

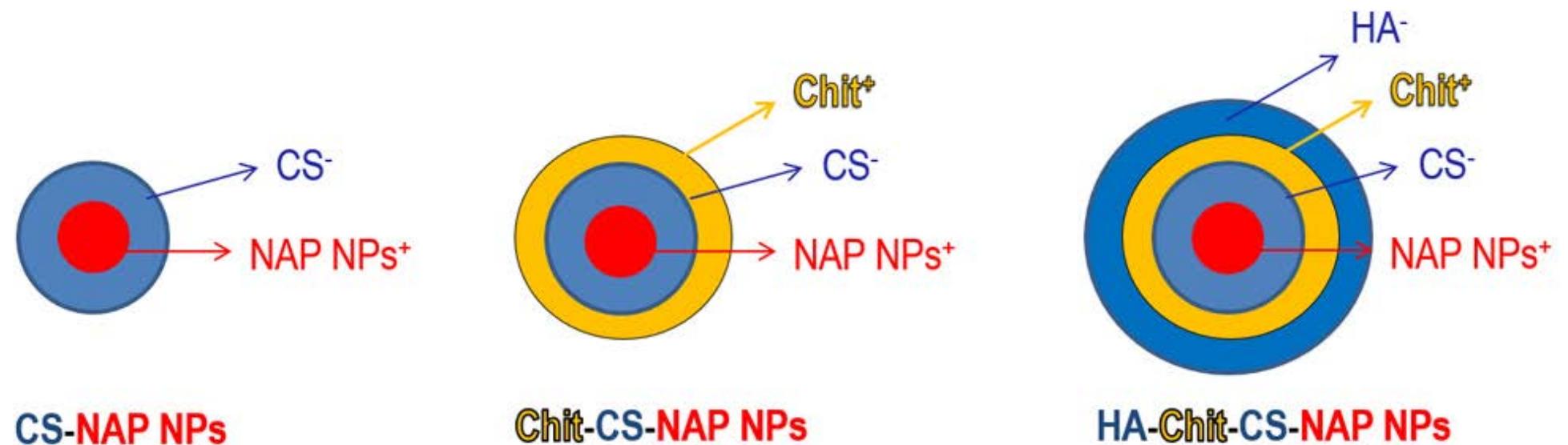
Triple recubrimiento capa-a-capita de nanopartículas poliméricas mediante interacción electroestática con polímeros naturales bioactivos

Autores: E. Espinosa-Cano^{1,2}, M.R. Aguilar de Armas^{1,2*}, J. San Roman^{1,2}

¹ Grupo de Biomateriales, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC), Madrid, España.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid, España.

*mraguilar@ictp.csic.es



Resumen

Este trabajo describe la preparación y caracterización del triple recubrimiento con polímeros bioactivos (*i.e.* sulfato de condroitina (CS), quitosano (Chit) y ácido hialurónico (HA)) mediante deposición capa-a-capita de unas nanopartículas (NPs) poliméricas basadas en naproxeno, un potente anti-inflamatorio no esteroideo. Se consiguió un recubrimiento efectivo tras la optimización de la relación en masa y la concentración final de NPs después de cada recubrimiento. El sis-

tema resultante es aniónico con una carga superficial de $-15,8 \pm 0.6$ mV y un diámetro hidrodinámico medio (% intensidad) de 348 ± 8 nm. Además, el triple recubrimiento mejora la estabilidad en suspensión de las NPs haciéndolas estables a pH fisiológico.

Palabras clave: Nanopartícula polimérica, capa-a-capita, sulfato de condroitina, quitosano, ácido hialurónico y multicapa.

Abstract

This work describes the preparation and characterization of triple LbL-coated polymeric nanoparticles based on naproxen, a potent non-steroidal anti-inflammatory drug, with bioactive polymers (*i.e.* chondroitin sulfate (CS), chitosan (Chit) and hyaluronic acid (HA)). An effective coating was achieved after the optimization of the mass ratio and the final concentration of the NPs after each coating step. The resultant NPs present a surface charge of -15.8 ± 0.6 mV and a mean hy-

drodynamic diameter (by intensity) of 348 ± 8 nm. Moreover, the coating confers the NPs improved stability in suspension with no significant changes in hydrodynamic properties up to one month at physiological pH.

Keywords: Polymeric nanoparticles, layer-by-layer, chondroitin sulfate, chitosan, hyaluronic acid and multilayer

Introducción

Nuestro grupo tiene una amplia experiencia en el desarrollo de nanopartículas (NPs) poliméricas basadas en copolímeros anfífilos conformados por un bloque rico en monómero hidrófilo y un bloque rico en monómero hidrófobo. Su microestructura permite que, en medio acuoso, estos copolímeros se autoensamblen en forma de micela quedando los segmentos hidrófobos en el núcleo, protegidos por los segmentos hidrófilos que quedan expuestos en la corona. En concreto, recientemente hemos descrito varias familias de copolímeros formados por 1-vinilimidazol (VI) y derivados metacrílicos de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como el naproxeno (HNAP) [1] o el ibuprofeno [2]. Las partículas basadas en el copolímero poli(HNAP-co-VI)(71:29 %mol) (HNAP71 [1]), denominadas NAP NPs, se obtienen por autoensamblado del copolímero anfílico en medio acuoso formando una estructura con una carga superficial positiva debido a la exposición en superficie de los anillos de imidazol (VI) y la formación de un núcleo hidrófobo con el naproxeno covalentemente anclado. El núcleo hidrófobo las hace buenas candidatas para la encapsulación y liberación controlada de otros fármacos de carácter apolar. Su alta carga superficial positiva permitió su inmovilización en superficie, mediante deposición capa-a-capa, con polianiones, dando lugar a recubrimientos de cuádruple bicapa (NPs-polianión) Así se obtuvieron superficies con propiedades anti-inflamatorias a largo plazo gracias a la liberación controlada del naproxeno que debía difundir desde el interior de la partícula y a través de las distintas capas del recubrimiento [1]. La deposición capa-a-capa implica la adsorción alterna en medio acuoso de dos o más polímeros u otras especies multivalentes con interacciones complementarias. Debido a la simplicidad de este método, el número de sistemas de liberación controlada que explota esta metodología ha aumentado significativamente en los últimos años [3]. La **modificación superficial de NPs** mediante la técnica capa-a-capa implica: **a)** superior capacidad de carga, ya que se podrán incorporar en mayor cantidad componentes bioactivos como fármacos [4] o material genético [5] en las distintas capas; **b)** mejor control en la liberación de fármacos, al incorporarse más barreras físicas que pueden ser sensibles a estímulos específicos [6]; **c)** fácil funcionalización con moléculas o polímeros que favorezcan la vehiculización activa y pasiva; **d)** multifuncionalidad, mediante el uso de polímeros o pro-fármacos bioactivos con funciones específicas [4]. En concreto, este artículo expone la preparación y caracterización del triple recubrimiento de las NAP NPs previamente descritas por interacción electroestática con sulfato de condroitina (CS), quitosano (Chit) y ácido hialurónico (HA) (**Esquema 1**). Los tres polielectrolitos utilizados son polímeros naturales muy utilizados en el campo de los biomateriales por su alta biocompatibilidad y sus propiedades terapéuticas intrínsecas [7]. Además, el recubrimiento final de HA pretende conferir al sistema estabilidad en el medio fisiológico y vehiculización activa al ser el principal ligando de los receptores CD44 sobreexpresados en células inflamatorias activadas o cancerígenas [5, 8, 9]. Para conseguir un recubrimiento efectivo, se optimizó la relación en masa y la concentración final de NPs después de cada recubrimiento. Además, para su aplicación en el ámbito biomédico la concentración y la estabilidad en pH fisiológico (7,4) son determinantes. Por eso, se estudió la influencia del volumen final y el pH en las propiedades hidrodinámicas de las partículas y se demostró la estabilidad en suspensión a pH 7,4, hasta un mes.

Materiales y Métodos

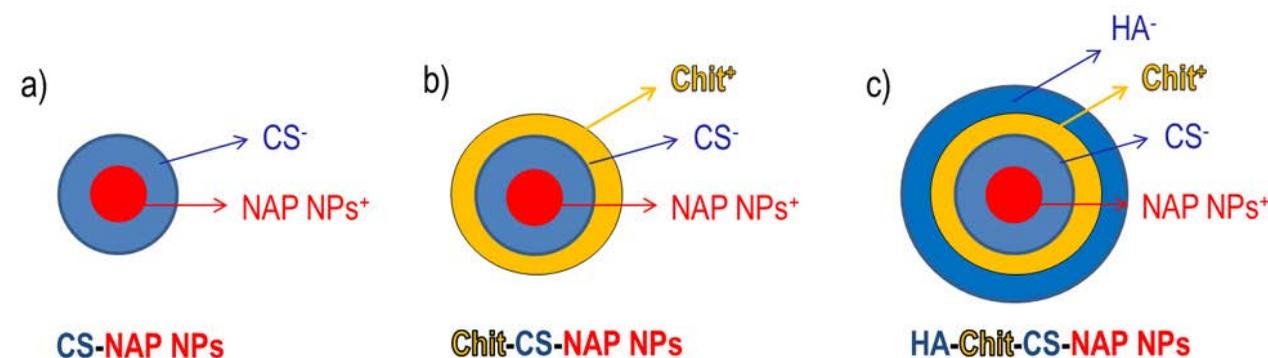
Síntesis de las partículas basadas en HNAP71

La síntesis de las NAP NPs se llevó a cabo mediante el método de nanoprecipitación a partir del co-polímero anfílico HNAP71, previamente sintetizado por nuestro grupo [1]. Este copolímero está basado en 1-vinilimidazol como componente hidrófilo y un derivado sintético metacrílico del naproxeno (HNAP) como componente hidrófobo. En resumen, se disolvió el co-polímero HNAP71, a una concentración de 10 mg/mL en una mezcla de disolventes orgánicos, acetona:etanol (8:2, v:v). Después, esta fase orgánica se goteó lentamente sobre una disolución acuosa (0,1 M ácido

acético y 0,1 M NaCl) a pH 4,5 en constante agitación para obtener una concentración final de NPs de 3 mg/mL.

Recubrimiento con sulfato de condroitina, quitosano y ácido hialurónico: ratios en masa y concentración final de nanopartículas

Las nanopartículas catiónicas, NAP NPs, se recubrieron mediante interacción electroestática de forma consecutiva con sulfato de condroitina (CS-NPs), quitosano (Chit-CS-NPs) y ácido hialurónico (HA-Chit-CS-NPs) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Representación gráfica de los sistemas resultantes del recubrimiento de **a)** las NAP NPs con CS, **b)** las CS-NAP-NPs con Chit y **c)** las Chit-CS-NAP-NPs con HA.

En resumen, para cada recubrimiento, se goteaba 1 mL de **a)** NAP NPs, **b)** CS-NAP NPs o, **c)** Chit-CS-NAP NPs a pH 4,5 sobre 2 mL de una disolución acuosa (0,1 M ácido acético y 0,1 M NaCl, pH 4,5) de **a)** sulfato de condroitina (CS; 10 KDa, BioIberica, España), **b)** quitosano (Chit; 300 KDa, grado de desacetilación 90%) y, **c)** ácido hialurónico (HA; 1000 KDa, BioIberica, España). Se probaron distintos ratios en masa: **a)** mg NPs:mg CS = 3,33; 3,00; 2,50; 2,00; 1,50; 0,50 **b)** mg CS-NPs:mg Chit = 0,60; 0,40; 0,20 and, **c)** mg Chit-CS-NPs:mg HA = 0,05, 0,03, 0,02; y distintas concentraciones finales de NPs ($[NPs]_f$): **a)** 1,00 mg/mL, 0,83 mg/mL, 0,67 mg/mL, 0,50 mg/mL y 0,33 mg/mL, **b)** 0,04 mg/mL y 0,03 mg/mL, y **c)** 0,01 mg/mL. En todos los casos, se midieron las propiedades hidrodinámicas (i.e. tamaño, polidispersidad de la distribución de tamaños y carga superficial) después de cada recubrimiento.

Determinación de las propiedades hidrodinámicas: distribución de tamaños y carga superficial

La distribución de tamaño de las partículas sin recubrir y con uno, dos o tres recubrimientos (NAP NPs, CS- NAP NPs, Chit-CS-NAP NPs o HA-Chit-CS-NAP NPs, respectivamente) se determinó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un equipo Malvern Nanosizer NanoZS (Madrid, España) equipado con un láser He-Ne de 4 mW ($\lambda = 633$ nm) a un ángulo de dispersión de 173°. Las medidas se realizaron en cubetas de poliestireno (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y la temperatura se mantuvo constante a 25 °C. Basándose en la ecuación de Stokes-Einstein y asumiendo que las partículas son esféricas, se determinó (ZetaSizer Software versión

7.10) el diámetro hidrodinámico medio (D_h) en % intensidad y el índice de polidispersidad de tamaño de las partículas (PdI). Este último será un valor entre 0 (partículas monodispersas) y 1 (partículas polidispersas). Para cada sistema, se hizo la media estadística y desviación estándar de 3 muestras diferentes (media de 11 medidas cada una). El potencial zeta (ξ) de la dispersión de NPs se determinó mediante Electroforesis Doppler Láser (LDE) utilizando un equipo Malvern Nanosizer NanoZS (Madrid, España). En este caso, la media estadística y la desviación estándar se calcularon a partir de 3 muestras (media de 20 medidas cada una).

Influencia del volumen final, el pH y el tiempo en las propiedades hidrodinámicas de las NPs

Tras el triple recubrimiento, las NPs se liofilizaron y resuspendieron (5 minutos de agitación manual y 5 minutos de baño de ultrasonidos a temperatura ambiente) en distintos volúmenes, i.e. 2/3, 1/2 y 1/4 del volumen inicial (V_i), de disolución acuosa (0,1 M ácido acético, 0,1 M NaCl) a pH 4,5. También se estudió la influencia del pH, para ello se resuspendieron en el V_i pero a distintos pH (4,5; 5,5; 6,5 y 7,5). En todos los casos, después de resuspender las partículas, se midieron las propiedades hidrodinámicas (i.e. tamaño, polidispersidad de la distribución de tamaños y carga superficial). Por último, se evaluó la estabilidad con el tiempo en suspensión a pH fisiológico (7,4) midiendo el tamaño, la distribución de tamaños y la carga superficial todas las semanas hasta un mes.

Resultados y Discusión

Optimización de la ratio en masa y la concentración final de NPs

El pK_a de los grupo sulfato del CS es 1,5-2,0 y el de los grupos carboxilo 3,4-3,6 [10]; el de los grupos carboxilo del HA es 3-3,5 [11]; mientras que el pK_b de los grupos imidazol de las NAP NPs y de los aminos del Chit es aproximadamente 5,5 [12] y 6,5 [13], respectivamente. Sabiendo esto, se estableció pH 4,5 como el más adecuado para el recubrimiento electrostático de las NPs ya que, a este pH todos los polielectrolitos se encuentran cargados en mayor o menor medida. Siguiendo el protocolo que se ve en el **Esquema 2**, se optimizó la relación en masa que permitía un recubrimiento adecuado de las NPs con el polielectrolito natural correspondiente en cada caso.

[NPs] = constante
 $V_{NPs} = 1 \text{ mL (pH 4.5)}$



[polielectrolito] = varia

$V_{CS} = 2 \text{ mL}$

$[NP]_{Final} = \text{varia}$

$V_{Final} = 3 \text{ mL (0.1 M AA, 0.1 M NaCl, pH 4.5)}$

750 rpm

Ratio en masa (mg NPs: mg polielectrolito) = varia

Esquema 2.
 Representación gráfica de la metodología utilizada para establecer la relación en masa (mg NPs:mg polielectrolito) más apropiada para el recubrimiento de las distintas partículas (i.e. NAP-NPs, CS-NAP NPs o Chit-CS-NAP-NPs) con el correspondiente polielectrolito (CS, Chit y HA, respectivamente).

Como puede observarse en la **Figura 1a**, para todas las relaciones mg NAP NPs:mg CS probados se observa un aumento en el tamaño de partícula debido a la adsorción de CS en la superficie

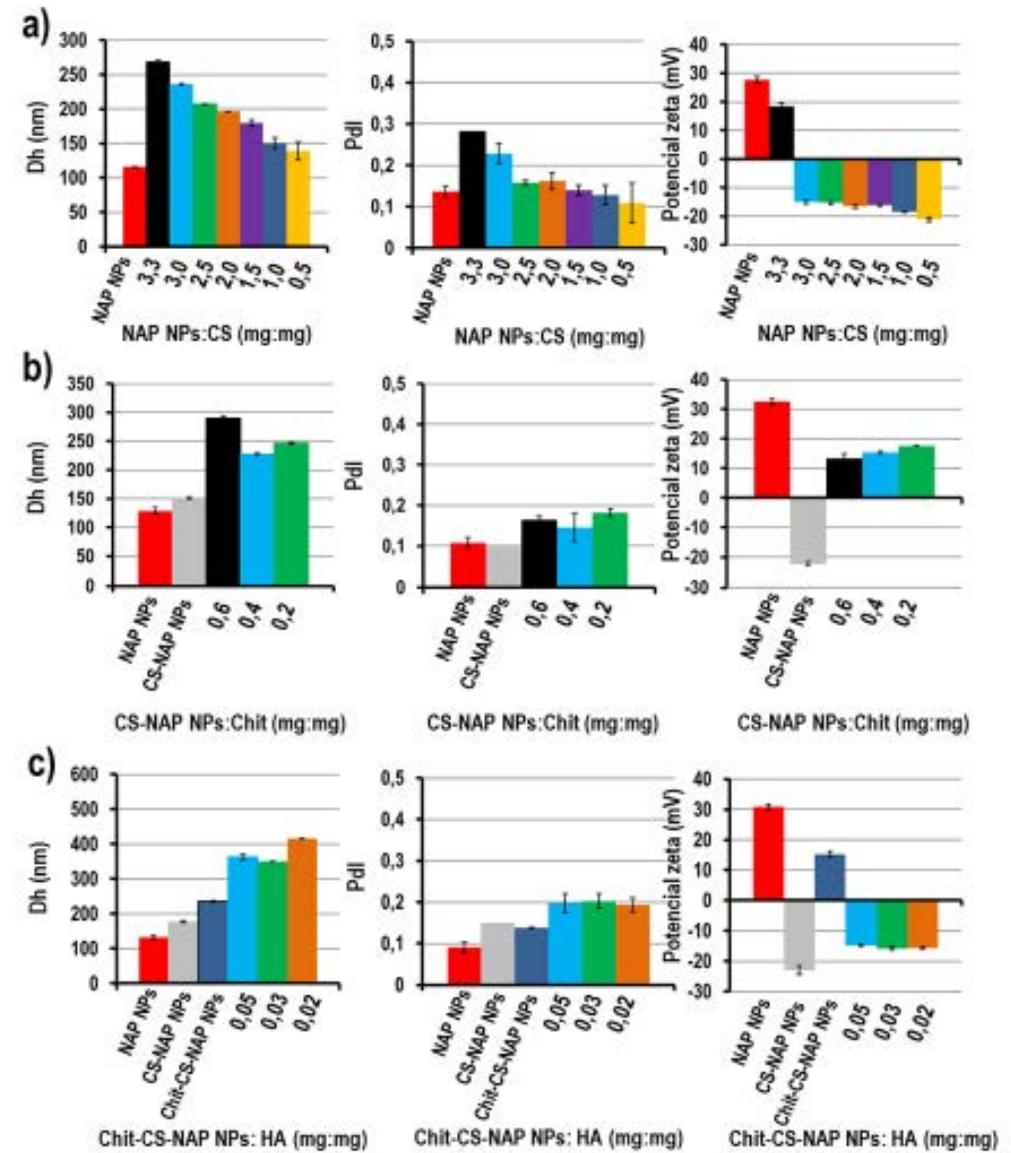


Figura 1. Diámetro hidrodinámico en % intensidad (D_h , nm), polidispersidad de la distribución de tamaño (PdI) y la carga superficial (ξ , mV) de **a)** NAP NPs antes del recubrimiento (rojo) y CS-NAP-NPs después del recubrimiento a distintas relaciones en masa de NAP NPs:CS (3,33; 3,00; 2,50; 2,00; 1,50; 1,00 y 0,50); **b)** NAP NPs (rojo) y CS-NAP NPs (gris) antes de los correspondientes recubrimientos y Chit-CS-NAP NPs después del recubrimiento a distintas relaciones en masa de CS-NAP NPs:Chit (0,6; 0,4 y 0,2) y; **c)** NAP NPs (rojo), CS-NAP NPs (gris) y Chit-CS-NAP NPs (azul oscuro) antes de los recubrimientos y HA-Chit-CS-NAP NPs después del recubrimiento a distintas relaciones en masa de Chit-CS-NAP NPs:HA (0,05; 0,03 y 0,02).

de la partícula. Este aumento se hace menos acusado a medida que disminuye la relación NAP NPs:CS (mg:mg) (*i.e.* a medida que aumenta la masa de CS), Δ diámetro = 153 ± 13 nm (NAP NPs:CS (mg:mg) = 3,3) ó 23 ± 3 nm (NAP NPs:CS (mg:mg) = 0,5); indicando una mayor compactación de las CS-NPs. La reducción de tamaño viene acompañada de una disminución de la polidispersidad en la distribución de tamaños consiguiéndose valores por debajo de 0,2 a partir de NAP NPs:CS (mg:mg) = 2,5 y similares a los de las partículas sin recubrir a partir de NAP NPs:CS (mg:mg) = 1,5.

Además, para todas las relaciones en masa testadas se consiguió una reducción de la carga superficial y, para todas menos para la más alta (3,33), una inversión de la misma de $+28 \pm 1$ mV sin recubrimiento hasta -21 ± 1 mV para la relación en masa más baja (0,5). La inversión de carga se hace más acusada cuanto más CS se añade al quedar los grupos sulfato y carboxilo del CS expuestos en la superficie de la NPs, otro indicativo de que se ha conseguido un recubrimiento efectivo. Además, cuánto más negativa sea la carga superficial, más fácil será la deposición electrostática de la siguiente capa. Por tanto, se estableció que entre las relaciones NAP:NPs (mg:mg) CS testadas, 0,5, era la más adecuada para el recubrimiento electrostático. En el caso del recubrimiento con Chit de las CS-NAP NPs (**Figura 1b**), se observa también esa inversión del potencial zeta de valores negativos a positivos, siguiendo la misma tendencia creciente del valor absoluto del potencial zeta con la adición de Chit. Además, se observa de nuevo una reducción del tamaño al aumentar la masa de Chit sin cambios importantes en la polidispersidad para las dos primeras ratios testadas. Sin embargo, para la última ratio de 0,2 empieza a aumentar el tamaño de NPs y la PdI. Por tanto, se seleccionó la ratio de 0,4 como la más adecuada para el recubrimiento con Chit de las CS-NAP NPs. El mismo patrón se observó con el recubrimiento de HA (**Figura 1c**) y por eso se seleccionó también la ratio intermedia de entre las testadas como la más apropiada, por ejemplo, Chit-CS-NAP NPs: HA = 0,03 (mg:mg). Una vez optimizada la relación NPs:polielectrolito (mg:mg) en cada paso, se intentó maximizar la $[NPs]_f$. En la **Figura 2a** se muestran las propiedades hidrodinámicas de las CS-NPs a todas las concentraciones testadas. Como para la mayoría de los sistemas nanoparticulados descritos en bibliografía [14], un aumento de la concentración se tradujo en un aumento del tamaño sin importantes cambios en la polidispersidad o la carga superficial para las concentraciones testadas. La concentración más alta a la que pudieron medirse las propiedades hidrodinámicas sin que hubiera agregación o desestabilización del sistema fue 1 mg/mL. Para las Chit-CS-NAP NPs, la $[NPs]_f$ más alta que se consiguió sin desestabilización del sistema para la relación en masa seleccionada fue 0,04 mg/mL **Figura 2b**.

Finalmente, la **Figura 2c** muestra la evolución del tamaño medio, la polidispersidad de la distribución de tamaños y la carga superficial con cada una de las capas. Como era de esperar, al igual que en otros sistemas parecidos descritos en bibliografía [5, 15], se observa una tendencia creciente en el tamaño y la PdI al añadir capas y alternancia en el signo de la carga superficial predominando el signo del polielectrolito que queda expuesto en la superficie. El diámetro final de las NPs, 348 ± 8 nm, favorece la internalización de las mismas por parte de células inflamatorias como el macrófago [16] y, por tanto, la retención de las mismas en el tejido inflamado por el denominado efecto ELVIS [17]. El protocolo final para el triple recubrimiento de las NAP NPs queda resumido en el **Esquema 3**.

Redispersibilidad de NPs liofilizadas

La concentración final de nanopartículas recubiertas con triple capa ($[HA-Chit-CS-NAP NPs]_f$) que se obtuvo era de $13 \mu\text{g/mL}$, una concentración que podía limitar el uso de las NPs. Por tanto, se barajó la posibilidad de liofilizar las partículas y resuspenderlas en volúmenes más pequeños para concentrarlas. Sin embargo, como se observa en la **Figura 3**, solo si se resuspendían en el volumen inicial, V_i , se conseguía recuperar el tamaño y la polidispersidad de la muestra inicial

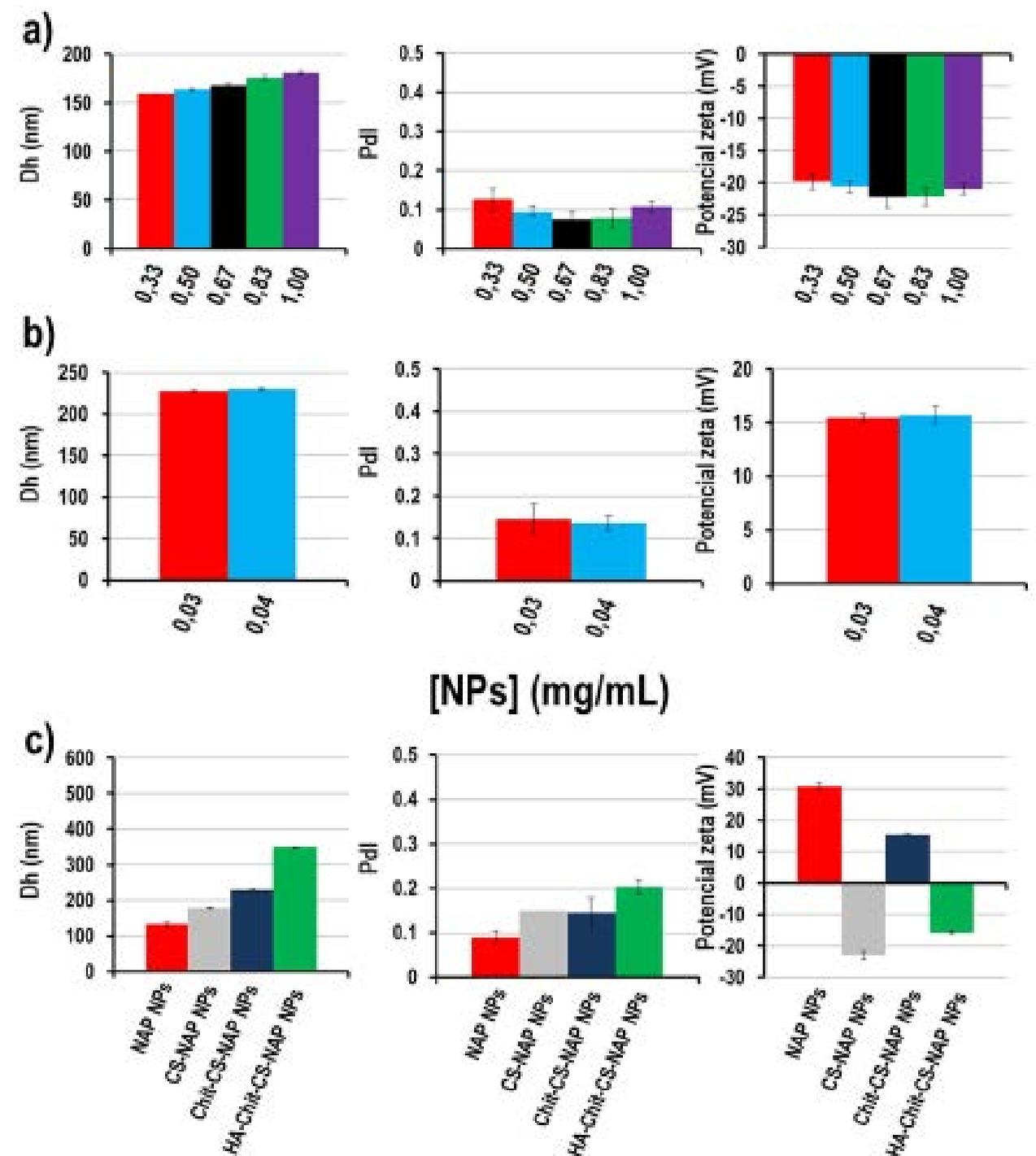
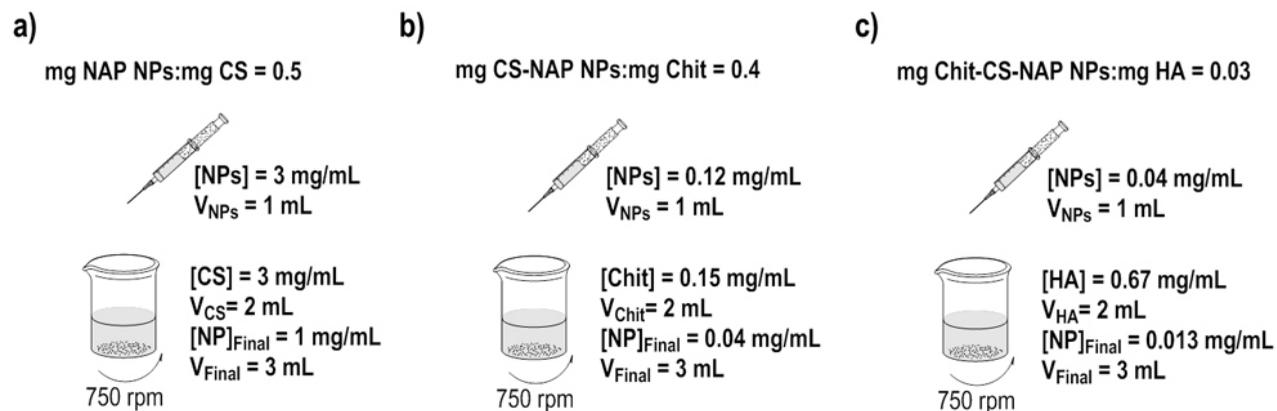


Figura 2. Diámetro hidrodinámico en intensidad (D_n , nm), polidispersidad de la distribución de tamaño (PdI) y potencial zeta (mV) de **a)** CS-NAP-NPs y **b)** Chit-CS-NAP NPs a distintas concentraciones finales de NPs; y **c)** evolución de las propiedades hidrodinámicas del sistema después de cada recubrimiento.



Esquema 3. Representación gráfica del protocolo final de recubrimiento de **a)** NAP NPs con CS, **b)** CS-NAP NPs con Chit y **c)** Chit-CS-NAP NPs con HA.

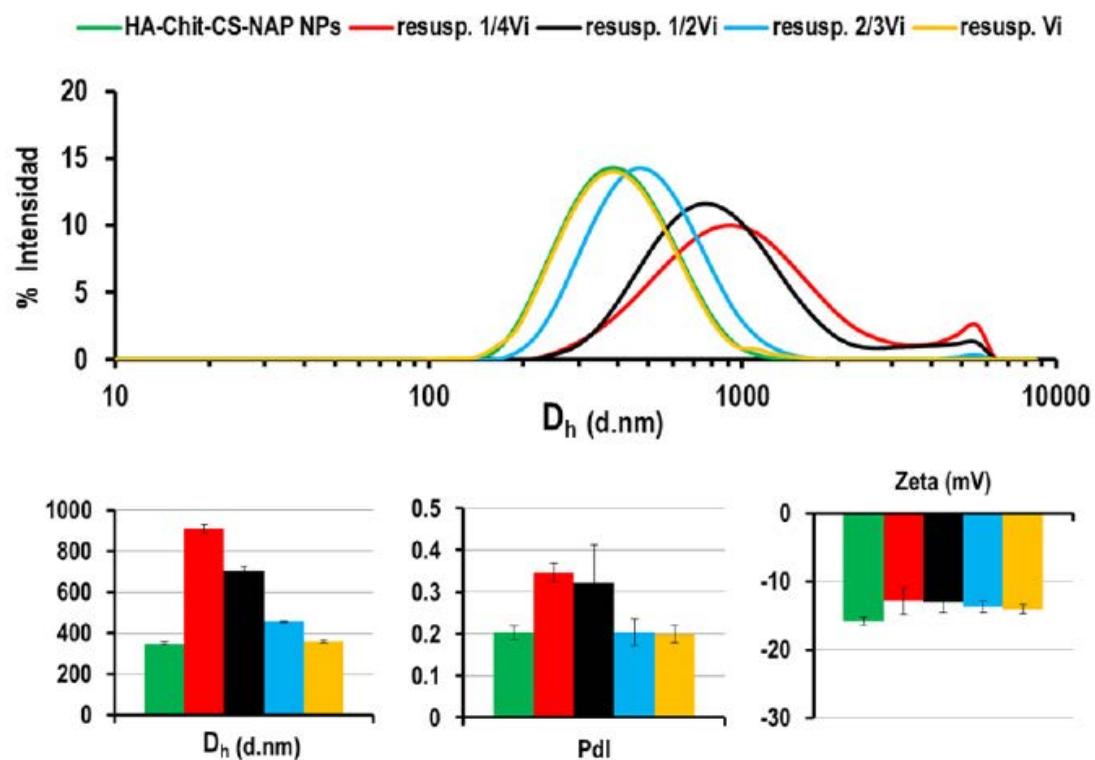


Figura 3. Distribución de tamaños de las HA-Chit-CS-NAP NPs y representación gráfica del diámetro hidrodinámico en intensidad (D_h , nm), la polidispersidad (PdI) y la carga superficial (ξ , mV) antes de liofilizar (verde) y después de liofilizar y resuspender (resusp.) las NPs en distintas fracciones del volumen inicial (V_i) de disolución acuosa a pH 4,5.

aunque disminuía ligeramente el potencial zeta, probablemente debido al baño de ultrasonido que puede afectar a la interacción electroestática en la que se basa el recubrimiento al ser una interacción no covalente [18]. La muestra resuspendida en 2/3 V_i suponía un ligero aumento en el tamaño respecto a la resuspendida en V_i sin cambios en PdI o carga superficial, mientras que en volúmenes más pequeños el aumento en el tamaño y la PdI era muy significativo. Por tanto, se observó de nuevo la influencia de la concentración en el tamaño de partícula y se descartó la posibilidad de concentrar las NPs sin comprometer las propiedades hidrodinámicas después de su preparación.

Influencia del pH en las propiedades hidrodinámicas

Para aplicaciones biológicas, trabajar a pH fisiológico (7,4) es crucial, sin embargo, como se discutió previamente, para conseguir una interacción electroestática efectiva los recubrimientos se realizaron a pH 4,5. El pH influye de forma determinante en la carga de los polielectrolitos [12]. Aquellos que contienen grupos catiónicos en su estructura, como el HNAP71 o el Chit, presentarán menor carga a medida que el pH del medio aumente respecto a su pK_b , que en ambos casos está por debajo del pH fisiológico. Por el contrario, los que contienen grupos carboxilo o sulfato, como el CS o el HA, presentarán mayor carga a pH fisiológico ya que está muy por encima de su pK_a . La carga superficial de NPs es crítica para su estabilidad, a mayor carga, mayor repulsión electroestática entre partículas y menor probabilidad de agregación [19]. Por lo tanto, el recubrimiento de NAP NPs con CS, Chit y, en última estancia, HA debería contribuir a estabilizar las NPs a pH fisiológico. Para comprobar esta teoría, se midieron las propiedades hidrodinámicas de las NAP NPs y HA-Chit-CS-NAP NPs tras liofilizarlas y resuspenderlas en el mismo volumen de disolución acuosa, pero a distintos pH (**Figura 4**). Se observa claramente como con el aumento del pH, la carga superficial de las NAP NPs disminuye, y por encima del pK_b del HNAP71 (i.e. 5,5) se produce agregación y no es posible medir tamaño o polidispersidad. Esto no sucede con las HA-Chit-CS-NAP NPs que mantienen la PdI y la carga superficial relativamente constante en todo el rango de pH con un ligero aumento a partir del pH 5,5 probablemente debido a una interacción electroestática más débil entre las capas al descargarse ligeramente el Chit o el HNAP71. Confirmamos así que la triple capa estabiliza las NAP NPs a pH fisiológico.

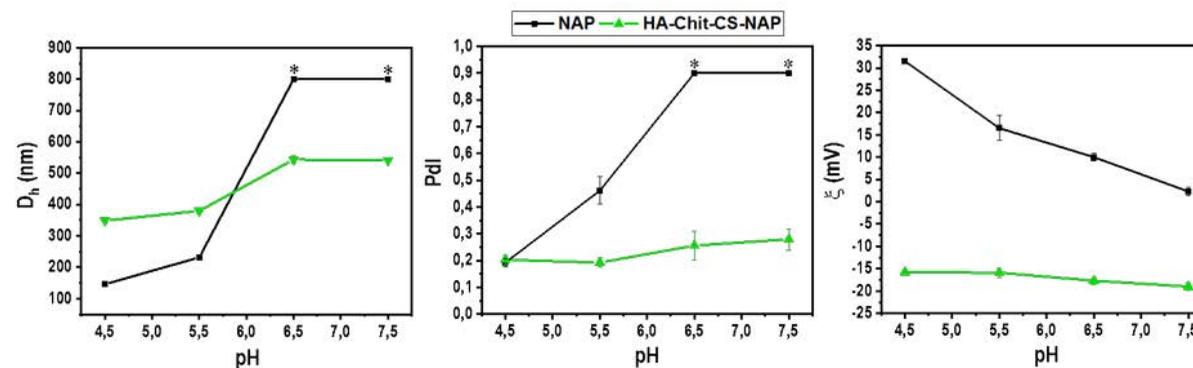


Figura 4. Evolución del diámetro hidrodinámico (D_h , nm), la polidispersidad de la distribución de tamaños (PdI) y la carga superficial (potencial zeta, mV) de las NAP NPs y las HA-Chit-CS-NAP NPs con el pH.

Estabilidad en el tiempo a pH fisiológico

Por último, se evaluó la estabilidad de las HA-Chit-CS-NAP NPs en suspensión a pH 7,4 midiendo las propiedades hidrodinámicas de las mismas cada 7 días hasta los 28 días. Como se muestra en la **Figura 5**, no hay diferencias significativas ni en tamaño, ni en Pdl ni en carga superficial a lo largo del tiempo y en especial entre los valores a día 1 y día 28. De esta forma, confirmamos que las NPs con el triple recubrimiento son estables a pH 7,4 hasta un mes.

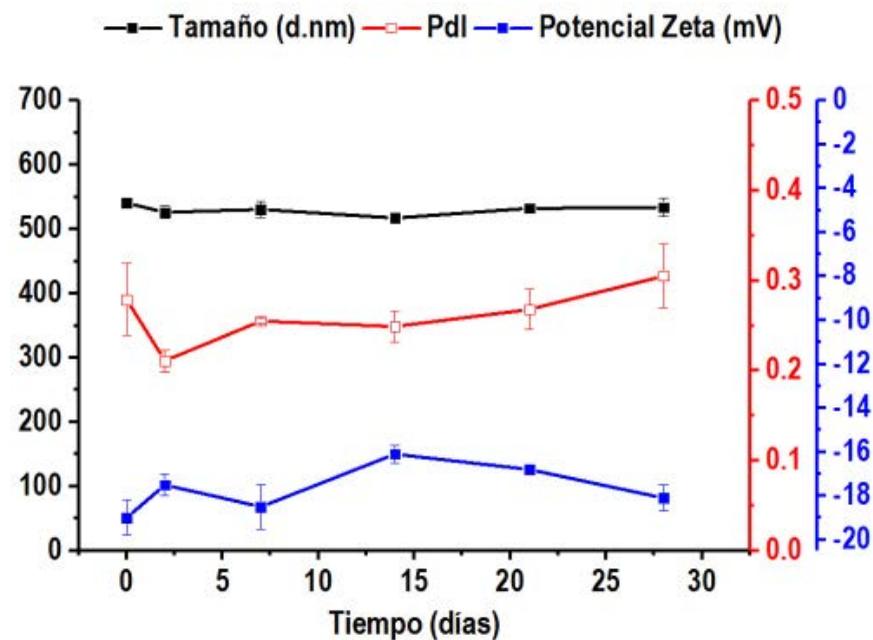


Figura 5. Evolución del diámetro hidrodinámico medio en intensidad (D_h , nm), la polidispersidad de la distribución de tamaños (PdI) y la carga superficial (potencial zeta, mV) de las HA-Chit-CS-NAP NPs con el tiempo a pH 7,4 en suspensión.

Conclusiones

Se prepararon con éxito NPs con naproxeno, un potente anti-inflamatorio no esteroideo, anclado covalentemente en su núcleo hidrofóbico y con un triple recubrimiento hidrofílico de CS, Chit, HA, tres polímeros naturales con propiedades anti-inflamatorias intrínsecas. Las HA-Chit-CS-NAP NPs resultantes presentaron un diámetro hidrodinámico medio de 348 ± 8 nm, baja polidispersidad de distribución de tamaños y una carga superficial de $-15,8 \pm 0,6$ mV. Su tamaño favorecerá la internalización de las mismas por parte de células inflamatorias como los macrófagos [16] y, probablemente, la retención de las mismas en el tejido inflamado por el denominado efecto ELVIS [17]. Las NPs pueden liofilizarse y redispersarse en el mismo volumen de partida sin cambiar las propiedades hidrodinámicas y en 2/3 de su volumen inicial con un aumento de aproximadamente 100 nm en su diámetro. El triple recubrimiento le confiere estabilidad a distintos pH a las NPs y, en especial, a pH fisiológico hasta un mes en suspensión. Por tanto, estas partículas tienen potencial como sistemas multifuncionales de liberación controlada de naproxeno y polímeros bioactivos para el tratamiento de procesos inflamatorios.

Referencias

- Al-Khoury, H., et al., *Anti-inflammatory Surface Coatings Based on Polyelectrolyte Multilayers of Heparin and Polycationic Nanoparticles of Naproxen-Bearing Polymeric Drugs*. *Biomacromolecules*, 2019. **20**(10): p. 4015-4025.

- Suárez, P., et al., *Self-Assembling Gradient Copolymers of Vinylimidazol and (Acrylic) ibuprofen With Anti-Inflammatory and Zinc Chelating Properties*. *Macromolecular Bioscience*, 2013. **13**(9): p. 1174-1184.

- Hammond, P.T., *Polyelectrolyte multilayered nanoparticles: using nanolayers for controlled and targeted systemic release*. *Nanomedicine (Lond)*, 2012. **7**(5): p. 619-22.
- Lee, P.-C., et al., *Multifunctional PLGA-based nanoparticles as a controlled release drug delivery system for antioxidant and anticoagulant therapy*. *International journal of nanomedicine*, 2019. **14**: p. 1533-1549.
- Wang, S., et al., *Hyaluronic acid-coated PEI-PLGA nanoparticles mediated co-delivery of doxorubicin and miR-542-3p for triple negative breast cancer therapy*. *Nanomedicine*, 2016. **12**(2): p. 411-20.
- Wang, H., et al., *Hyaluronic acid-decorated dual responsive nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and chitosan for targeted co-delivery of doxorubicin and irinotecan to eliminate cancer stem-like cells*. *Biomaterials*, 2015. **72**: p. 74-89.
- Muzzarelli, R., et al., *Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **89**: p. 723-739.
- Almalik, A., et al., *Cellular responses of hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles*. *Toxicol Res (Camb)*, 2018. **7**(5): p. 942-950.
- Chiesa, E., et al., *Hyaluronic Acid-Decorated Chitosan Nanoparticles for CD44-Targeted Delivery of Everolimus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(8): p. 2310.
- Chandran, P.L. and F. Horkay, *Aggrecan, an unusual polyelectrolyte: review of solution behavior and physiological implications*. *Acta biomaterialia*, 2012. **8**(1): p. 3-12.
- Liao, Y.-H., et al., *Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery*. *Drug Delivery*, 2005. **12**(6): p. 327-342.
- Reyes-Ortega, F., *3 - pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications*, in *Smart Polymers and their Applications*, M.R. Aguilar and J. San Román, Editors. 2014, Woodhead Publishing. p. 45-92.
- Lee, D.W., et al., *Strong adhesion and cohesion of chitosan in aqueous solutions*. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 2013. **29**(46): p. 14222-14229.
- Buzea, C., I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity*. *Biointerphases*, 2008. **2**.
- Maiolino, S., et al., *Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with Polyethyleneimine and Hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells*. *J Nanobiotechnology*, 2015. **13**: p. 29.
- Foroozandeh, P. and A.A. Aziz, *Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles*. *Nanoscale research letters*, 2018. **13**(1): p. 339-339.
- Espinosa-Cano, E., et al., *Chapter 7 - Inflammation-Responsive Polymers*, in *Smart Polymers and their Applications (Second Edition)*, M.R. Aguilar and J. San Román, Editors. 2019, Woodhead Publishing. p. 219-254.
- Rinaudo, M., *Non-Covalent Interactions in Polysaccharide Systems*. *Macromolecular bioscience*, 2006. **6**: p. 590-610.
- French, R.A., et al., *Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles*. *Environ Sci Technol*, 2009. **43**(5): p. 1354-9.



Graduada en Ingeniería Biomédica por la Universidad Carlos III de Madrid y primera de su promoción en un postgrado en Alta especialización en Plásticos y Cauchos por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Actualmente, becaria FPU en el grupo de Biomateriales del ICTP-CSIC realizando la tesis en **"NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA EL TRATAMIENTO DE PROCESOS INFLAMATORIOS"**. A día de hoy, la tesis ha dado como resultado la escritura de tres capítulos de libro relacionados con inflamación y cáncer; y una publicación en "Biomacromoleculas" una revista que se encuentra en el primer cuartil en el área de biomateriales, bioingeniería, química de materiales y polímeros y plásticos. En 2018, este trabajo fue premiado con el "Exchange Program Award" de la yESAO.