y este valor se comparó con la del sobrenadante obtenido posterior a la conjugación. Con esta información, junto con la concentración de GNRs determinada mediante espectrometría de ICP-Masa, es posible hacer una estimación del número de moléculas unidas a la superficie

de la nanobarra. De este modo, y para ambas moléculas, se logró determinar una cantidad aproximada de 1840 moléculas por nanobarra, Ahora bien, asumiendo que las nanobarras de oro corresponden a un cilindro de dimensiones promedio 40 x 10 nm (largo y ancho, respectivamente), se puede calcular su área superficial del modo que se indica en la figura 37:



$$A_{\text{GNR}} = 2\pi r^2 + 2\pi rh$$

Figura 37: Esquema de la forma geométrica de los GNRs y cálculo de área superficial.

De esta manera se estima que el área superficial por nanobarra corresponde a 1413 nm², con lo que se obtiene un recubrimiento de aproximadamente 1,3 moléculas por nm². Este valor resulta inferior al que ha sido reportado para una monocapa auto-ensamblada (SAM, del inglés *self-assembled monolayer*) formada por alcanotioles (3,6 moléculas por nm²).^[59] Este bajo grado de funcionalización podría ser explicado por el impedimento estérico que produce la carboxifluoresceína, lo cual impide el autoensamblaje de la monocapa. Esto se refrenda por el valor de potencial zeta obtenido para ambos sistemas, el cual conserva valores positivos lo cual indica que aún persiste CTAB

recubriendo a la nanobarra. Es importante señalar que este agente estabilizante se ordena formando una bicapa en la que las cadenas de hexadecilo, de carácter hidrofóbico, están agrupadas en la parte central. Dado el grosor de esta bicapa (3 nm aprox.) constituye un excelente sitio para ubicar moléculas poco solubles en agua como resultan ser los aductos de Diels-Alder utilizados, las cuales podrían ser retenidas en la etapa de funcionalización sin estar necesariamente unidas a la superficie del GNR.^[60]

3.4. Estudio de la orientación de los aductos en los GNRs funcionalizados

Con el objetivo de verificar la funcionalización de cada uno de los aductos sobre la superficie de los GNRs, y a la vez evaluar el modo en que estas moléculas se disponen sobre los mismos se realizaron análisis mediante espectroscopía Raman. Con este fin, en una fase inicial se obtuvieron los espectros Raman de los compuestos (4) y (5), los cuales se muestran de color rojo en la figura 38.

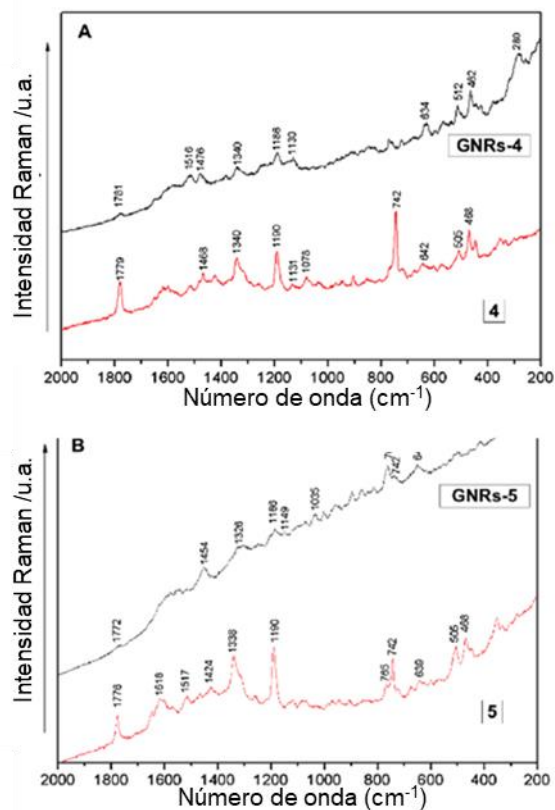


Figura 38: Espectros Raman de los compuestos (4) y (5) antes (en rojo) y después (en negro) de conjugar sobre nanobarras de oro.

En estos se encontraron señales características y prácticamente idénticas en 1770, 1650, 1340, 1190, 742 y 642 cm^{-1} aproximadamente, con una intensidad relativa media-fuerte. Además, para ambos compuestos se aprecian señales en la región comprendida entre 950 – 1150 cm^{-1} . La asignación propuesta para estas bandas se muestra en la tabla 2 y se basa en publicaciones anteriores.^[61,62]

Raman 4 (cm ⁻¹)	Raman 5 (cm ⁻¹)	Asignación	SERS 4 (cm ⁻¹)	SERS 5 (cm ⁻¹)
950 - 1150	950 – 1150	vC-C		
	1440			
1618	1618	vC=O de cadena		
1340	1338	Lactona	Debilitada	
1779	1776	Carboxilo	1781, debilitada	Ausente
1190	1190	Anillo Aromático	debilitada	1186, disminuida
742	742	vC-S	ausente	761, aumentada
	1424	fluoróforo		1454, aumentada
	1338	fluoróforo		1326
	1190	fluoróforo		disminuida
642	639	c-s	634, aumentada	647, aumentada

Tabla 2: Señales Raman de los compuestos (4) y (5) libres y funcionalizados a GNR (SERS).

En concordancia con estas publicaciones, las diferencias de intensidad relativa entre uno y otro espectro se deben a cambios conformacionales. Así, las bandas situadas entre 950 y 1150 cm^{-1} , que corresponden a estiramientos de enlaces C-C de las cadenas alifáticas, presentan modificaciones de este tipo. Otra banda que presenta modificaciones de este tipo es la ubicada a 1618 cm^{-1} , la cual se atribuye al grupo carbonilo. Esta vibración entrega información tanto respecto del fragmento que está ubicado en la cadena alifática, como de la zona media situada entre los anillos del fluoróforo. La región correspondiente al fluoróforo también posee una banda ubicada alrededor de 1770 cm^{-1} , que es atribuida a un estiramiento C=O de la xantona. La banda situada a los 1340 cm^{-1} está asociada a estructuras de ésteres aromáticos y a lactonas, mientras que la que se encuentra a 1190 cm^{-1} corresponde a una flexión de CCH en el anillo aromático. Finalmente, las bandas a 742 y 642 cm^{-1} se asignan a vibraciones del enlace C-S.

Al realizar el espectro Raman de los sistemas funcionalizados a los GNRs se pueden observar modificaciones en la intensidad o desplazamientos de algunas bandas respecto al observado en los compuestos libres.^[63] Así, en el caso de GNRs-4 la banda del carboxilo del fluoróforo, originalmente situada a 1779 cm^{-1} se desplaza a los 1781 cm^{-1} debido al efecto de la superficie metálica, reduciendo significativamente su intensidad. Del mismo modo, tanto la banda fuerte ubicada a los 1340 cm^{-1} como la que aparece a 1190 cm^{-1} , que

están asociadas al fluoróforo, se aprecian debilitadas. Lo anterior indica que el fluoróforo se encuentra alejado de la superficie metálica. Por otra parte, la banda fuerte de 742 cm^{-1} asociada a $\nu\text{C-S}$ está ausente. Esta banda aparece en compuestos del tipo sulfuro de alquilo como una o más bandas. Ahora bien, si el enlace se encuentra en un plano paralelo a la superficie metálica, las reglas de selección del efecto SERS indican que ese modo de vibración no debería ser observado. Este enlace también podría ser modificado electrónicamente por la interacción oro-azufre. Esto se puede verificar por la aparición de una banda a 280 cm^{-1} . Otra banda de $\nu\text{C-S}$, situada originalmente a 642 cm^{-1} experimentó un aumento de intensidad, así como un desplazamiento a 634 cm^{-1} por efecto de la superficie, con lo que se corrobora que la interacción ocurre a través del enlace C-S.

En el caso del espectro de GNRs-5 se observan diferencias más notorias respecto al espectro de compuesto libre. La banda relacionada al C=O del fluoróforo ubicada a 1776 cm^{-1} prácticamente desaparece por efecto de la superficie. Otras bandas, también del C=O del fluoróforo ubicadas originalmente a 1424 y 1338 cm^{-1} se desplazan a 1454 y 1326 cm^{-1} respectivamente. En el primer caso, se observa un leve aumento de intensidad por efecto de la superficie metálica. En cambio, en la segunda banda se aprecia el efecto opuesto. Estos cambios espectrales indican una interacción débil entre la superficie del GNR y el fluoróforo. Además, la leve disminución de

la banda perteneciente al anillo aromático del fluoróforo situada a 1190 cm^{-1} indica que este fragmento de la molécula no se encuentra lejos de la superficie. Otro aspecto importante es que en el espectro Raman de GNRs-5 las bandas situadas entre 950 y 1150 cm^{-1} , que son atribuidas a vibraciones de las cadenas alifáticas, fueron observadas claramente, lo cual es indicativo de que éstas se encuentran cercanas a la superficie. De la misma manera, las bandas ν_{CS} que originalmente aparecían a 742 y 639 cm^{-1} se desplazaron hasta los 761 y 647 cm^{-1} , además de que su intensidad se vio incrementada. Esto señala que ambas señales están influenciadas por la nanopartícula. Paralelamente, esta influencia también se ve en la banda ubicada en 761 cm^{-1} , que experimenta un aumento de intensidad. Esta banda ha sido relacionada con una vibración del grupo epoxi del fluoróforo. Finalmente, la ν_{CS} a 647 cm^{-1} , que muestra una intensidad media ha sido influenciada por la superficie, e indicaría la inclinación del enlace C-S hacia la misma.

En conclusión, se puede señalar que el compuesto (4) se encuentra orientado de modo perpendicular a la superficie de oro, interaccionando sólo a través del átomo de azufre. En cambio, y de acuerdo con los resultados, el compuesto (5) se encuentra inclinado sobre la superficie interaccionando a través del átomo de azufre, como se muestra en la figura 39. De esta manera, tanto el fluoróforo como la cadena alifática son influenciados por la superficie. La posibilidad de interacción puede ser atribuida a la mayor longitud de la cadena en el

compuesto (5), lo cual otorga mayor flexibilidad al sistema.

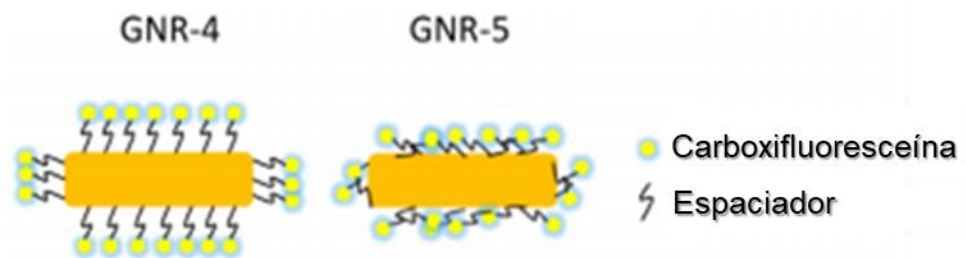


Figura 39: Esquema hipotético de la orientación de (4) perpendicular y (5) inclinado sobre la superficie de los GNR.

3.5. Liberación fototérmica del fluoróforo desde GNRs4 y GNRs-5.

La liberación fototérmica del compuesto (1) fue evaluada por fluorescencia. Para esto las muestras fueron irradiadas con un láser continuo de 808 nm y potencia de 350 mW por 25, 50, 100, 150 y 180 minutos. Para separar las moléculas liberadas, las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g y se cuantificó la intensidad de fluorescencia presente en los sobrenadantes. Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de liberación respecto a un valor máximo obtenido a partir de calentar las muestras durante 30 minutos a 90 °C. Este perfil de liberación térmica se muestra en la figura 40.

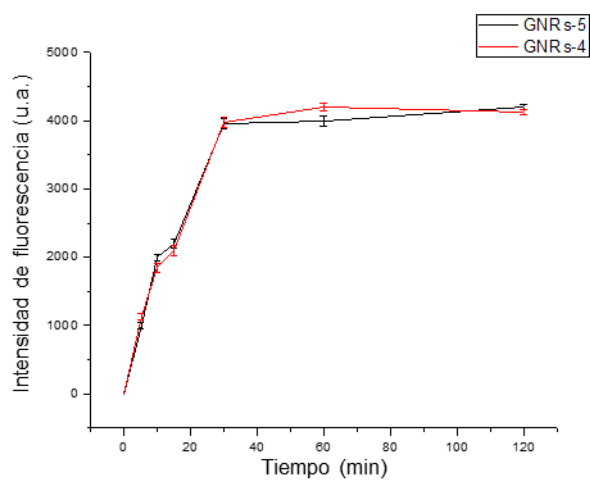


Figura 40: Perfil de liberación térmica del compuesto (1) desde los GNRs conjugados mediante calentamiento a 90°C.

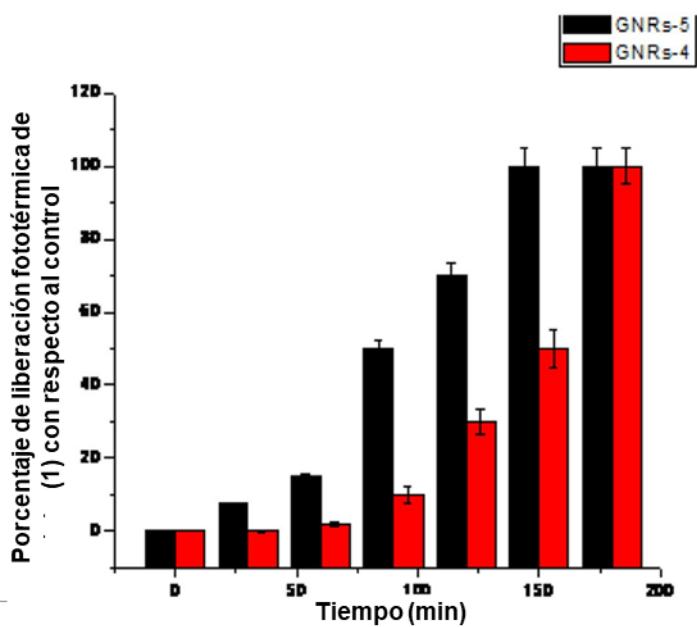


Figura 41: Perfil de liberación del compuesto (1) desde la superficie de las nanobarras mediante fototermia irradiando las nanobarras con un láser de 808 nm (350 mW).

En este contexto, es importante mencionar que la liberación del compuesto (1), que se muestra en la figura 41, resultó ser más rápida mediante calentamiento respecto a la producida por el efecto fototérmico, dado que el máximo de liberación del fluoróforo se alcanzó a las 3 horas de irradiación para ambos sistemas. No obstante, el perfil de liberación para cada uno de ellos difirió en forma significativa ya que la liberación del compuesto (1) desde GNRs-5 se inició a los 30 minutos de irradiación y se alcanzó el máximo a los 150 minutos, mientras que en el caso de GNRs-4, ésta comenzó a los 90 minutos y se completó a los 180 minutos. Además, para corroborar la presencia del compuesto (1) en el sobrenadante de las muestras irradiadas se realizó un análisis mediante espectrometría de masas, el cual se muestra en la figura 42.

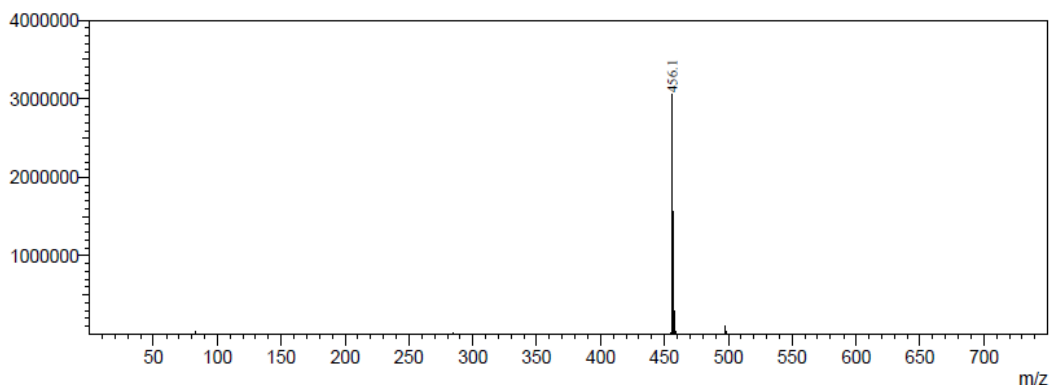


Figura 42: Espectro de masas del compuesto liberado desde los GNRs. La masa observada corresponde al derivado de carboxifluoresceína.

Adicionalmente, para determinar si el fluoróforo permaneció en la superficie de las nanopartículas después de la irradiación, se compararon los espectros Raman de los pellets obtenidos antes y después de irradiar. En estos se puede

apreciar una disminución considerable de las bandas asociadas al fluoróforo, como se puede observar en la figura 43.

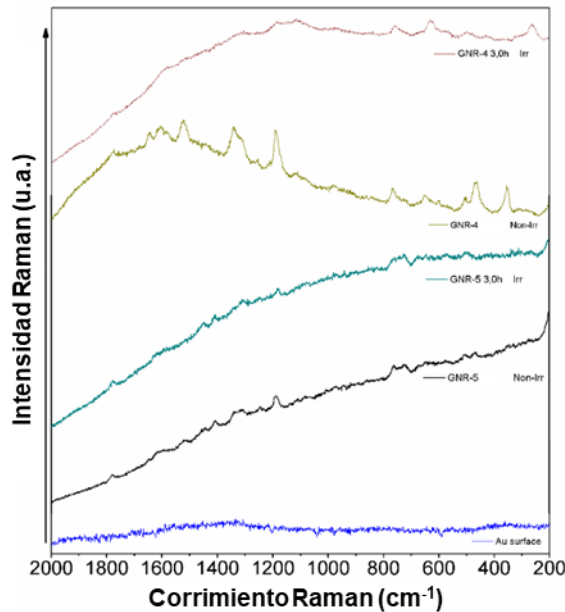


Figura 43: Espectros Raman de GNRs-4 y GNRs-5 antes y después de irradiar.

En estos espectros se muestra que la señal característica asociada al anillo del fluoróforo ubicada a los 1190 cm⁻¹ experimenta una disminución significativa de intensidad después de la irradiación de ambos sistemas, lo cual está en concordancia con la liberación del compuesto (1) desde la superficie.

Por otra parte, se tomaron espectros de UV-Vis-NIR para determinar si el proceso de irradiación afecta la estabilidad coloidal. Así, en la figura 44 se pueden observar cambios menores en las bandas plasmónicas, además de no mostrar signos aparentes de agregación. Esto es indicativo de que los GNRs funcionalizados conservan su integridad después del proceso fototérmico.

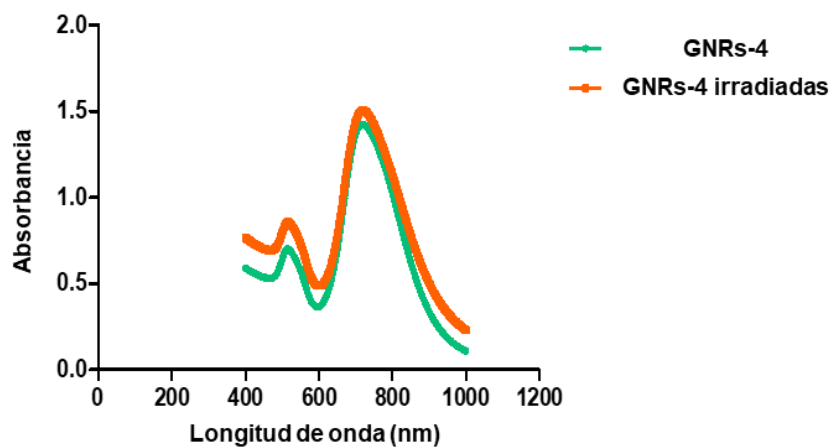


Figura 44: Espectro UV-Vis-Nir de GNRs-4 antes y después de irradiar.

Un control que se llevó a cabo durante el proceso de irradiación de los GNRs funcionalizados fue medir la temperatura que alcanzaba la disolución coloidal transcurridos distintos períodos de tiempo. De este modo se observó que en promedio las temperaturas fueron de 46 y 48 °C para GNRs-4 y GNRs-5. Con este dato en consideración se procedió a calentar muestras de GNRs funcionalizados con (4) o (5) a 48 °C durante 180 minutos, período tras el cual no se observó la presencia del fluoróforo, descartando así que la liberación haya sido producida por efecto de la temperatura.

En base a los experimentos anteriores se puede concluir que la orientación que tomen los aductos de Diels-Alder con respecto a la superficie resulta relevante para transferir la energía generada por el proceso fototérmico. Como se señaló anteriormente, el fragmento de la molécula correspondiente al aducto está

inclinado hacia la superficie de la nanobarra en el caso de GNRs-5, lo cual puede generar una mejor transferencia de calor para, de esa manera, producir la reacción de retro Diels-Alder.

Capítulo 4: Metodología de síntesis de péptidos y liberación de BH3 mediante irradiación

4.1. Síntesis de péptidos

La síntesis de los péptidos se realizó de manera manual en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno poroso. Para la agitación se utilizó una varilla de teflón. La eliminación de disolventes, reactivos y posibles subproductos formados durante el acoplamiento se realizan mediante filtración. El sistema utilizado para realizar los lavados por filtración se muestra en la Figura 45.

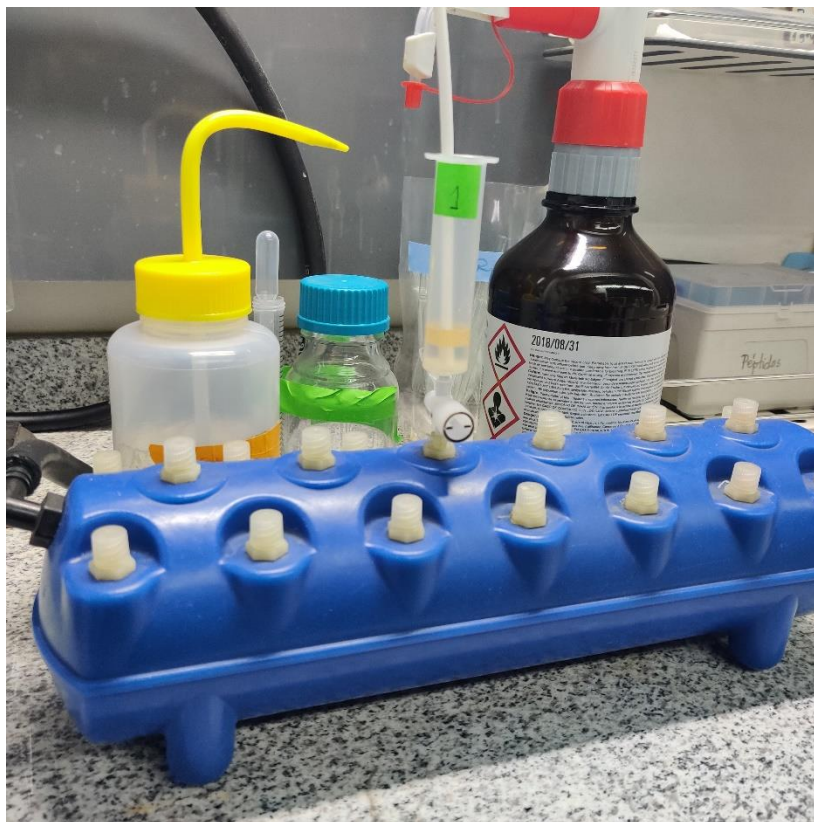


Figura 45: Equipo empleado para la síntesis de péptidos en fase sólida.

4.2. Tests de identificación grupos funcionales en péptidos

4.2.1. Test cualitativo de Kaiser o ninhidrina

El test cualitativo de ninhidrina, desarrollado por Kaiser^[64], es el más utilizado para determinar la presencia o la ausencia de grupos amino libres dado que se trata de un test rápido y sencillo.

Para realizar el ensayo se toma una pequeña muestra de peptidil-resina seca (1-2 mg) y se coloca en un tubo de vidrio. Se añaden 4 gotas de **reactivo A** y 2 gotas de **reactivo B**. A continuación, se calienta el tubo en una placa termorregulada a 110 °C durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se enfría y se observa la coloración que ha tomado la disolución. Una coloración amarilla da cuenta de la ausencia de aminos primarios (test negativo), lo que indica que al menos el 95% de los puntos funcionales se encuentran bloqueados. Por el contrario, una coloración azul-verdosa (test positivo) señala la presencia de aminos primarios. Es importante señalar que puede suceder que algunos aminoácidos como la serina, el ácido aspártico o la asparagina no den la coloración azul oscuro que se espera cuando existen grupos amino libres.

Los reactivos se prepararon de la manera que se detalla a continuación:

Reactivo A: se preparó una disolución en caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 ml). Por otro lado, se añadieron 2 ml de una disolución de cianuro de potasio (65 mg) en agua (100 ml) sobre 100 mL de piridina. A ambas

mezclas se les añadieron 4 g de resina Amberlite MB-3 y se agitaron durante 45 minutos. Seguidamente se filtraron y se mezclaron las dos disoluciones.

Reactivo B: se preparó una disolución de ninhidrina (2.5 g) en etanol (50 ml).

4.2.2. Test de cloranilo

Este ensayo se utiliza para evaluar los acoplamientos sobre aminas secundarias como la prolina. El reactivo que se utiliza es una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en tolueno (0.75 mg en 25 ml). Para realizar la prueba se toma una pequeña muestra de peptidil-resina seca en un tubo (1-2 mg) y se le añaden 5 gotas de cloranilo en tolueno y 20 gotas de acetona. Se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente. La aparición de una coloración azul-verdosa indica la presencia de aminas secundarias libres y, por tanto, un resultado positivo del test.

4.3. Metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida

Los péptidos BH3, TAT y DV3 se sintetizaron empleando el esquema de protección Fmoc/tBu. Todos los aminoácidos tenían su grupo amino protegido con el grupo fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc). Para la obtención de los péptidos con el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico se utilizó la resina Cloruro de 2-clorotritilo (2CTC) (del inglés *2-chlorotriyl chloride*) con una funcionalización inicial de 1,0 mmol/g. A continuación, se detallan los procesos

de las diferentes etapas que tienen lugar durante la síntesis de péptidos en fase sólida.

4.3.1. Incorporación del primer aminoácido.

La incorporación del aminoácido C-terminal sobre la resina 2CTC se realizó mediante la formación de un enlace éster, utilizando los reactivos y condiciones de acoplamiento habituales que se describen a continuación.

En una jeringa de polipropileno se añaden 200 mg de resina 2CTC y se lava con N,N-dimetilformamida (DMF) y diclorometano (DCM); tres veces con cada uno de manera alternada, de modo de expandir la resina. Posteriormente, se añade el primer aminoácido (1 eq. respecto a la funcionalización de la resina) disuelto con la mínima cantidad de DMF, junto con 1 eq. de diisopropilmetilamina (DIEA). Luego se añaden 6 eq. de DIEA y se lleva a agitación orbital durante 2 horas. Al finalizar este tiempo se agrega metanol (160 μ L) de manera de bloquear los sitios de la resina que hayan quedado vacantes. Transcurrida 1 hora de reacción a temperatura ambiente, se eliminan los excesos de reactivo lavando con DMF y DCM.

Mediante la detección de la N-fluorenilmetilpiperidina es posible determinar el grado de incorporación del primer aminoácido sobre la resina, y por tanto su funcionalización inicial real, aprovechando el carácter cromóforo del aducto N-fluorenilmetilpiperidina que se obtiene al liberar el grupo Fmoc con piperidina

(figura 46).

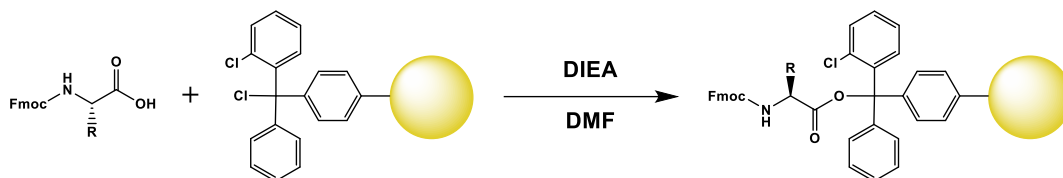


Figura 46. Representación de la unión del primer aminoácido a la resina.

4.3.2. Determinación del grado de unión del primer aminoácido:

Para llevar a cabo este ensayo se tomaron entre 5 y 10 mg de Fmoc-aminoácido-resina seca y se le añadió 1 mL de piperidina al 20% en DMF. Se agitó suavemente durante 20 minutos y del sobrenadante obtenido se tomaron 30 μ L y se diluyeron con DMF hasta un volumen final de 3 mL. Se midió la absorbancia de esta disolución a 301 nm utilizando como blanco DMF puro. La funcionalización de la resina en mmol/g viene dada por la siguiente expresión:

$$\text{Grado de funcionalización} = \frac{Abs_{301} \times 101}{7,8 \times \text{masa resina (mg)}}$$

Esta información permite ajustar las masas de reactivos y así evitar el desperdicio de aminoácidos en caso de haber obtenido una sustitución menor a la esperada (1 mmol/g de resina).

A continuación, se detallan las diferentes etapas de los procesos de lavado de la peptidil- resina, eliminación del grupo Fmoc e incorporación de aminoácidos.

4.3.3. Eliminación del grupo protector Fmoc

Para realizar la liberación del grupo protector Fmoc se utilizó piperidina como base en todos los casos. Este proceso se realizó de la manera que se describe en la siguiente tabla:

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min) x n° de repeticiones
1	Piperidina 20% en DMF	Eliminación grupo Fmoc	5 x 2
2	DMF	Lavado	1 x 3
3	DCM	Lavado	1 x 3
4	Test de ninhidrina (o cloranilo) para verificación aminas libres (test positivo)		

Tabla 3: Método de eliminación del grupo Fmoc.

4.3.4. Incorporación de los aminoácidos

En todos los casos para el acoplamiento de los aminoácidos se empleó diisopropilcarbodiimida (DIC) como activador del grupo carboxilo, además del reactivo Oxyma-Pure ((2Z)-2-ciano-2-(hidroxiimino acetato de etilo) como inhibidor de racemización disueltos, junto con el aminoácido, en 1-2 mL de DMF.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min) x n° de repeticiones
1	Fmoc-Aa(X)-OH: Oxyma Pure: DIC 3:3:3 eq en DMF	Acoplamiento	120 x 1
2	DMF	Lavado	1 x 3
3	DCM	Lavado	1 x 3
4	Test de ninhidrina (o cloranilo) para verificar ausencia de aminas (test negativo)		

Tabla 4: Método de acoplamiento de aminoácidos.

Al finalizar la secuencia peptídica se procedió a remover el grupo Fmoc del aminoácido N-terminal del modo señalado previamente (apartado 4.3.3.)

En el caso de la síntesis del péptido BH3, es importante señalar que el último aminoácido incorporado en la secuencia, que corresponde a Leucina, se encuentra protegido en su grupo α -amino con el protector Boc (Butiloxicarbonil, lo que permite su posterior remoción de manera simultánea con los grupos protectores de las cadenas laterales.

4.3.5. Eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y liberación del péptido de la resina.

Una vez finalizada la síntesis del péptido (exclusivo para los péptidos DV3 y TAT) que se encuentra aún unido al soporte sólido (resina) y con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas, se realizó la liberación del péptido de la resina y la desprotección de los grupos protectores. Estos procesos se realizaron en una sola etapa, en medio ácido y en presencia de capturadores de carbocationes, esto dependiendo del tipo de grupos protectores presentes en la cadena. Los capturadores de los carbocationes empleados fueron el triisopropilsilano (TIS) y agua. El agua actúa como agente quelante de los cationes tBu, mientras que el TIS interviene en la eliminación del grupo trifenilmetil de los residuos de His y Gln.

Para liberar el péptido de la resina y de los grupos protectores, se trató la peptidil-resina con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), TIS y agua (95:2.5:2.5). El volumen de la mezcla osciló entre 8 y 10 ml, los cuales fueron añadidos de forma gradual junto con 120 μ L de TIS. El tiempo de reacción fue de 2 horas como base, más 1 hora por cada residuo de arginina que contuviese la secuencia. Transcurrido este tiempo, la disolución se vertió sobre éter frío para producir la precipitación del péptido. Se agitó y se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió 3 veces. Terminado los lavados, el residuo se dejó secar y se disolvió en

agua Milli-Q. Esta disolución se congeló y liofilizó. Una vez concluida la liofilización los péptidos fueron conservados a -18 °C para su posterior identificación.

La estructura de los péptidos TAT y DV3 se encuentran representados en las figuras 47 y 48, respectivamente.

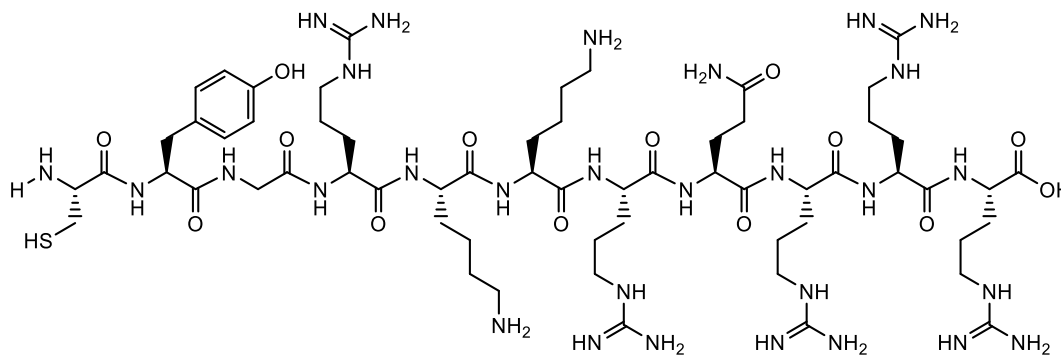


Figura 47: Estructura del péptido TAT.

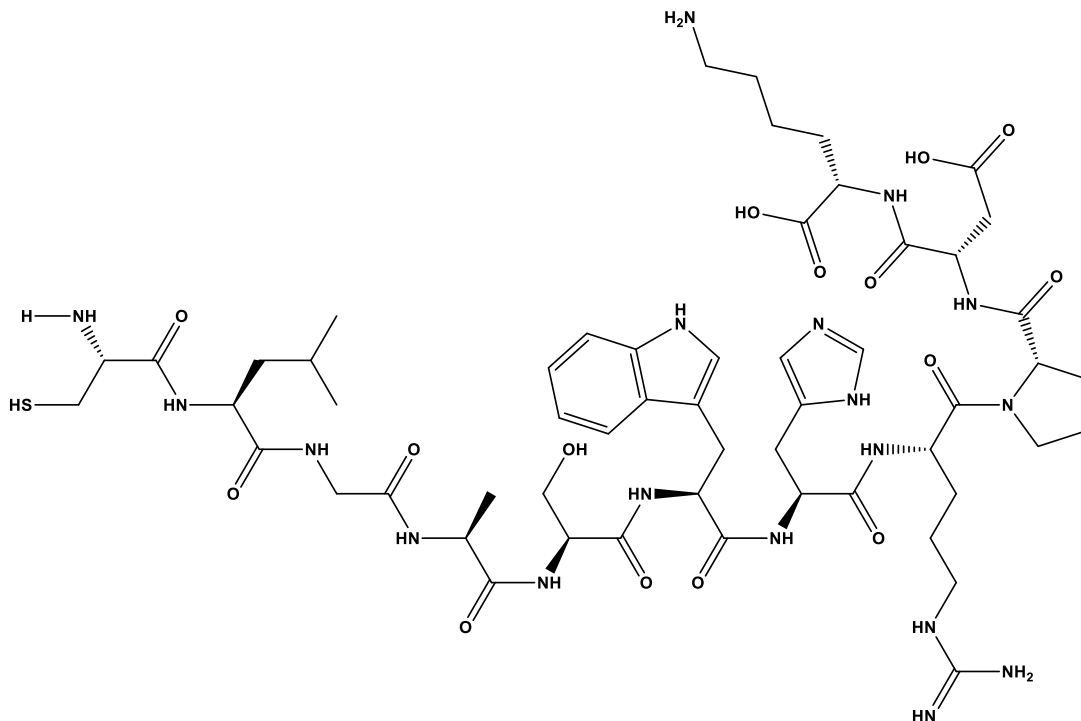


Figura 48: Estructura del péptido DV3.

4.3.6. Liberación del péptido con sus aminoácidos protegidos de la resina.

Este método se aplica cuando el péptido obtenido debe ser utilizado en una reacción posterior (en este caso el péptido BH3), motivo por el cual se mantiene los grupos protectores de las cadenas laterales. Para escindir el péptido dejando el extremo C-terminal como ácido libre se utilizó una disolución de TFA al 1% en diclorometano (DCM). En la jeringa que contiene la peptil-resina se añadió un volumen aproximado de 10 mL, en forma paulatina, de la disolución de TFA, la cual fue filtrada por gravedad sobre un balón que contiene 60 mL de agua y 3 mg de carbonato de amonio en agitación

constante. Al finalizar la filtración se eliminó el DCM mediante rotavapor, el sobrenadante fue distribuido en tubos Falcon y el sólido que queda adherido al balón es disuelto con acetonitrilo (ACN). Esta disolución fue vertida en los tubos Falcon de modo de no superar un 10% de ACN en cada mezcla. Posteriormente, fueron congelados y se liofilizaron, conservándose el producto obtenido a -18 °C para su posterior identificación. La figura 49 representa el péptido BH3 protegido, junto con una forma abreviada del mismo.

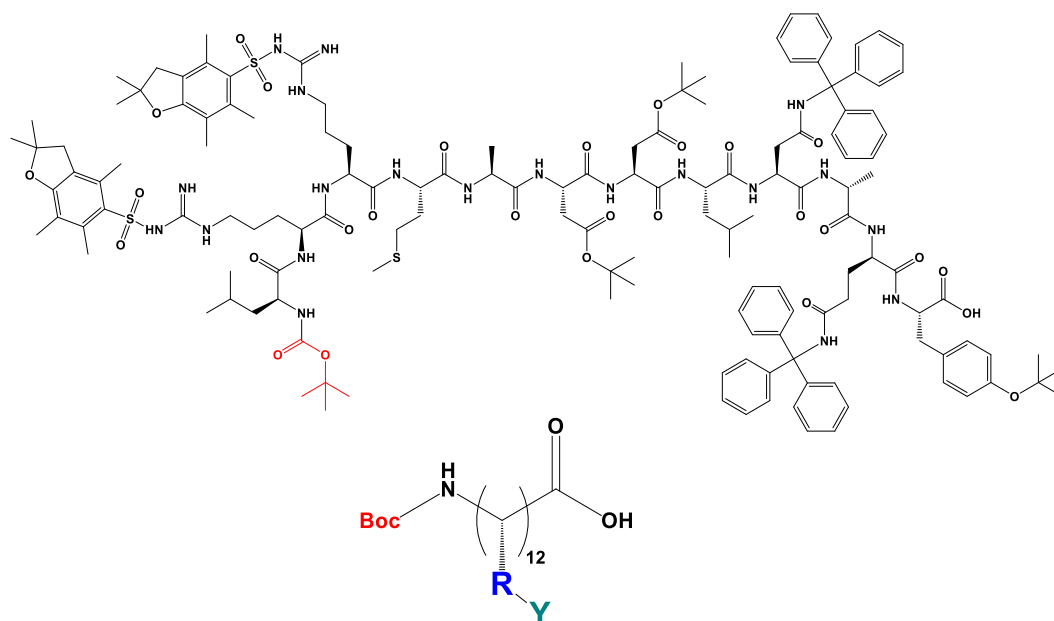


Figura 49: Estructura del péptido BH3 protegido. En la forma abreviada las cadenas laterales y sus grupos protectores se denotan con R e Y, en azul y verde respectivamente.

4.4. Formación del BH3-aducto Diels-Alder.

Para llevar a cabo la unión del péptido BH3 con los espaciadores a través de la formación del aducto de Diels-Alder, y con el fin de aumentar el rendimiento de esta reacción, se diseñaron tres estrategias de síntesis, las cuales se exponen a continuación:

4.4.1. Reacción de Diels-Alder entre furfurilamina y los espaciadores

Para llevar a cabo esta síntesis se agregaron en viales 50 mg de los espaciadores derivados de los ácidos maleimidohexanoico o maleimidoundecanoico (Compuestos 2 o 3) junto con 2,2 equivalentes de furfurilamina en 1 mL de metanol. Esta reacción se dejó agitando durante 1 semana, tras lo cual se eliminó el disolvente mediante vacío. Los sólidos obtenidos fueron disueltos en acetonitrilo al 10% en agua, congelados y liofilizados. La figura 50 representa esta ruta sintética.

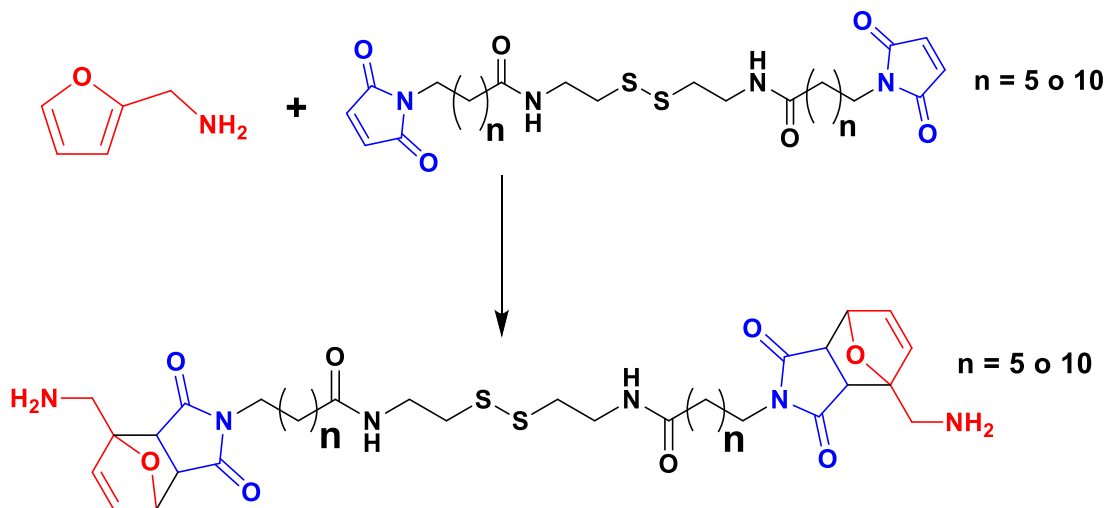


Figura 50: Esquema de reacción de Diels-Alder entre furfurilamina y espaciadores.

4.4.2. Reacción de Diels-Alder en fase sólida

Para realizar esta síntesis, en 2 jeringas de polipropileno se añadieron 200 mg de resina cloruro de 2-clorotritilo, y se realizó el procedimiento de carga para los ácidos maleimido-hexanoico o maleimido-undecanoico, descrito en la sección 4.3.1., para obtener una proporción de carga de 1 meq/g de resina. Posteriormente, se añadieron 5 mL de DMF en cada jeringa junto con 10 equivalentes de furfurilamina. La reacción se llevó a cabo durante una semana, tras lo cual se procedió a lavar la resina para finalmente escindir los productos mediante la utilización de TFA al 95% de manera análoga a lo expuesto en la sección 4.3.5. Finalmente, los productos fueron disueltos en acetonitrilo al 10% en agua, congelados y liofilizados. La figura 51 esquematiza esta reacción:

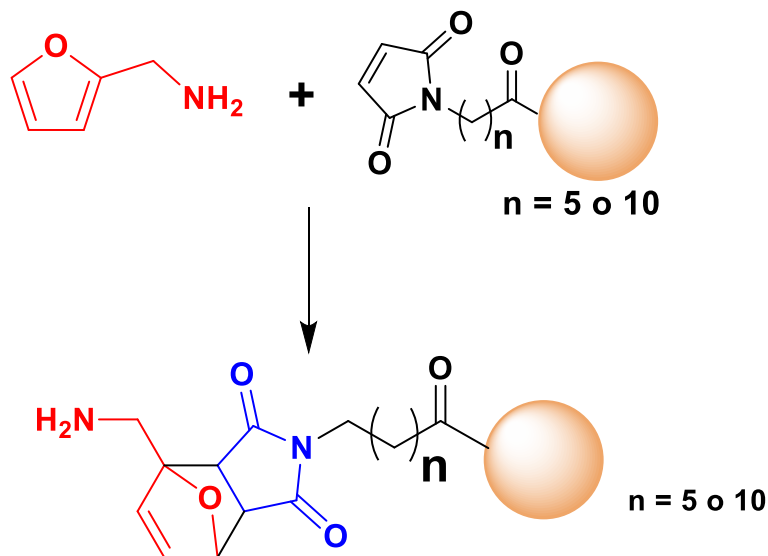


Figura 51: Esquema de reacción de Diels-Alder en fase sólida entre furfurilamina y los ácidos maleimidohexanoico o maleimidoundecanoico.

4.4.3. Síntesis de BH3-furfurilamida (BH3-FAM)

Para poder formar el aducto de Diels-Alder con el péptido BH3-Boc protegido, es necesario unir este péptido a furfurilamina, la cual actúa como dieno. Así, en un vial de 5 mL con agitación magnética se añadió 1 mL de DMF, en la cual fueron agregados 82 mg del péptido protegido BH3-Boc, 12 mg de HBTU, 5 μ L de DIEA y 3 μ L de furfurilamina. Esta reacción se dejó agitando durante 12 horas, tras lo cual la mezcla se precipitó con agua Milli-Q y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos en un tubo Falcon, eliminando posteriormente el sobrenadante. El sólido obtenido fue disuelto en acetonitrilo al 10% en agua,

congelado y liofilizado. La figura 52 muestra una representación de la ruta sintética.

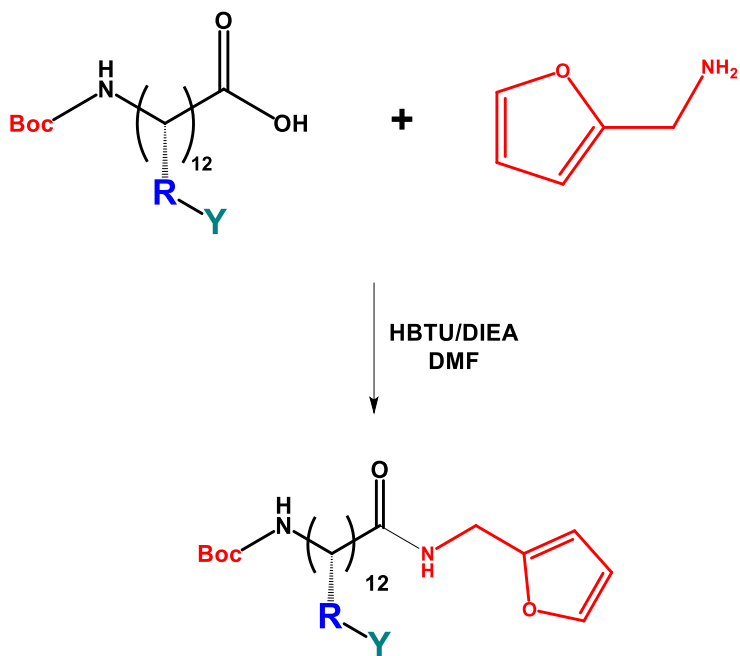


Figura 52: Esquema de síntesis del péptido BH3-FAM protegido.

4.4.2. Desprotección de los grupos laterales del péptido BH3-FAM

Una vez obtenido el péptido modificado con furfurilamina, se procedió a eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales que aún se encuentran presentes en el péptido. Esta reacción se representa en la figura 53.

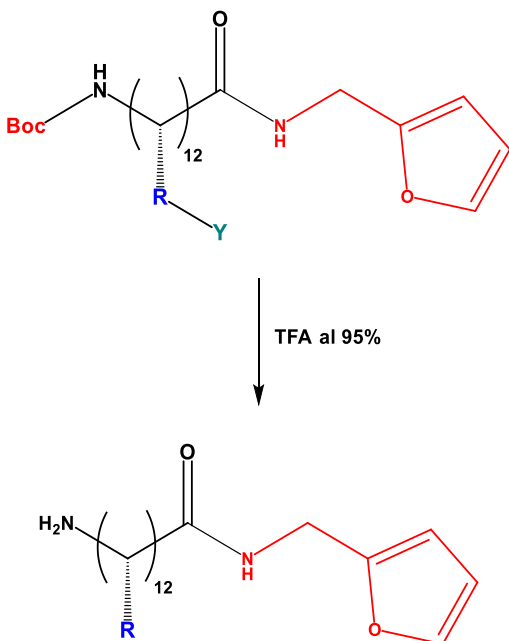


Figura 53: Esquema de eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales (Y) del péptido BH3-FAM.

Para esto el compuesto se llevó a un matraz de fondo redondo de 100 mL y se le adicionó de manera fraccionada porciones de 2 mL de la mezcla (TFA/TIS/H₂O) al 95% hasta completar un total de 10 mL, tras lo cual se añadieron inmediatamente 120 μ L de TIS. Luego de este procedimiento se dejó en agitación durante 4 horas, tras lo cual la mezcla se precipitó con éter frío. La solución fue centrifugada y el sólido obtenido fue disuelto en acetonitrilo al 10 % en agua y se liofilizó para su posterior identificación.

4.4.3. Síntesis de aductos Diels-Alder de BH₃-FAM (compuestos 6 y 7)

En un vial se agregaron 22 mg del péptido BH₃-FAM (2 eq) y 4 mg de los espaciadores derivados de los ácidos maleimidohexanoico y maleimidoundecanoico (compuestos 2 y 3) (1 eq) en DMF. En la figura 54 se muestra un esquema de esta síntesis.

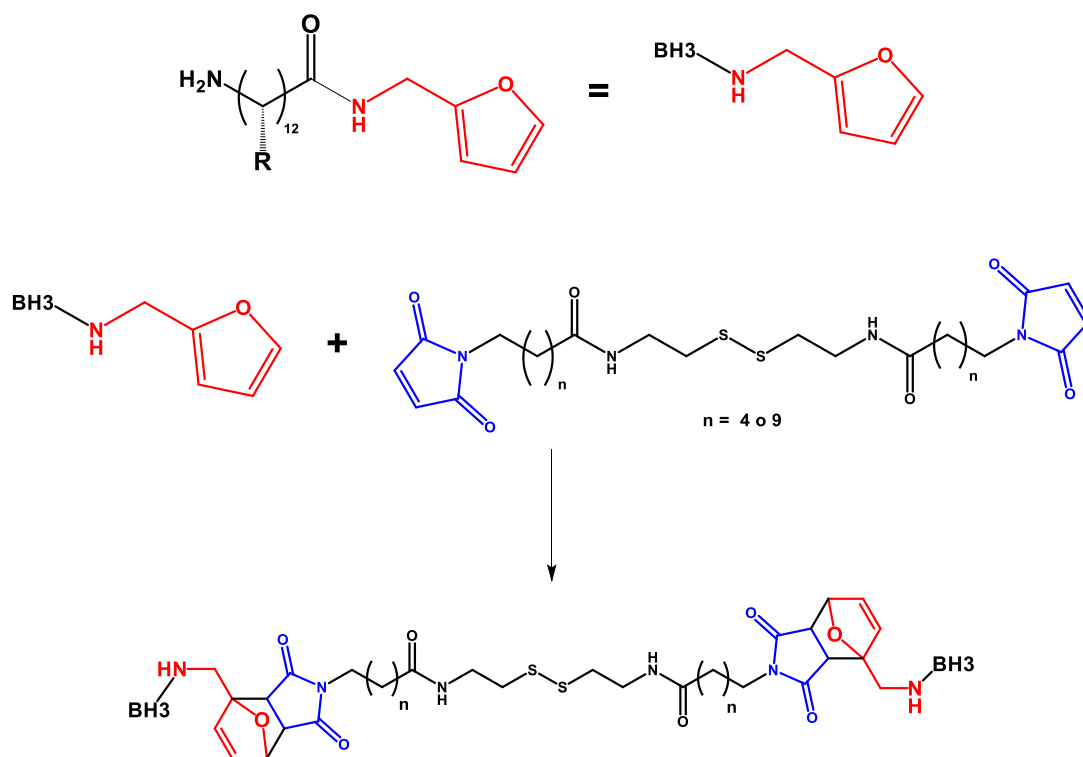


Figura 54: Esquema de síntesis de los aductos de Diels-Alder entre el péptido BH₃-FAM y los espaciadores 2 y 3 (n = 4 y 9, respectivamente).

La reacción se dejó en agitación durante 12 horas para completar la formación del aducto de Diels-Alder. La mezcla se precipitó sobre agua Milli-Q, siendo centrifugada posteriormente. El sólido obtenido fue disuelto en acetonitrilo al

10% en agua y se liofilizó para su posterior identificación.

4.5. Funcionalización de los GNRs con los péptidos TAT, DV3 y BH3-aducto Diels-Alder

Para llevar a cabo la funcionalización de las GNRs-CTAB con los péptidos TAT, DV3 y BH3-aducto Diels-Alder se utilizó una proporción equimolar de los tres compuestos. Así, en un vial de 10 mL se añadieron 4 mL de disolución de GNRs-CTAB de concentración 1 nM. Posteriormente, se añadió 1 mL de la disolución de los péptidos en DMF, en porciones de 200 μ L cada 15 minutos con agitación constante. Al concluir la adición se dejó en agitación durante 24 horas para completar la funcionalización, tras lo cual la disolución se centrifugó a 4000 rpm por 60 minutos para poder eliminar el sobrenadante, en el que pueden quedar moléculas de péptidos sin funcionalizar. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 4 mL de agua Milli-Q, siendo ya apto para identificación y la posterior irradiación.

4.6. Determinación de la liberación fototérmica desde GNRs funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y aducto de BH3

Una muestra de 250 μ L de GNRs funcionalizadas con los péptidos TAT, DV3 y BH3-aducto Diels-Alder fue irradiada con un láser continuo (longitud de onda: 808 nm; Potencia: 350 mW) en una cámara cerrada, donde el láser fue puesto

sobre la muestra de tal manera que cubriera toda la solución (figura 55). La muestra fue irradiada durante 24 horas.

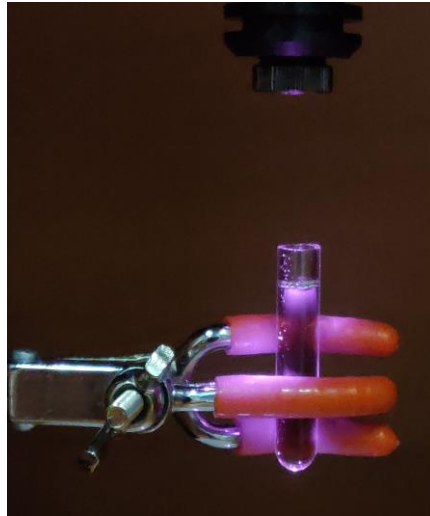


Figura 55: Sistema de irradiación. La muestra, que se encuentra en el tubo, es irradiada longitudinalmente con un láser de 808 nm y de 350 mW de potencia.

Al finalizar el proceso la solución fue centrifugada a 1430xg durante 60 minutos para separar el sobrenadante, el cual fue liofilizado para su posterior identificación mediante MALDI, con el fin de verificar si el péptido BH3-FAM había sido liberado de la superficie de los GNRs por efecto de la irradiación.

Por otra parte, y con el fin de observar si los GNRs son afectados en su integridad durante el proceso de irradiación, el *pellet* de la muestra irradiada fue resuspendido en agua Milli-Q para ser caracterizadas por espectroscopia UV visible, potencial Z y STEM.

Asimismo, se determinó la concentración de BH3-FAM en el sobrenadante, de

las muestras irradiadas por HPLC.

4.7. Evaluación de los efectos de las nanopartículas y del producto de irradiación sobre la viabilidad celular en células tumorales HeLa.

Se evaluó el efecto de las nanopartículas y el producto liberado por irradiación (BH3-FAM) sobre la viabilidad celular en células de cáncer cérvico uterino HeLa a partir de un cultivo celular de confluencia cercana a 70%. Se sembraron 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos el día previo a la exposición de los tratamientos. Al segundo día se incubó las células con las muestras BH3 (2.5 μM), BH3-FAM (2.5 μM) y GNRs-6 (1 nM), tal como se indica en la figura 56.

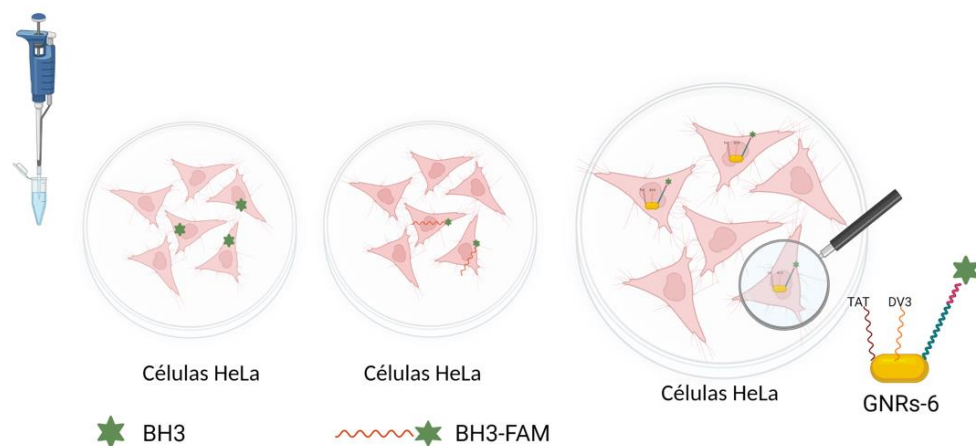


Figura 56: evaluación de los efectos de BH3-FAM (proveniente de la irradiación de GNRs-6), BH3, y GNRs-6 sobre células HeLa.

Para el control de viabilidad las células se incubaron con DMEM/SFB 10% y

como contro muerte celular, SDS 10%. La exposición a los tratamientos fue de 24 h y se procedió a realizar el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQ_{ueous}, determinando la absorción de formazán a 490 nm, en un lector de placas Biotek, modelo Synergy H2. Los datos fueron obtenidos al menos en triplicado, con un n = 12.

Capítulo 5: Resultados y discusión: síntesis de péptidos y liberación de BH3 mediante irradiación

5.1. Síntesis e identificación de los péptidos TAT, DV3 y BH3-Boc protegido

5.1.1 Síntesis de los péptidos TAT, DV3 y BH3

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo en fase sólida siguiendo la estrategia Fmoc/tBu, usando la resina cloruro de 2-clorotritilo con un grado de funcionalización de 1 mmol/g. Se optó por esta resina debido a que permite la obtención de péptidos con el extremo carboxílico libre, además de que el átomo de cloro lateral inhibe la formación de dicetopiperazina que se puede generar al desproteger el segundo aminoácido. El esquema de la figura 57 muestra la reacción general del primer aminoácido con la resina.

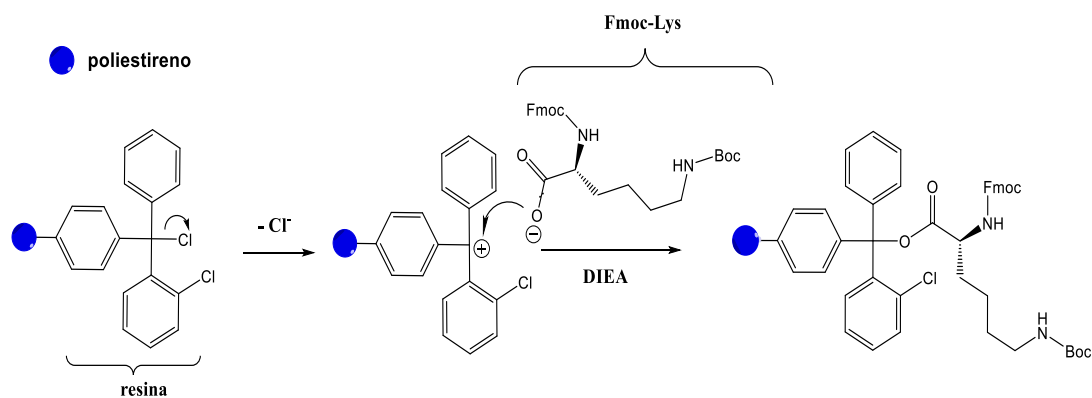


Figura 57: Mecanismo de reacción entre un aminoácido y la resina cloruro de 2-clorotritilo.

El grupo protector Fmoc/tBu, se eliminó eficientemente tratándolo con una solución al 20% de piperidina en DMF. Para la eliminación de todos estos

grupos protectores y escisión de los péptidos de la resina se utilizó TFA al 95%, en cambio el tratamiento con TFA al 1% en DCM fue suficiente para separar el péptido de la resina manteniendo los grupos protectores de las cadenas laterales.

El test cualitativo de ninhidrina (o Kaiser) permitió verificar la presencia del grupo alfa amino libre, lo cual permite acoplar el siguiente aminoácido. Así, una coloración amarilla indica la ausencia de aminos primarias libres, siendo indicativo de que éstos se encuentran protegidos con el grupo Fmoc. Por el contrario, una coloración azul-verdosa (test positivo) indica la presencia de aminos primarias. Es posible, sin embargo, que algunos aminoácidos, como la serina, el ácido aspártico o la asparagina no den la coloración azul oscuro que se espera cuando existen grupos amino libres. Es importante señalar que, si bien el test está planteado originalmente con un tiempo de calentamiento de tres minutos, al realizarlo para la detección de aminos libres se revisaron los tubos de muestra al calentar, y se observó que algunas muestras requerían tiempos menores (60 – 90 segundos) para obtener la coloración azul esperada. En la figura 58 se detalla el mecanismo de reacción entre un aminoácido y la ninhidrina.

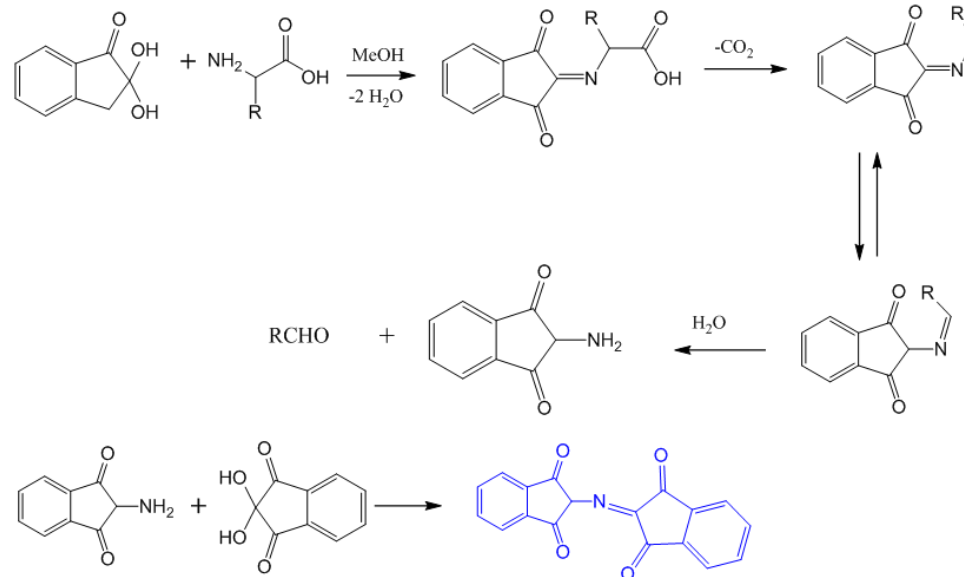


Figura 58: Mecanismo de reacción del test de ninhidrina con un aminoácido. La coloración azul denota la presencia de una amina primaria libre.

Por otra parte, con el test de cloranilo se identificaron aminas secundarias, como la prolina (figura 59). El reactivo reacciona con la peptidil-resina dando una coloración verdosa en presencia de aminas secundarias desprotegidas.

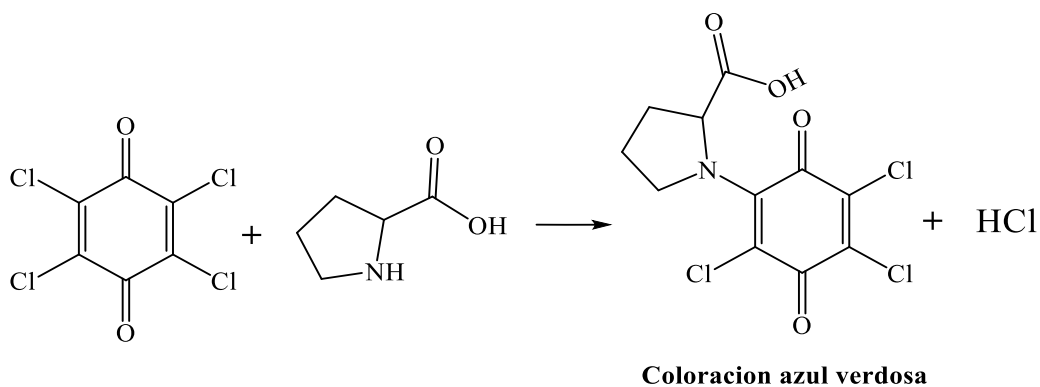


Figura 59: Esquema de reacción entre cloranilo y prolina. La coloración azul-verdosa indica la presencia de una amina secundaria desprotegida.

El grupo protector Fmoc de los N-terminales fueron eliminado eficientemente con tratamiento de una solución al 20% de piperidina en DMF. El mecanismo propuesto se detalla en la figura 60.

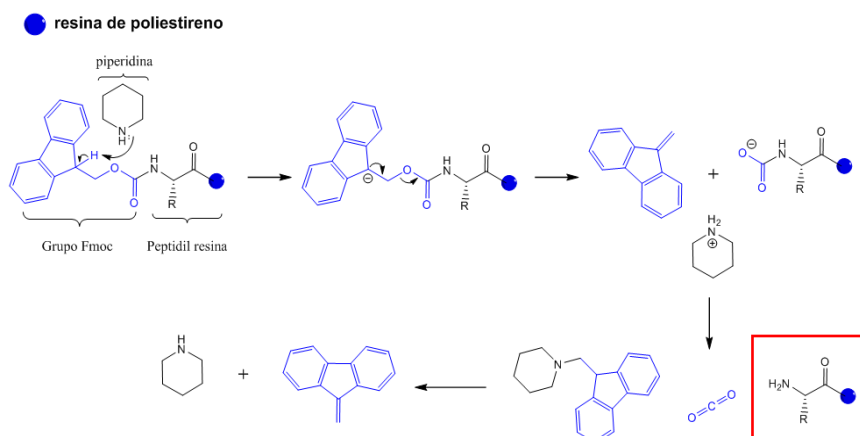


Figura 60: Mecanismo de la reacción que conduce a la eliminación del grupo Fmoc con piperidina.

Al completar la síntesis de las secuencias peptídicas se procedió a escindir los péptidos con la mezcla ácida al 95% de TFA en el caso de los péptidos TAT y DV3, mientras que el péptido BH3 se trató con una disolución al 1% de TFA en diclorometano debido a que se debe utilizar en reacciones posteriores. Posteriormente, los compuestos obtenidos fueron disueltos en una mezcla de agua-acetonitrilo para ser liofilizados e identificados mediante HPLC-MS. El péptido TAT, sólido de masa molar de 1662 g/mol y cuya secuencia se aprecia en la figura 61.a) fue obtenido con un rendimiento del 56%. Este fue identificado por cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplado a un detector de MS. En la figura 61.b) se muestra el cromatograma, que da cuenta de una

pureza del 97 %, con un tiempo de retención de 15,097 minutos y en la figura 61.c) las masas correspondientes a los iones cuasimoleculares $[M+2H/2]^+$ de 832 y $[M+3H/3]^+$ de 555.

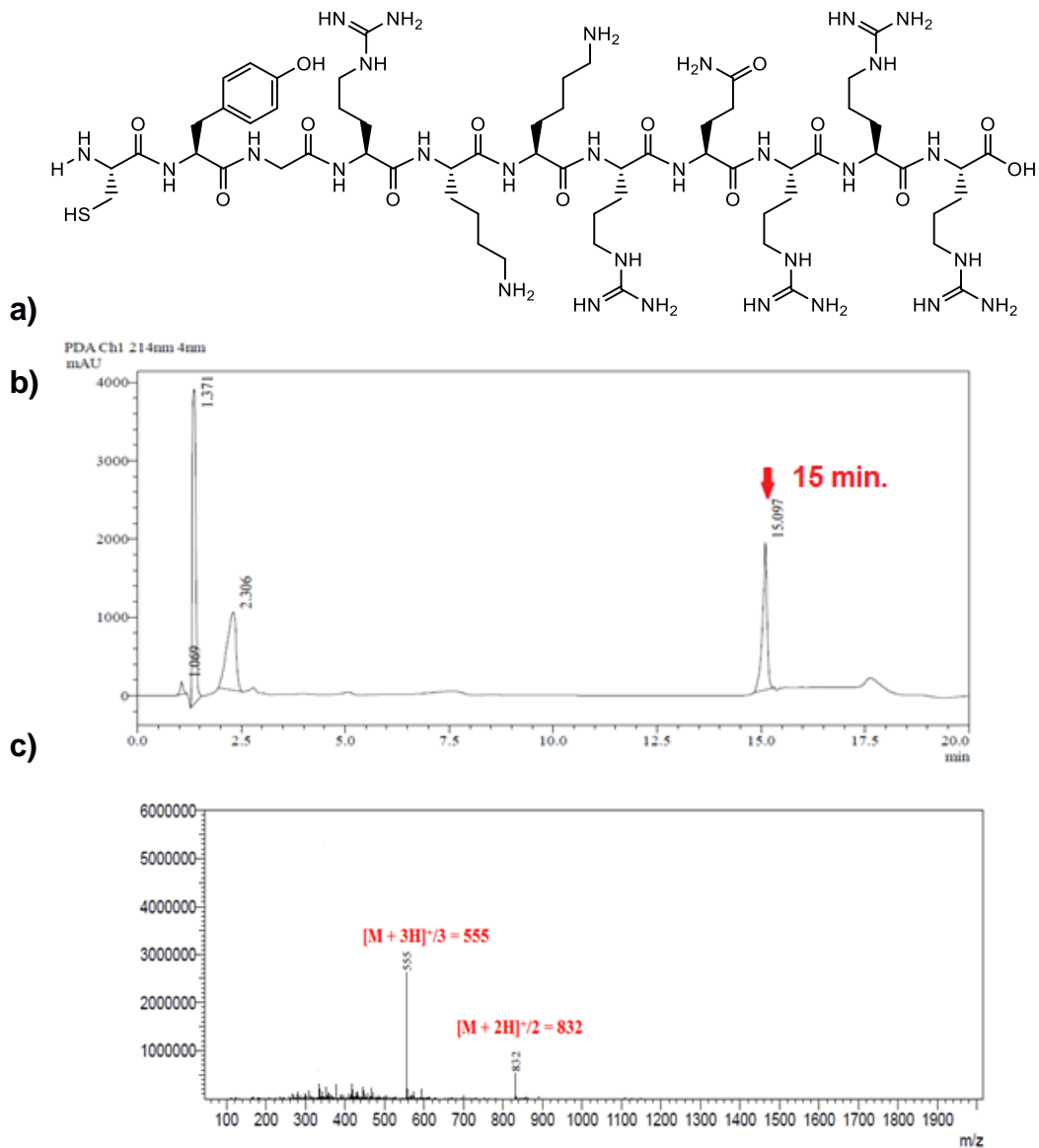


Figura 61: a) Estructura de la secuencia peptídica de TAT (Masa molar: 1662 g/mol). b) Rt del péptido TAT a 15 min. c) Espectro de masas de TAT, con los iones cuasimoleculares $[M+2H/2]^+$ y $[M+3H/3]^+$.

Para el péptido DV3, de masa molar de 1268 g/mol y cuya estructura se muestra en la figura 62.a), se obtuvo con un rendimiento de síntesis de un 60 %. En el cromatograma se puede apreciar el péptido, con una pureza del 98 %, asociado con un tiempo de retención de 15.334 minutos. Por otra parte, en el espectro de masas se observan los iones cuasimoleculares $[M+H]^+$ de 1269 y el fragmento $[M+2H/2]^+$ de 636.

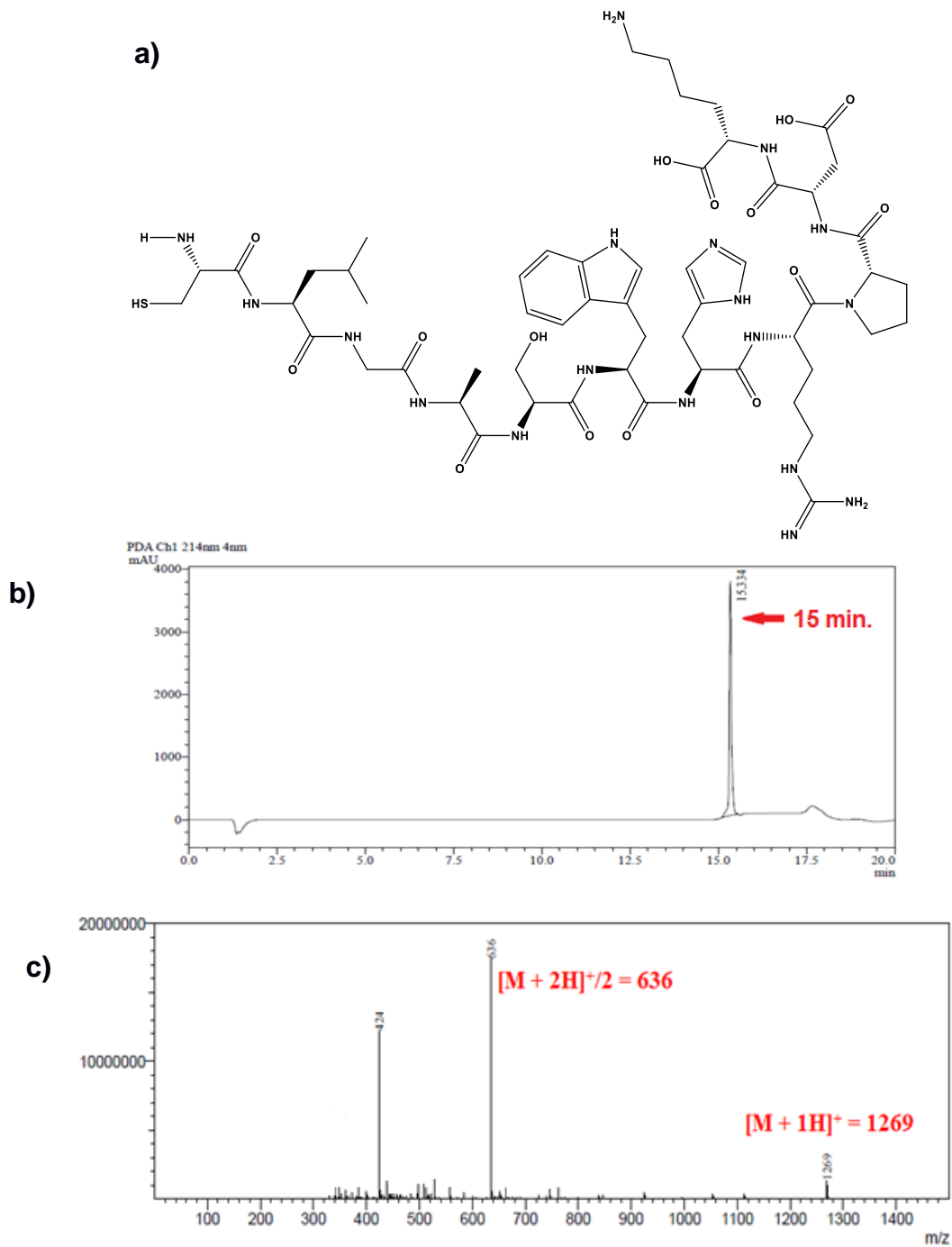
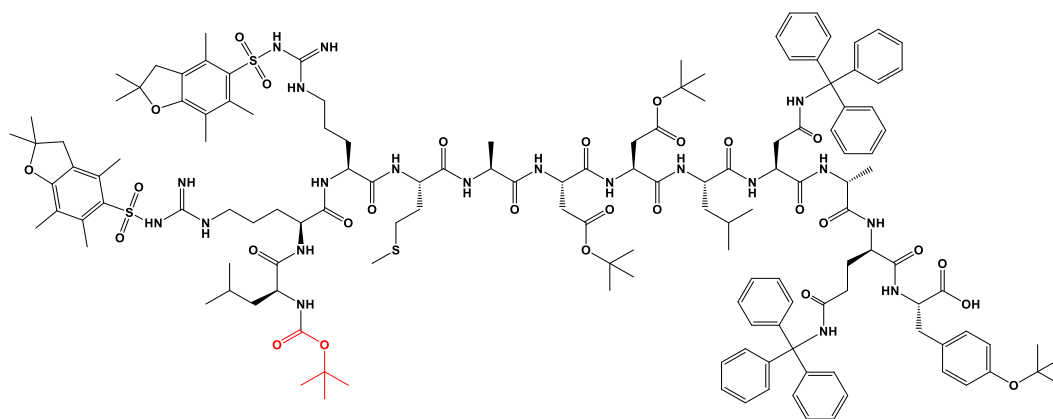


Figura 62: a) Estructura de la secuencia peptídica de DV3 (Masa molar: 1268 g/mol). b) Rt del péptido DV3 a 15 min. c) Espectrometría de masas correspondiente al ion molecular $[M+H]^+$ de 1269 y el fragmento $[M+2H/2]^+$ de 636.

Finalmente, el péptido protegido BH3-Boc se obtuvo con un rendimiento de un 57%, y debido a que posee una alta masa molar por la presencia de los grupos protectores fue identificado mediante espectrometría MALDI-TOF. En el espectro correspondiente (Figura 63) se puede observar la masa molar esperada para este compuesto, la cual fue de 2721 g/mol.

a)



b)

Figura 2. Muestra BH3 PROTEGIDO, espectro de masas MALDI-MS.

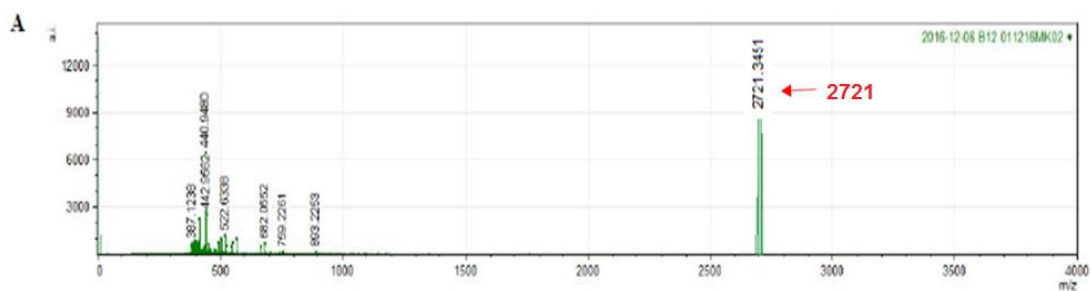


Figura 63: a) Estructura de la secuencia peptídica del BH3-Boc protegida con una masa molecular de 2721 g/mol. b) MALDI-MS correspondiente a la masa del péptido.

5.2. Formación de BH3-aducto Diels-Alder.

Las rutas sintéticas expuestas en las secciones 4.4.1. y 4.4.2. fueron descartadas debido a que los análisis realizados mostraron la ausencia de los productos esperados (HPLC no incluidos).

5.2.1. Síntesis e identificación de BH3-furfurilamida (BH3-FAM).

El péptido BH3-Boc protegido se hizo reaccionar con furfurilamina para formar el producto BH3-FAM. Al igual que en la reacción de formación del dienófilo, ésta se inicia con la activación del grupo carboxilo mediante HBTU. Al finalizar la reacción se obtuvo el compuesto precipitando la mezcla en agua. Posteriormente, se procedió a eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales presentes en el péptido modificado con una mezcla ácida al 95% de TFA/TIS/H₂O. El producto fue precipitado en éter frío, centrifugado y el sólido fue solubilizado en una solución de acetonitrilo al 10% en agua y luego liofilizado. El producto final, BH3-FAM, obtenido con un rendimiento del 55% se muestra en la figura 64 y fue identificado por cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplado a un detector de MS. El compuesto BH3-FAM de peso molecular 1544 g/mol, muestra un tiempo de retención $R_t = 10.330$ minutos (figura 64.b) y a partir del cual se obtiene que posee un grado de pureza del 97 %. Por otra parte, en el espectro de masas se observan valores de masa 516 y 773, los cuales corresponden a los iones cuasimoleculares

$[M+2H/2]^+$ y $[M+3H/3]^+$.

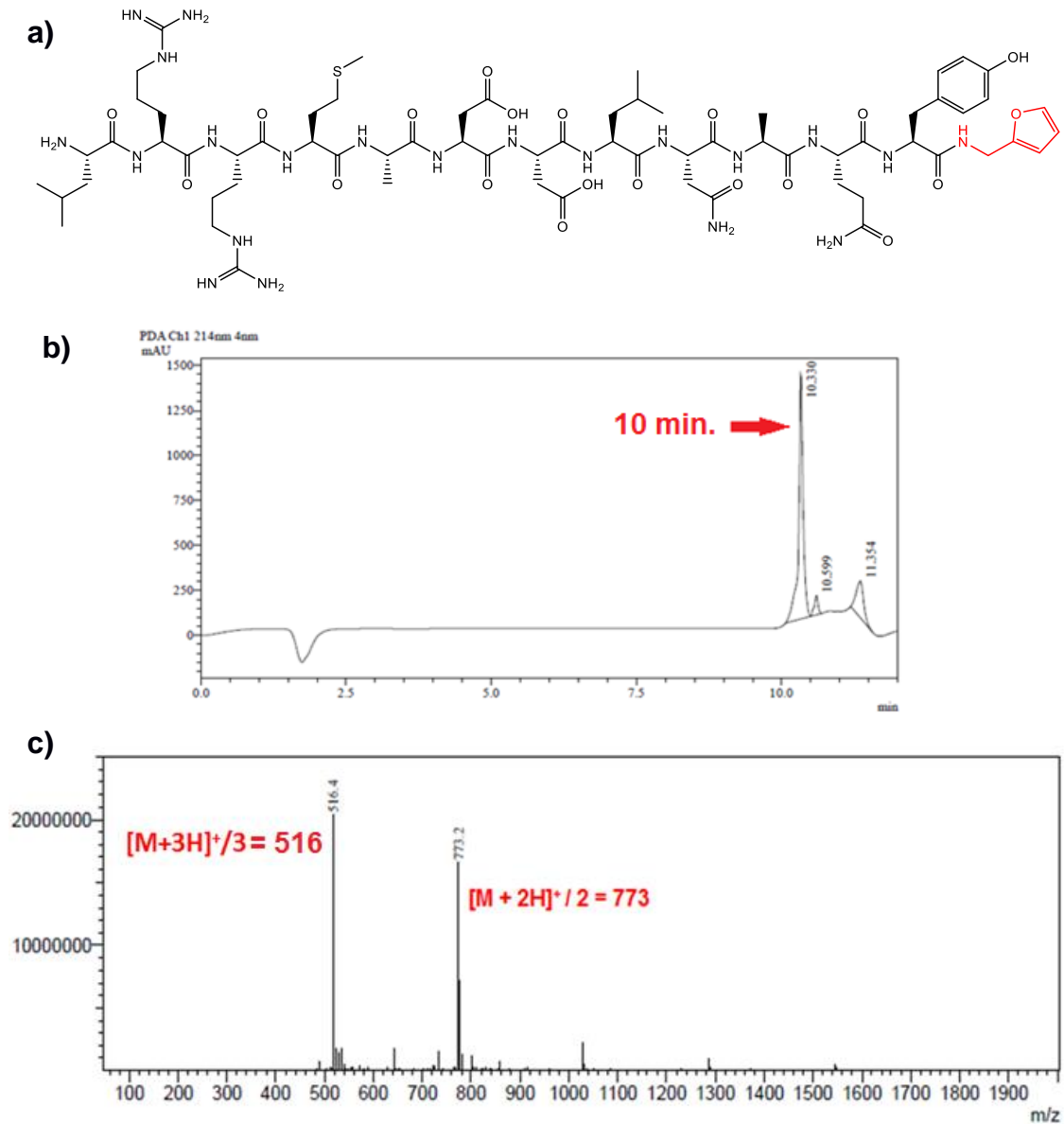


Figura 64: a) Estructura de la secuencia peptídica del BH3-FAM con una masa molecular de 1544 g/mol. b) Rt del péptido BH3-FAM a 10 minutos. c) Fragmentos correspondientes al $[M+2H/2]^+$ de 773 y $[M+3H/3]^+$ de 516.

5.2.2. Síntesis de aductos Diels-Alder de BH3-FAM (compuestos 6 y 7)

Para la formación de los aductos de Diels-Alder (compuestos **6** y **7**) se hicieron reaccionar directamente 2 equivalentes del dieno (BH3-FAM) con cada uno de los dienófilos derivados de los ácidos maleimido-hexanoico y maleimidoundecanoico (compuestos **2** y **3** respectivamente) en DMF. (Figura 65).

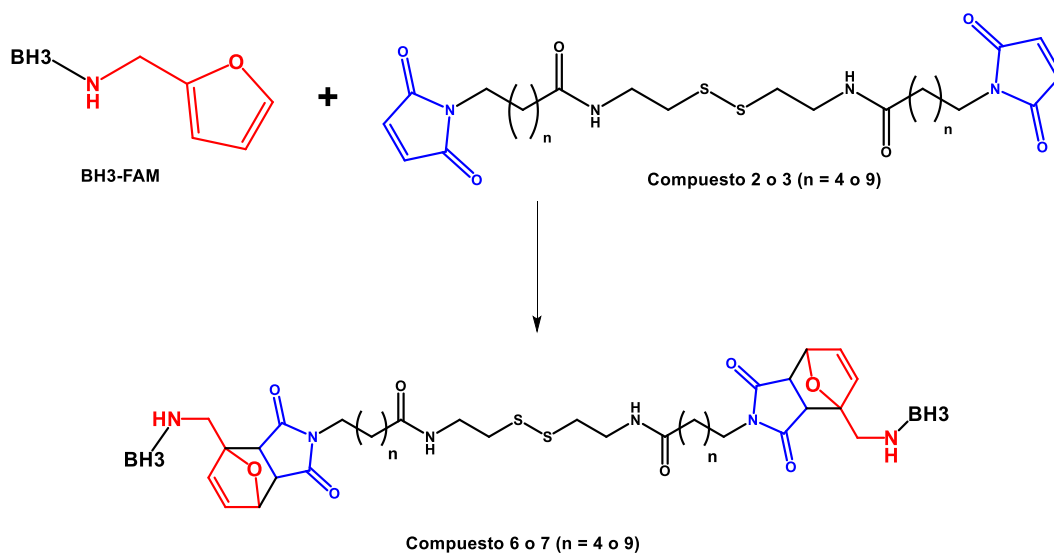


Figura 65: Esquema de síntesis de los aductos de Diels-Alder (compuestos **6** y **7**) entre BH3-FAM y los dienófilos de distinta longitud (compuestos **2** y **3**).

El compuesto **6**, derivado del espaciador más corto (Compuesto **2**) se obtuvo con un rendimiento de un 30 % y fue identificado por cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplado a un detector de masas. En la figura 66 se muestra el cromatograma con un tiempo de retención de 10,303 minutos, correspondiente al producto sintetizado, mientras que en el espectro de masas

muestra la presencia del ion cuasimolecular $[M+4H+4]^+$ correspondiente a la masa 907 g/mol.

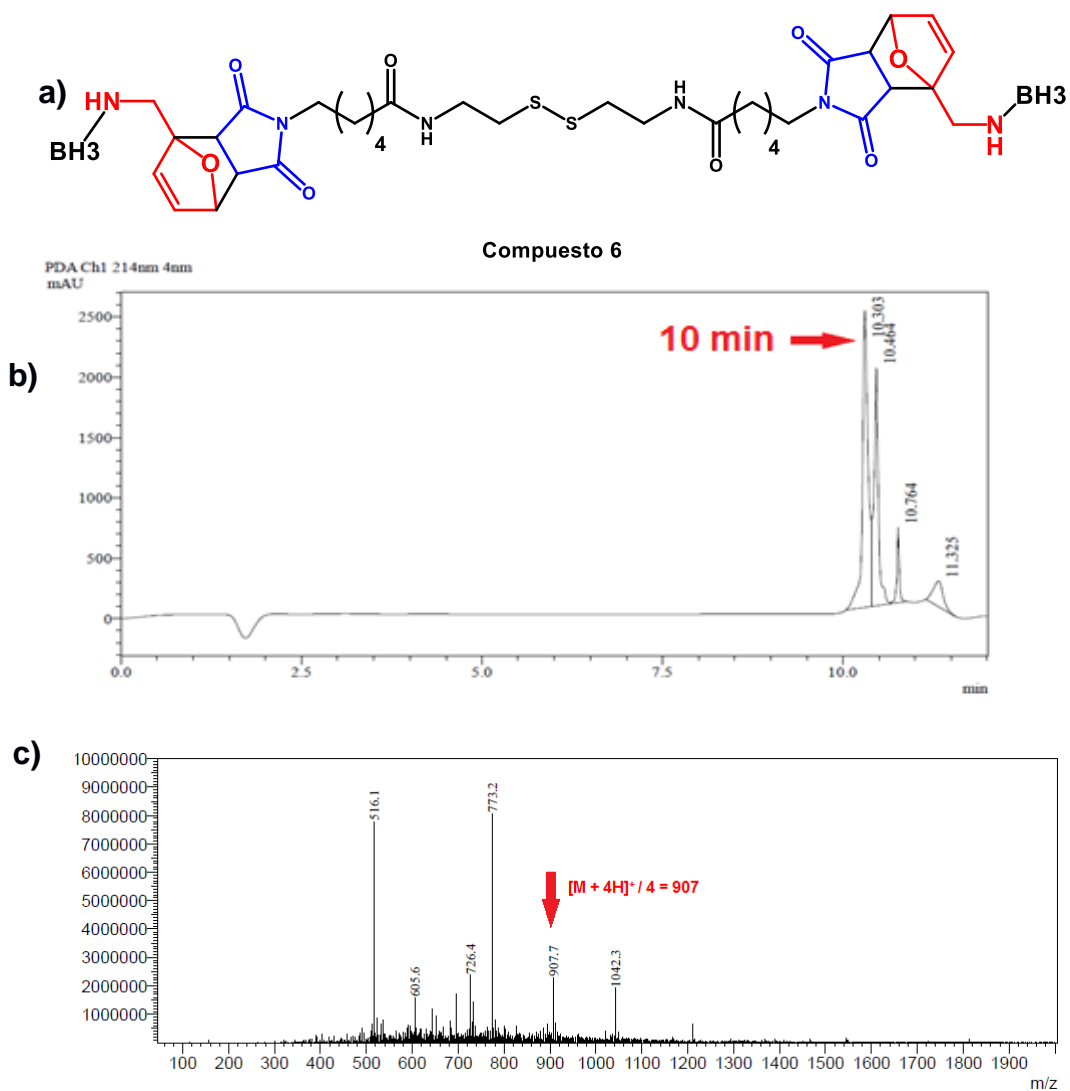


Figura 66: a) Estructura del compuesto 6. b) Rt del compuesto, ubicado alrededor de los 10 min. c) Espectro de masas, donde se observa el ion correspondiente a $[M + 4H+4]^+$ de 907 g/mol.

Es importante señalar que en el espectro de masa de la figura 66 se puede observar el fragmento $[M + 2H/2]^+$ de masa de 1042 g/mol, el cual corresponde al producto de reacción cuando sólo se une un equivalente de péptido al dienófilo, cuya estructura se muestra en la figura 67.

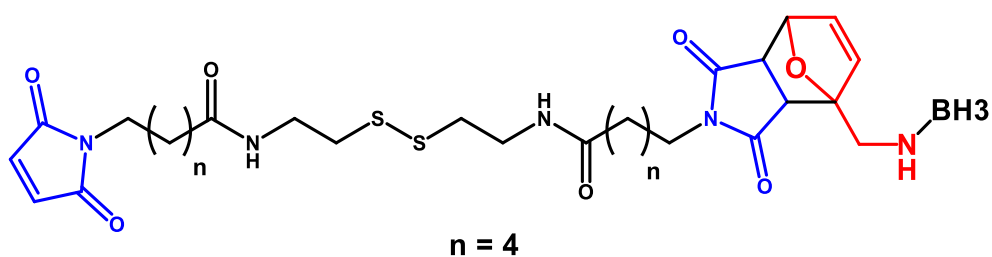


Figura 67: Estructura del compuesto formado por la unión de un equivalente del péptido BH3-FAM al compuesto 2.

En el caso de la reacción con el compuesto 3 no se observó la formación del producto. Esto podría ser atribuido al carácter apolar del espaciador, lo que produciría que no adopte una conformación adecuada para llevar a cabo la reacción de Diels-Alder.

5.3. Funcionalización de los GNRs-CTAB con los péptidos TAT, DV3 y el aducto de BH3 (Compuesto 6) para obtener GNRs-6

Los péptidos TAT, DV3 y el aducto de Diels-Alder derivado del péptido BH3 (Compuesto 6) fueron funcionalizados a la superficie de los GNRs-CTAB para

formar el constructo que se muestra en la figura 68. Esto se realizó adicionando una disolución equimolar de los tres péptidos a la solución coloidal de nanobarras de oro. Luego la solución fue centrifugada para eliminar el sobrenadante, que corresponde tanto a péptidos que no se funcionalizaron sobre la superficie de los GNRs como al CTAB que pueda haber sido desplazado y el *pellet* obtenido fue resuspendido en agua Milli-Q.

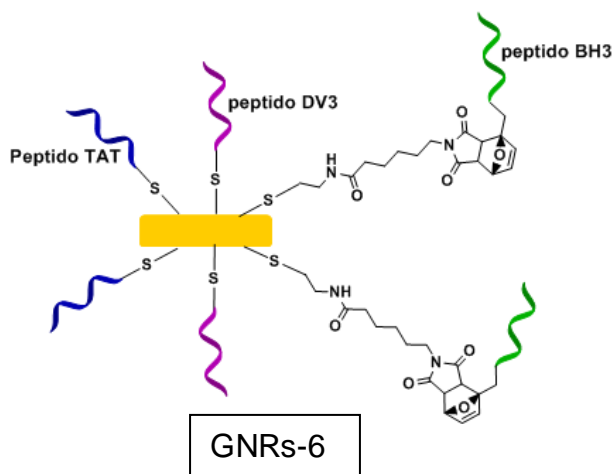


Figura 68: Esquema de unión de los péptidos TAT, DV3 y el compuesto 6 funcionalizados sobre la superficie del GNR.

Los GNRs funcionalizados fueron caracterizados mediante espectroscopia UV-Visible y potencial Z.

En la figura 69 se comparan los espectros UV-Vis de los GNRs antes y después de la funcionalización con los péptidos. En este gráfico se puede apreciar un desplazamiento batocrómico tanto en la región transversal como en la longitudinal respecto al espectro de los GNRs sin funcionalizar. Estos desplazamientos fueron desde los 520 a los 530 nm y desde 703 a 737 nm

respectivamente, lo cual indica que el plasmón de superficie se ha desplazado por efecto de la funcionalización de los péptidos sobre la superficie de los GNRs.

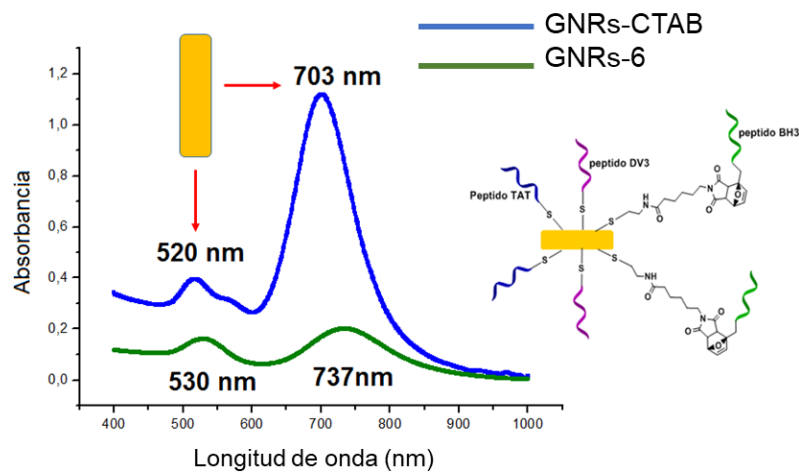


Figura 69: Espectros UV-Vis de GNRs antes y después de funcionalizar. GNRs-6 están funcionalizados con TAT, DV3 y BH3-FAM

Por otra parte, con respecto al valor del potencial Z de +43 mV que se observa en la figura 70, si bien es positivo muestra una disminución respecto a los valores usualmente observados para GNRs recubiertos con CTAB, que tienden a superar los +50 mV. Esta disminución se puede explicar por el reemplazo de moléculas de CTAB por los péptidos. Es importante señalar que el punto isoeléctrico teórico de los péptidos TAT, DV3 y BH3(amida en C-terminal) es de 11,87, 8,14 y 8,90 respectivamente, por lo que a pH = 7 se encuentran

predominantemente en una forma catiónica, lo cual es concordante con el valor obtenido para la carga superficial.

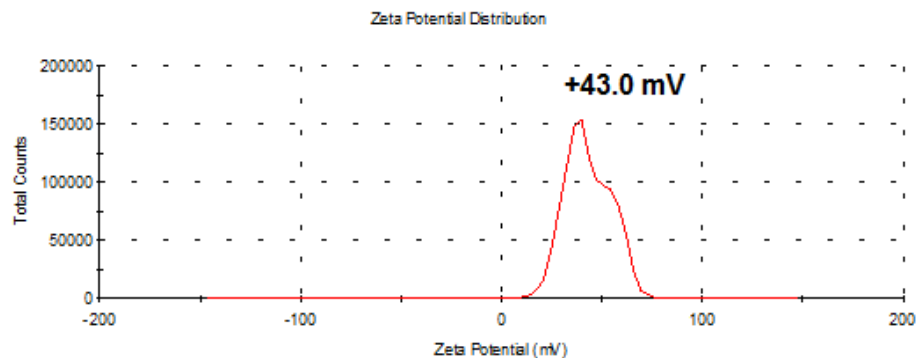


Figura 70: Distribución de carga superficial de GNRs funcionalizados.

5.4. Determinación de la liberación fototérmica de BH3-FAM desde GNRs-6 funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y aducto de BH3.

La disolución de GNRs funcionalizados con los péptidos TAT, DV3 y el aducto de BH3 (GNRs-6) resuspendidas en agua Milli-Q fueron irradiadas con un láser continuo de 808 nm y 350 mW de potencia durante 24 horas para provocar la liberación del péptido modificado BH3-FAM por acción del efecto fototermal producido por las características plasmónicas de las nanopartículas de oro (figura 71).

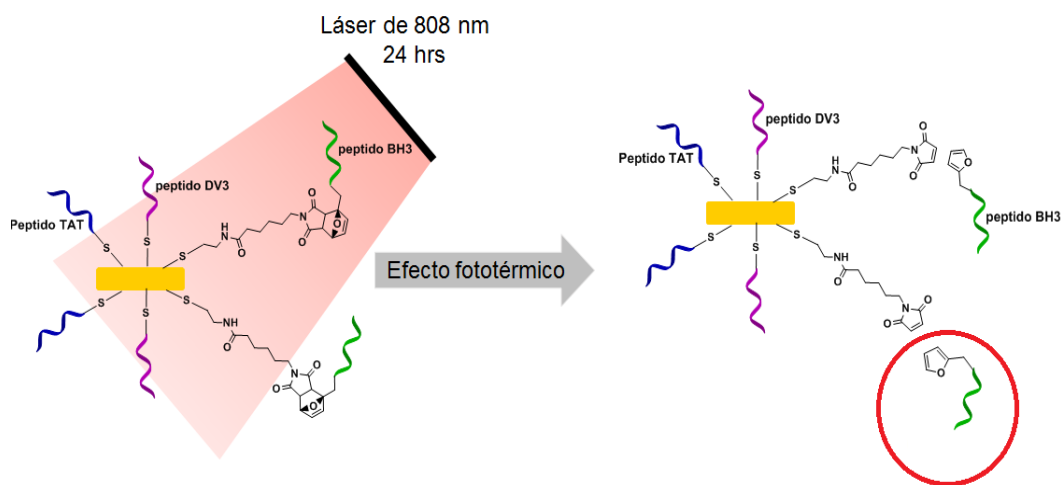


Figura 71: Esquema de la irradiación de GNRs-6. En el costado derecho se muestra en rojo el producto liberado mediante la reacción de retro-Diels-Alder.

Una vez concluida la irradiación se procedió a centrifugar inmediatamente la muestra a 1430xg durante 60 minutos. El sobrenadante obtenido fue liofilizado y analizado mediante MALDI, mientras que el *pellet* obtenido fue resuspendido en agua y caracterizado mediante espectroscopía UV-Visible, potencial Z y microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM).

En el espectro de masas (Figura 72) se puede observar la presencia de una señal m/z de 1544 g/mol, la cual concuerda con la masa esperada del producto de la reacción retro-Diels-Alder (BH3-FAM). Es relevante mencionar que no se observa la presencia de señales asociadas a las otras especies funcionalizadas sobre la nanopartícula (TAT, DV3 o compuesto 2), lo cual indica que el proceso

de irradiación permitió, mediante la reacción de retro-Diels-Alder producida por fototerapia, la liberación exclusiva de la especie de interés desde la superficie de los GNRs.

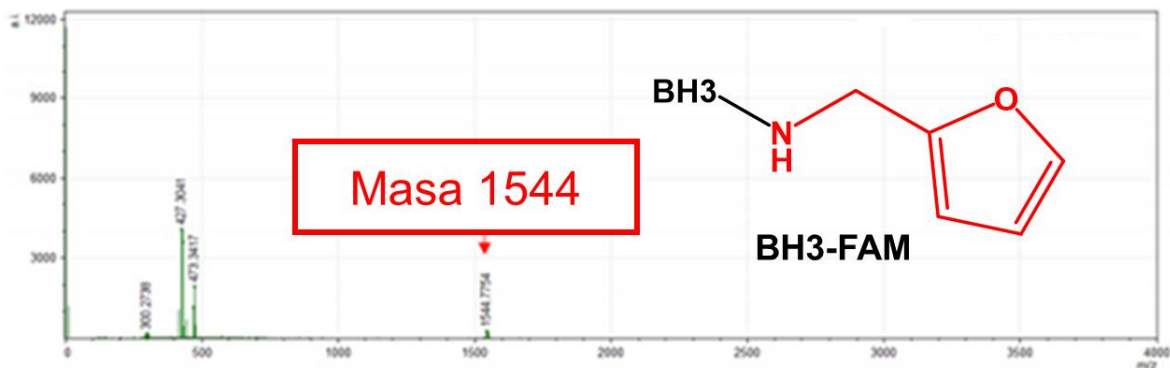


Figura 72: Espectrometría de masas MALDI del sobrenadante obtenido después de la irradiación. Se observa el valor de 1544, asociado al compuesto BH3-FAM.

En la figura 73 se muestra una comparación entre los espectros UV-Visible de GNRs-6 funcionalizados antes y después del proceso de irradiación. Se puede observar un desplazamiento hipsocrómico tanto en la banda transversal como en la longitudinal. Estos varían desde los 530 a los 524 nm y desde 737 a 729 nm. Este fenómeno podría explicarse por la modificación superficial que se produce con la liberación del péptido BH3-FAM desde los GNRs funcionalizados.

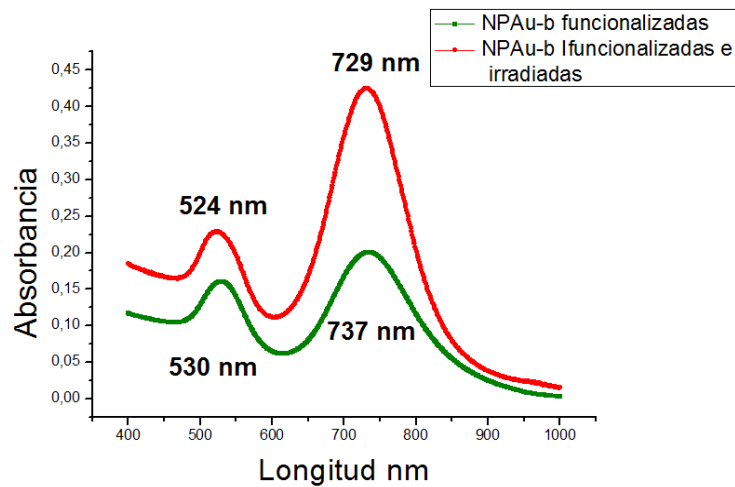


Figura 73: Espectros UV-Visible de GNRs-6 con péptidos antes y después de irradiar. Se observa un desplazamiento hipsocrómico en los GNR irradiados.

El gráfico de potencial Z (figura 74) muestra un valor de +41 mV para la muestra de GNRs resuspendidas. Esto indica una disminución respecto al valor obtenido previamente (+43 mV) lo cual puede ser atribuido al proceso de liberación del péptido BH3-FAM desde la superficie. Esta molécula posee un punto isoeléctrico teórico de 8,90, por lo cual a pH neutro se encuentra en su forma catiónica.

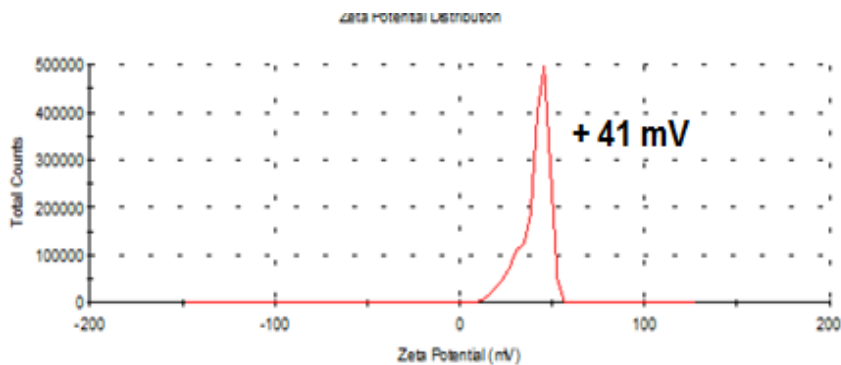


Figura 74: Potencial Z de GNRs-6 resuspendidos posterior a la irradiación con láser.

A esta muestra de GNRs también se le realizó una caracterización por STEM para observar si sufrieron algún cambio morfológico debido al proceso de irradiación.

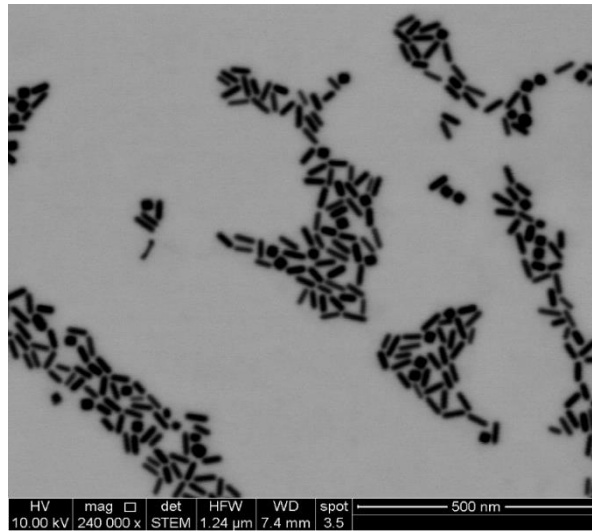


Figura 75: Micrografía de STEM de GNRs irradiados.

En la figura 75 se muestra una micrografía obtenida, en la cual se aprecia que no hay cambios en la morfología de los GNRs, que podrían ser visualizados como partículas fundidas. Esto es concordante con lo observado en el espectro UV-Visible, que mostró las bandas características de las nanobarras de oro.

Por otra parte, a una alícuota de GNRs-6 irradiada con el láser de 808 nm y 350 mW por 24 h se la centrifugó a 1430xg durante 60 minutos, determinándose en el sobrenadante la concentración de BH3-FAM obteniéndose que la misma es de 2.5 μM. De esta manera (considerando que

la concentración de nanopartículas es de 1 nM) se puede hacer una estimación de que el grado de funcionalización es de alrededor de 2500 moléculas por nanopartícula. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados para la funcionalización de GNRs con carboxifluoresceína.^[53]

5.5. Evaluación del efecto del péptido BH3 liberado por la irradiación de las nanopartículas multifuncionalizadas sobre la citotoxicidad de células HeLa

Se realizaron ensayos de viabilidad celular en la línea celular HeLa, incubando las células por 24 horas con 1 nM del nanosistema GNRs-6, 2.5 μ M BH3 y con el sobrenadante de GNRs-6 irradiado, con el objetivo de evaluar si posterior a la irradiación de las GNRs-6 el péptido BH3-FAM liberado producía efectos sobre la viabilidad celular. Para ello se incubaron las células con una alícuota del sobrenadante (obtenido después de la irradiación en una concentración de 2.5 μ M) observándose que se produjo una disminución de la viabilidad a un 20% respecto del control (Figura 76). Con el fin de determinar si BH3 a la misma concentración que BH3-FAM produce efectos sobre la viabilidad celular se evaluó el efecto a 2.5 μ M del primero, observándose una disminución a un 15%. Este último resultado se puede correlacionar con las concentraciones encontradas para diferentes análogos de BH3.^[65] Para el caso de las GNRs-6 no se observaron efectos sobre las células lo que es importante respecto de

futuras aplicaciones ya que para que se produzca el efecto es necesario producir la irradiación del antitumoral.

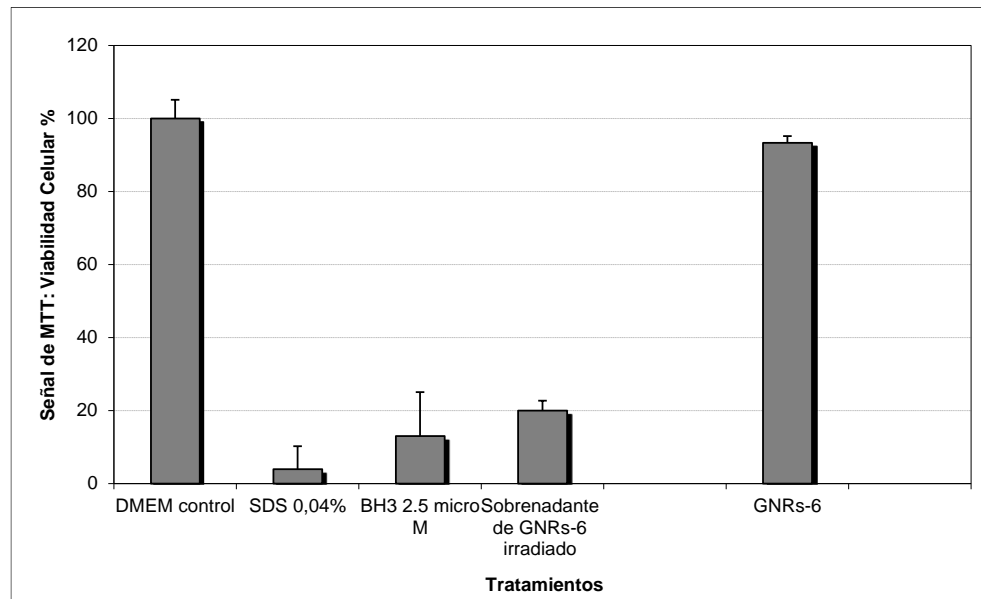


Figura 76: Ensayo de viabilidad de MTT. Se evaluaron los efectos de GNRs-6 1nM, BH3 2.5 μ M, sobrenadante de GNTs-6 irradiados con un láser de 808 nm y 350 mW por 24 h. Los datos fueron obtenidos al menos en triplicado, con un n = 12.

Capítulo 6: Conclusiones y proyecciones

6.1. Conclusiones

- Se obtuvieron y caracterizaron GNRs-CTAB, los cuales presentaron los plasmones situados en la región NIR, siendo adecuados para aplicaciones en fototerapia.
- Se sintetizaron exitosamente los péptidos DV3, TAT y BH3, modificando este último para permitir su unión a espaciadores de distinta longitud a través de un aducto de Diels-Alder.
- Se sintetizaron GNRs funcionalizadas con péptidos (GNRs-6), este último siendo unido al espaciador más corto.
- Se generó un modelo de liberación en el cual se demostró que GNRs-4 y GNRs-5 permiten la liberación de carboxifluoresceína mediante irradiación. El espaciador más largo se ubica más próximo a la nanobarra, lo que facilita la liberación del fluoróforo. No obstante, ambos espaciadores llegan a iguales concentraciones de compuesto liberado.
- El proceso de irradiación con láser permitió la liberación exclusiva de BH3 desde los GNRs y no de los péptidos DV3 y TAT por efecto fototérmico.
- Los GNRs-6 no presentaron efectos sobre la viabilidad celular y en cambio luego de ser irradiados se observó el efecto de BH3-FAM liberado. Esto último es relevante de cara a futuras aplicaciones ya que

el efecto antitumoral se produce solo en presencia de irradiación

Por lo tanto, se comprueba la hipótesis propuesta determinándose que La irradiación de GNRs multifuncionalizados con los péptidos BH3 (antitumoral), TAT y DV3 permite producir la liberación específica del péptido antitumoral.

6.2. Proyecciones

A futuro se espera encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción de Diels-Alder entre BH3 y el espaciador más largo, de manera de poder corroborar si se sigue el mismo perfil de liberación que con el derivado de carboxifluoresceína.

Asimismo, se probará el efecto de la irradiación a nivel intracelular, para así poder establecer si el efecto antitumoral es producto del efecto fototérmico y/o a la liberación de BH3. Posteriormente se proyecta realizar estudios en modelos animales para así evaluar este sistema como una posible terapia.

Referencias

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249.
- [2] M. Reagan, *Cancer Prev. Early Detect. Treat. Recover.* **2019**, 53–74.
- [3] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 1–19.
- [4] V. Schirrmacher, *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 407–419.
- [5] F. Araste, K. Abnous, M. Hashemi, S. M. Taghdisi, *J. Control. Release* **2018**, *292*, 141–162.
- [6] S. Marqus, E. Pirogova, T. J. Piva, *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24*, 1–15.
- [7] M. Boholm, R. Arvidsson, *Nanoethics* **2016**, *10*, 25–40.
- [8] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, M. Dusinska, *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 233–278.
- [9] J. Liu, Q. Chen, L. Feng, Z. Liu, *Nano Today* **2018**, *21*, 55–73.
- [10] R. Peer, Dan; Karp, Jeffrey M. ; Seungpyo, Hong; Farokhzad, Omid C.; Margalit, Rimona; Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.
- [11] J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 147–162.
- [12] G. Ajnai, A. Chiu, T. Kan, C. C. Cheng, T. H. Tsai, J. Chang, *J. Exp. Clin. Med.* **2014**, *6*, 172–178.
- [13] S. B. Yaqoob, R. Adnan, R. Muhammad, R. Khan, *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1–15.
- [14] J. L. Montaña-Priede, U. Pal, *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 11833–11839.
- [15] A. R. Guerrero, N. Hassan, C. A. Escobar, F. Albericio, M. J. Kogan, E. Araya, *Nanomedicine (Lond).* **2014**, *9*, 2023–39.
- [16] S. Eustis, M. a el-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209–217.
- [17] K. G. Shevchenko, V. R. Cherkasov, A. A. Tregubov, P. I. Nikitin, M. P. Nikitin, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *88*, 3–8.
- [18] Y. A. Attia, D. Buceta, F. G. Requejo, L. J. Giovanetti, M. A. López-Quintela, *Nanoscale* **2015**, *7*, 11273–11279.
- [19] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 668–677.
- [20] I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1724–1737.
- [21] A. Mezni, T. Dammak, A. Fkiri, A. Mlayah, Y. Abid, L. S. Smiri, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 17956–17967.
- [22] N. C. Santos, M. M. Domingues, M. R. Felício, S. Gonçalves, P. M. Carvalho, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–17.
- [23] H. Liu, N. Pierre-Pierre, Q. Huo, *Gold Bull.* **2012**, *45*, 187–195.
- [24] S. Sasidharan, D. Bahadur, R. Srivastava, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 84025–84034.
- [25] J. a Webb, R. Bardhan, *Nanoscale* **2014**, 2502–2530.
- [26] M. R. K. Ali, Y. Wu, M. A. El-sayed, *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 15375–15393.
- [27] M. Almada, B. H. Leal-martínez, N. Hassan, M. J. Kogan, M. G. Burboa, A. Topete, M. A. Valdez, J. Juárez, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 583–593.

- [28] S. Maity, W. Wu, C. Xu, J. Tracy, K. Gundogdu, J. Bochinski, L. Clarke, *Nanoscale* **2015**, *6*, 15236–15247.
- [29] A. R. Lowery, A. M. Gobin, E. S. Day, N. J. Halas, J. L. West, *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1*, 149–154.
- [30] M. Pérez-Hernández, P. Del Pino, S. G. Mitchell, M. Moros, G. Stepien, B. Pelaz, W. J. Parak, E. M. Gálvez, J. Pardo, J. M. De La Fuente, *ACS Nano* **2015**, *9*, 52–61.
- [31] R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- [32] C. J. Murphy, A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith, S. C. Baxter, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1721–1730.
- [33] A. M. Alkilany, L. B. Thompson, S. P. Boulos, P. N. Sisco, C. J. Murphy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 190–199.
- [34] H. T. Phan, A. J. Haes, *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 16495–16507.
- [35] M. I. Limited, *Zetasizer Nano Serles Tech. Note. MRK654-01* **2011**, *2*, 1–6.
- [36] R. P. Dias, T. A. Soares, M. R. Meneghetti, *J. Braz. Chem. Soc.* **2018**, *29*, 191–199.
- [37] X. Han, J. Huang, H. Lin, Z. Wang, P. Li, Y. Chen, **2018**, *1701394*, 1–13.
- [38] A. B. S. Bakhtiari, D. Hsiao, G. Jin, B. D. Gates, N. R. Branda, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 4166–4169.
- [39] B. Brain, R. Prades, B. Oller-salvia, S. M. Schwarzmaier, J. Selva, M. Moros, M. Balbi, V. Grazffl, J. M. D. La Fuente, G. Egea, N. Plesnila, M. Teixidó, E. Giralt, **2014**, 1–7.
- [40] L. Sinatra, L. Kolano, M. Icker, S. R. Fritzsche, D. Volke, **2021**, 1–10.
- [41] Y. Liu, Y. Li, H. Wang, J. Yu, H. Lin, D. Xu, Y. Wang, A. Liang, X. Liang, X. Zhang, M. Fu, H. Qian, C. Lin, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1509–16.
- [42] E. Lomonosova, G. Chinnadurai, *Oncogene* **2008**, *27 Suppl 1*, S2-19.
- [43] S. C. Penchala, M. R. Miller, A. Pal, J. Dong, N. R. Madadi, J. Xie, H. Joo, J. Tsai, P. Batoon, V. Samoshin, A. Franz, T. Cox, J. Miles, W. K. Chan, M. S. Park, M. M. Alhamadsheh, *Nat Chem Biol* **2015**, *11*, 793–798.
- [44] J. Hou, Q. Zhang, X. Li, Y. Tang, M. R. Cao, F. Bai, Q. Shi, C. H. Yang, D. L. Kong, G. Bai, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2011**, *99 A*, 684–689.
- [45] J. Qiao, X. Mu, L. Qi, J. Deng, L. Mao, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8030–8032.
- [46] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vivès, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 559–577.
- [47] E. L. Snyder, C. C. Saenz, C. Denicourt, B. R. Meade, X. S. Cui, I. M. Kaplan, S. F. Dowdy, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10646–10650.
- [48] H. Yuan, A. M. Fales, T. Vo-Dinh, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11358–11361.
- [49] E. Kianfar, *J. Nanobiotechnology* **2021**, *19*, 1–33.
- [50] I. H. Lee, M. S. Palombo, X. Zhang, Z. Szekely, P. J. Sinko, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *138*, 11–22.
- [51] S. Link, M. A. El-Sayed, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 331–366.
- [52] T. L. Doane, C. H. Chuang, R. J. Hill, C. Burda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 317–326.

- [53] C. Vetterlein, R. Vásquez, K. Bolaños, G. A. Acosta, F. Guzman, F. Albericio, F. Celis, M. Campos, M. J. Kogan, E. Araya, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *166*, 323–329.
- [54] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962.
- [55] X. Xu, Y. Zhao, X. Xue, S. Huo, F. Chen, G. Zou, X. J. Liang, *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 3528–3535.
- [56] O. B. Knights, S. Ye, N. Ingram, S. Freear, *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 1472–1481.
- [57] V. Sharma, K. Park, M. Srinivasarao, **2009**, *106*, 4981–4985.
- [58] X. Gu, V. Timchenko, G. H. Yeoh, L. Dombrovsky, R. Taylor, *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 1–16.
- [59] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, M. Lämmerhofer, *ACS Nano* **2013**, *7*, 1129–1136.
- [60] A. M. Alkilany, R. L. Frey, J. L. Ferry, C. J. Murphy, *Langmuir* **2008**, *24*, 10235–10239.
- [61] J. G. G. D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press Boston, **1991**.
- [62] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**.
- [63] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [64] E. C. R. L. . B. C. D. . C. P. I. Kaiser, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [65] L. Wu, Y. Lin, J. Feng, Y. Qi, X. Wang, Q. Lin, W. Shi, E. Zheng, W. Wang, Z. Hou, H. Lin, C. Yu, Y. He, Y. Xu, H. Yang, L. Lin, L. Li, *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 1–11.