

Diseño de nanopartículas silíceas mesoporosas magnéticas como vehículos con aplicaciones biomédicas

Alejandro Pérez Domínguez

Máster en Ingeniería Química



MÁSTERES
DE LA UAM
2019 – 2020

Facultad de Ciencias



MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Curso académico 2019-20

Trabajo Fin de Máster

**DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS SILÍCEAS
MESOPOROSAS MAGNÉTICAS COMO VEHÍCULOS
CON APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Autor: Alejandro Pérez Domínguez

Directora: Victoria Morales Pérez

Colaboradora: Nuria Susana Almendro Verdugo

Índice

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Liberación controlada de fármacos	3
1.2. Nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)	5
1.3. Aplicación de las nanopartículas de óxido de hierro magnéticas en MSN	8
1.4. Estrategias de modificación de las MSN	9
2. Objetivos	11
3. Metodología	12
3.1 Síntesis de los materiales MSN	12
3.1.1. Materiales sintetizados.....	12
3.1.2. Síntesis del surfactante con actividad farmacológica	12
3.1.3. Síntesis de las nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄ -NPs).....	13
3.1.4. Estabilización Fe ₃ O ₄ NPs con ácido butírico.....	13
3.1.5. Síntesis de las nanopartículas mesoporosas síliceas (MSN).....	14
3.1.6. Incorporación de la glucosa a las MSN	15
3.1.7. Liberación controlada del fármaco en medio simulado	15
3.2 Técnica de caracterización utilizadas	16
3.2.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	16
3.2.2. Difracción de rayos X (DRX).....	16
3.2.3. Adsorción y desorción de nitrógeno N ₂ (BET).....	16
3.2.4. Análisis termogravimétricos (TGA)	17
3.2.5. Microscopía electrónica (TEM).....	17
3.2.6. Espectroscopía infrarroja (FTIR) y ultravioleta-visible (UV-vis)	18
3.2.7. Espectroscopía de plasma ICP-AES	18
4. Resultados y discusión	19
4.1. Síntesis de surfactantes con actividad farmacológica	19
4.2. Nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)	20
4.2.1. Estudio de variables de la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN).....	22
4.2.1.1. Estudio de la influencia del pH	22
4.2.1.2. Estudio de la influencia de la concentración de surfactante	24
4.2.1.3. Estudio de la influencia de la variación de pH y concentración de DSDA simultánea ...	26
4.2.2. Incorporación de Fe en las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN).....	28
4.2.3. Recubrimiento de las MSN con glucosa.....	32
4.3. Liberación controlada del fármaco en medio simulado	34
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	38
Anexo	41

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

Figura 1. Comparativa de perfiles de liberación en sistemas convencionales y controlados. Fuente: (Ortiz., 2017).....	4
Figura 2. Curvas típicas en plasma resultantes del empleo de: pastilla convencional “A”, preparación de liberación lenta “B” y sistema de liberación transdermal “C”. Fuente: (Sáez et al., 2003).	4
Figura 3. Representación de diferentes tipos de materiales de sílice mesoporosa. Fuente: (Narayan et al., 2018).	6
Figura 4. Estructura del fármaco L-Arginina.	8
Figura 5. Imagen TEM de las FeNPs obtenidas a partir de la síntesis de coprecipitación.	9
Figura 6. Tipos de estrategias de modificación de las MSN.	10
Figura 7. Tipos de isotermas por la IUPAC; adsorción (izquierda) y ciclos histéresis (derecha). Fuente: (Sing et al., 1985).	17
Figura 8. Estructura del DSDA formado a partir de la L-Arginina y el ácido oleico.....	19
Figura 9. Espectro del ¹ H-RMN del DSDA a partir de L-Arginina y oleico.	20
Figura 10. Imágenes TEM del material sintetizado de referencia.	21
Figura 11. Isotherma de adsorción-desorción de N ₂ del material sintetizado de referencia.	22
Figura 12. Imágenes TEM de los materiales sintetizados con cambio de pH desde a)-c) para pH 8, d)-f) para pH 9 y g)-i) para pH 9,5.	23
Figura 13. TGA de los materiales sintetizados con cambio de pH.	24
Figura 14. Imágenes TEM de los materiales sintetizados con variación en la concentración desde a)-c) para Arg-0,7 y desde d)-f) para Arg-0,5.....	25
Figura 15. Imágenes TEM de los materiales con variación simultánea de pH y concentración de a) y b) para Arg-0,7-9,5 y c) y d) para Arg-0,5-9,5.....	26
Figura 16. Espectros de difracción de rayos X de los principales materiales sintetizados.	27
Figura 17. Isotherma de adsorción-desorción de N ₂ de los materiales óptimos.....	28
Figura 18. Imágenes TEM de los materiales de referencia de a) y c) con análisis elemental de una partícula de la imagen a) mediante detector rayos X.	29
Figura 19. Imágenes TEM de los materiales con cambio de pH y concentración simultánea de 0,7 de a) y c) con análisis elemental de una partícula de la imagen c) mediante detector rayos X.	29
Figura 20. Imágenes TEM de los materiales con cambio de pH y concentración simultánea de 0,5 de a)- c) con análisis elemental de una partícula de la imagen b) mediante detector rayos X.	30
Figura 21. TGA de los materiales óptimos sintetizados.	30

Figura 22. Espectros de difracción de rayos X de los materiales con incorporación de Fe.	31
Figura 23. TGA de los materiales sin y con anclaje de glucosa.....	33
Figura 24. Espectros de FTIR de los materiales sintetizados y anclados con glucosa...	34
Figura 25. Curvas de liberación de la L-Arginina para cada material sintetizado en medio simulado.	35
Figura 26. Concentración micelar crítica del DSDA de L-Arginina.....	42
Figura 27. Espectros de difracción de rayos X de la magnetita sintetizada a través de coprecipitación.....	42
Figura 28. TGA de de la magnetita sintetizada a través de coprecipitación.	42
Figura 29. TGA de los materiales de referencia (superior-izquierda), con cambio de concentración (superior-derecha) y con variación pH y concentración DSDA (inferior).	43
Figura 30. Espectros de difracción de rayos X de los materiales con cambio de pH (derecha) y con variación de la concentración (izquierda).....	43
Figura 31. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ , pH 8 (superior-izquierda), pH 9 (superior-derecha) y pH 9,5 (inferior).	44
Figura 32. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ , Arg 0,7 (izquierda) y Arg 0,5 (derecha).	44
Figura 33. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ , Arg-ref-Fe (superior), Arg 0,7-9,5-Fe (izquierda) y Arg 0,5-9,5-Fe (derecha).....	45

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los materiales sintetizados y las condiciones de síntesis.	12
Tabla 2. Propiedades texturales de los materiales sintetizados con cambio de pH.	24
Tabla 3. Propiedades texturales de los materiales sintetizados con variación en la concentración.....	25
Tabla 4. Propiedades texturales de los materiales óptimos.	28
Tabla 5. Control de pH en las etapas de síntesis de las MSN.....	31
Tabla 6. Resultados del análisis de glucosa anclada en los principales materiales sintetizados.	32
Tabla 7. Resultados de los parámetros de la cinética de liberación de los materiales probados.	34
Tabla 8. Rendimientos de DSDA y materiales sintetizados.....	41
Tabla 9. Control de pH durante las etapas de síntesis de las MSN.	41

Resumen

En la actualidad, en el campo de la biomedicina los sistemas de liberación controlada de fármacos toman un papel más importante respecto a aquellos tradicionalmente usados. Estos nuevos sistemas de administración presentan ventajas significativas tales como el poder ser dirigidos hacia áreas específicas del cuerpo, lo que se traduce, en una liberación controlada del fármaco durante un cierto periodo de tiempo, permitiendo además realizarles modificaciones para de esta forma ampliar sus aplicaciones. A esto se añade que el constante desarrollo de nuevos sistemas de liberación lo convierte en un tema de continuo interés e investigación. Dentro de estos novedosos sistemas, la línea con mayor éxito son los que aplican *nanocarriers* o materiales de sílice mesoestructurados, debido a su capacidad para contener grandes cantidades de fármacos, cuyo origen reside en sus estructuras porosas ordenadas y tamaños homogéneos. En relación con este último punto, el presente trabajo tiene por objeto el estudio de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) con propiedades magnéticas y recubrimientos de glucosa. Las síntesis de MSN se obtuvieron a partir de agentes directores de estructuras con actividades farmacológicas (DSDA) a través del método que se conoce como *templating*. Por otro lado, las propiedades magnéticas se han alcanzado mediante la incorporación de nanopartículas de hierro de fase magnetita (FeNP) en las primeras etapas de síntesis.

La síntesis del agente director de estructura con actividad farmacológica (DSDA), se llevó a cabo a partir de la modificación del fármaco L-Arginina mediante reacción de trans-amidación con las cadenas hidrófobas del cloruro de oleilo (C-18). El fármaco L-Arginina se ha formulado como un fármaco novedoso para usos odontológicos y como antibacteriano para diversas aplicaciones.

La optimización de la síntesis de las nanopartículas de sílice mesoestructuradas (MSN) se ha llevado a cabo a través del estudio de las variables de síntesis más significativas, como son el pH y la concentración de DSDA. Se obtuvieron MSN con un ordenamiento interno tipo “*onion like*” y “*hollow shell*” para los materiales sintetizados en las condiciones de referencia, con una morfología esférica y tamaños comprendidos entre 200-500 nm. En lo referido a las propiedades texturales, se obtuvieron superficies específicas alrededor de 340 m²/g, volúmenes de poro de 0,35 cm³/g y tamaños de poro

de 26 Å. La optimización de las variables de síntesis llevó a obtener nanopartículas más homogéneas con estructuras tipo “*onion like*”. Estos materiales, sin embargo, mostraron propiedades texturales similares a las obtenidas con las condiciones de referencia, con superficies específicas de 370 m²/g, volúmenes de poro de 0,29 cm³/g y tamaños de poro de 30 Å.

La incorporación de los núcleos de hierro sintetizados a través del método de coprecipitación y estabilización con ácido butírico, modificaron el ordenamiento interno y las propiedades texturales de los materiales, sin embargo, no se vieron afectados ni el tamaño ni la morfología de estos. Se alcanzaron incorporaciones de Fe entre el 5-7% en peso medido mediante ICP. Por otra parte, en cuanto a los recubrimientos de las MSN con glucosa, se consiguieron de manera efectiva, alcanzando incorporaciones entre el 0,5-1% en masa, lo que permite mejorar las internalizaciones de las MSN a nivel celular, así como utilizar las nanopartículas magnéticas en terapias basadas en la formación de radicales libres, estudiados actualmente como terapias contra el cáncer.

Por último, con los ensayos de liberación del fármaco L-Arginina en medio corporal simulado, se obtuvieron cinéticas de liberación de orden uno, liberando el fármaco de forma lenta y controlada, en un tiempo comprendido entre 25-30 días. Además, los resultados obtenidos indican que los materiales sintetizados tendrían potencial aplicación en tratamientos terapéuticos que requieran tiempos de liberación prolongadas, como por ejemplo en tratamientos de enfermedades crónicas.

1. Introducción

1.1. Liberación controlada de fármacos

La administración de fármacos por las vías convencionales presenta desventajas ligadas a que éstos se distribuyen en el organismo según las propiedades físicas que posean, ya sea debido a su solubilidad, a la carga que presentan o incluso al coeficiente de partición, por lo que los fármacos pueden alcanzar órganos donde su rango terapéutico no sea válido, que su acción sea dañina o que sean inactivos, lo que puede ocasionar efectos secundarios. En los sistemas tradicionales de liberación de fármacos de uso terapéutico los niveles de principio activo que se suministran aumentan de manera elevada y rápida hasta alcanzar su concentración plasmática para luego reducirse de manera exponencial a medida que el fármaco en sí es expulsado del organismo o se ha metabolizado, por lo que no permiten controlar la velocidad. La manera de poder mantener el nivel de fármaco adecuado durante un tiempo que sea prolongado es administrar de forma frecuente y aumentando la dosis, lo que hace que tenga un gran peligro de poder generar efectos tóxicos.

Los sistemas de liberación controlada de fármacos intentan resolver este problema, mejorando el control, la eficacia, y, especialmente la reducción tanto de riesgos que puedan existir como lo efectos secundarios que se produjeran sobre el organismo. Los sistemas de liberación de fármacos han mostrado ser una alternativa bastante prometedora de cara al futuro en comparación con los métodos tradicionales (*Davoodi et al., 2018; Ding et al., 2017*).

Son tres las ventajas principales que se destacan por encima de todo en estos sistemas, siendo: la dosificación del principio activo, el poder mantener los valores de concentración en un intervalo óptimo (*Figura 1*) y el control espacial para poder administrar el fármaco en el punto donde interesa que actúe (*Vallet-Regi, 2006*). No obstante, estos sistemas además aportan beneficios en cuanto a efectos secundarios, protección a ataques de enzimas o la propia degradación ácida en consecuencia del pH local (*Manzano et al., 2009*).

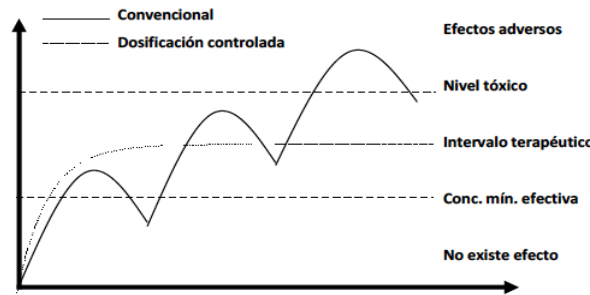


Figura 1. Comparativa de perfiles de liberación en sistemas convencionales y controlados. Fuente: (Ortiz., 2017).

En la actualidad se utilizan varios métodos de liberación para poder mejorar el efecto de los fármacos (Sáez et al., 2003)., siendo:

1. **Liberación controlada**: trata de eliminar y poder disminuir los efectos secundarios manteniendo de esta forma una concentración de fármaco que pueda ser estable dentro del organismo. Para ello se intenta conseguir una cinética de liberación de orden cero.
2. **Liberación dirigida hacia lugares específicos**: se intenta asegurar que el fármaco que se libera lo haga en el lugar requerido, al mismo tiempo que se mantiene el fármaco inactivo en cualquier otra zona donde no deba actuar.

En la **Figura 2** se muestra la evolución de la concentración usando para ello diferentes sistemas de liberación controlada.

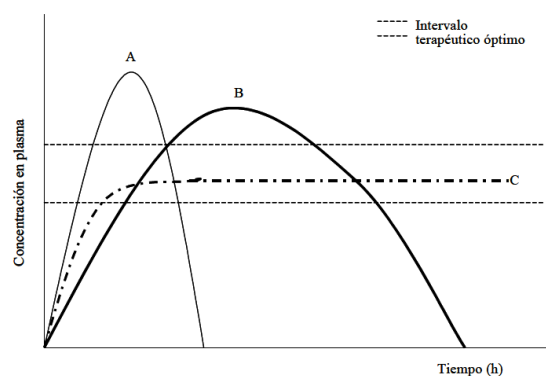


Figura 2. Curvas típicas en plasma resultantes del empleo de: pastilla convencional “A”, preparación de liberación lenta “B” y sistema de liberación transdermal “C”. Fuente: (Sáez et al., 2003).

Asimismo, los sistemas basados en la liberación controlada de fármacos van encaminados a intentar que sea activo el fármaco únicamente en el área donde se requiera. Paralelamente se está investigando los sistemas estímulo-respuesta, este sistema conlleva

darle un punto de vista totalmente diferente a lo tradicional en lo que a administración de fármacos se refiere, ya que, para el caso de los sistemas estímulo-respuesta, a pesar de que el fármaco se encuentra en el organismo, solo se libera cuando se requiere, suponiendo esto una gran ventaja. Adicionalmente, se están estudiando los mecanismos que puedan regular y dar la viabilidad necesaria para de esta forma tener un control preciso con el uso de este tipo de sistemas (*Keservani et al., 2016*). Este tipo de sistemas son de gran importancia en enfermedades como el cáncer, que requieren un tratamiento bastante agresivo que afecta en la mayoría de los casos al resto del organismo. Por lo que, consiguiendo el objetivo de que el fármaco sólo sea activo en la zona necesitada evitaríamos unos efectos secundarios bastante importantes.

Es importante destacar que, dentro de los sistemas de liberación controlada de fármacos el desarrollo de los nanocarriers ha tomado una importante relevancia. Los nanocarriers son nanomateriales que se utilizan como vehículos de transporte de sustancias, en este caso, de fármacos. Dentro de las cuales las principales ventajas que se presentan es poder mantener la concentración del principio activo, además de tener una gran relación superficie/volumen, permitiendo esto tener una mayor área de contacto entre lo que sería el fármaco y el organismo, haciendo de esta manera que se requiera una dosis menor para obtener el mismo resultado, ayudando a disminuir los efectos tóxicos y secundarios (*Ding et al., 2017*). Por otro lado, en los nanocarriers se puede funcionalizar la superficie para que se dirijan a células donde se necesite realizar el tratamiento terapéutico, esto tiene mayor importancia aún en tratamiento de tumores (*Hossen et al., 2019*).

1.2. Nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)

No es hasta principios de los años 90 donde se aumenta el interés por poder inmovilizar las especies biológicamente activas en soportes sólidos debido a la necesidad de estabilizar las especies para su posterior uso en la industria de la biotecnología. Y es a partir de esa época donde comenzaron a desarrollarse un gran número de técnicas que permitieran esa inmovilización, como puede ser la encapsulación, la adsorción física o la unión covalente (*Moritz y Geszke-Moritz., 2015; Mamaeva et al., 2013*).

Es por ello, por lo que en la actualidad la línea más desarrollada para conseguir dicho objetivo es utilizar las nanopartículas mesoestructuradas de sílice (*MSN*) para la inmovilización de fármacos.

Además, las estructuras de sílice mesoporosas se caracterizan por su biocompatibilidad testada (*Simovic et al., 2011; Nieto et al., 2009*) y porque además estas pueden modificarse fácilmente con diferentes funcionalidades, permitiendo de este modo un control preciso de la química de superficie para modificar la actividad química, hidrofobia o hidrofilia, la carga de fármaco, conseguir una liberación sostenida y focalización específica del sitio (*Yanagisawa et al., 1990; Kresge et al., 1992; Beck et al., 1992; Karge et al., 2002*). De acuerdo con la clasificación *IUPAC*, los materiales mesoporosos son aquellos con un diámetro comprendido entre 2-50 nm y la de nanopartícula sería la de aquella partícula que posea al menos una dimensión comprendida entre 1-100 nm (*Alothman., 2012*). No fue hasta principios de la década de los noventa (1992) cuando un grupo de científicos de la empresa “*Mobil Oil Company*” (*Kresge., 1992*) presentaron los primeros materiales silíceos mesoestructurados, a los cuales denominaron como materiales *MCM-41*. Las primeras aplicaciones de estos materiales se enfocaron en mayor medida hacia la catálisis, adsorción e intercambio iónico. Asimismo, a medida que se profundizó en el estudio de estos materiales se empezaron a desarrollar más, tales como: *MSU* (1995), *KIT-1* (1997), *SBA-15* (1998) o *MCF* (1999) (*Moritz., 2012*). En la *Figura 3* se puede ver a modo de ejemplo la representación de diferentes tipos de MSN, entre las que se incluyen algunas de las anteriormente nombradas.

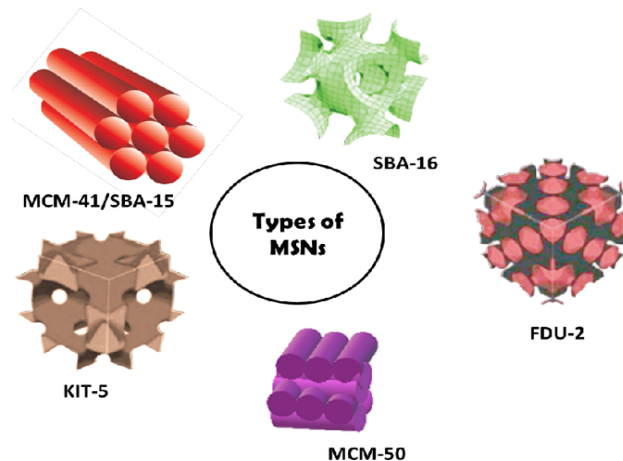


Figura 3. Representación de diferentes tipos de materiales de sílice mesoporosa. Fuente: (Narayan et al., 2018).

En el 2000, Vallet-Regi et al. presentan de manera novedosa y por primera vez la aplicación de MSN para la liberación de fármacos con aplicación terapéutica (*Vallet-Regi et al., 2000*). A raíz de este estudio, en las últimas dos décadas se ha producido un desarrollo importante en el estudio de los materiales mesoestructurados de sílice debido: a la forma que presentan, su distribución de tamaño de poro (alta superficie y volumen),

su conectividad, su capacidad de adaptar materiales con diferentes morfologías (esferas, tubos, cilindros) y propiedades químicas superficiales modulables mediante la incorporación de una gran variedad de heteroátomos o grupos funcionales (Ti, Al, AlCl_3 , BF_3 y funcionalidades de tipo tiol, amino o ciano (*Monnier., 1993*)).

En lo que respecta a la síntesis de los materiales silíceos mesoestructurados, estos requieren de la presencia en el medio de reacción de un precursor de óxido de silicio, de un surfactante o tensioactivo y de un disolvente. Los surfactantes ejercen como agentes directores (templates) de las estructuras para de esta manera, poder formar los mesoporos. Además, dependiendo de la naturaleza de los surfactantes que se use cambia el mecanismo de formación y las estructuras obtenidas. Los surfactantes más usados son el CTAB para las síntesis de MCM-41 y el Pluronic, para la síntesis de SBA-15. Sin embargo, se han observado una serie de desventajas que hacen que este método tenga algunos problemas, dentro de los cuales se encuentra una síntesis con una alta complejidad como son: la eliminación de surfactante, tener que funcionalizar el MSN para incorporar el fármaco, la calcinación, entre otros.

Con el objetivo de mejorar la problemática mencionada anteriormente se desarrolló una nueva metodología de síntesis consistente en diseñar surfactantes que contengan un fármaco en su estructura y además sean capaces de dirigir la estructura del material a sintetizar (*Morales et al., 2016*). En esta metodología de síntesis está basada este Trabajo Fin de Máster, en el que se usará la L-Arginina como fármaco. Esta alternativa se basa en poder modificar el fármaco con cadenas hidrófobas para de este modo transformarlo en un surfactante con capacidad de formar micelas denominadas “Drug Structure Directing Agent” (DSDA). Esto permite omitir la etapa final que consiste en tener que eliminar el surfactante a través de calcinación e incorporar posteriormente el fármaco.

Los DSDA se obtienen mediante reacción entre el fármaco de interés con ácidos grasos, permitiendo formar micelas alrededor de las que se ordena la parte inorgánica de silicio, dando lugar de esta manera el MSN. El fármaco con mayor desarrollo en la actualidad como DSDA es el aminoácido esencial triptófano. Este tipo de fármaco es usado en su mayor medida para tratamientos asociados a depresión, insomnio, estrés, trastornos menstruales (*Aronson., 2016*).

El fármaco que se utilizará en el presente Trabajo Fin de Máster para incorporarlo en el DSDA será la L-Arginina, mostrado en la *Figura 4*. La L-Arginina es uno de los veinte aminoácidos que forman parte de las proteínas, se usa comúnmente como aditivo en las industrias de biotecnología y farmacéutica. (*Shah y Shaikh., 2016*). No obstante, se utiliza para la recuperación tras una cirugía, ya que posee características de cicatrización excelentes. Además, también es usada en complicaciones de embarazo ocasionadas por un incremento de la presión arterial, afecciones cardíacas y de vasos sanguíneos, entre otros (*Wada et al., 2018; McNeal et al., 2018*). Aunque el uso más destacado y conocido en el cual se desarrolla cada día más es en el campo de la odontología, principalmente, la L-Arginina permite ayudar contra la lucha de placa dental, caries y enfermedades periodontales.

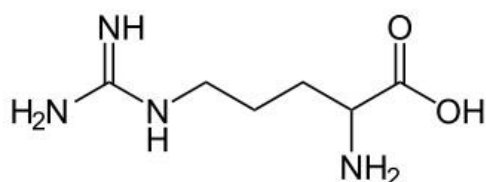


Figura 4. Estructura del fármaco L-Arginina.

1.3. Aplicación de las nanopartículas de óxido de hierro magnéticas en MSN

El uso de las nanopartículas de óxido de hierro magnéticas, conocidas también como FeNP, ha despertado un creciente interés en su uso en el campo de la biomedicina, ya que en multitud de ocasiones poder incorporar estas nanopartículas ha permitido, en la aplicación de liberación de fármacos, poder dirigir el material hacia la zona donde se requiera el uso del fármaco. Aunque esa no es su única aplicación, ya que en la actualidad se usa para la imagen a través de resonancia magnética, la regeneración de los tejidos e incluso se ha visto sus buenos resultados en el tratamiento de cáncer a través de hipertermia. Además, una de las razones por la cual se les dará importancia a las aplicaciones de estas nanopartículas de hierro es que su incorporación permite poder fomentar la generación de radicales libres en su interior, que, en combinación con un recubrimiento de glucosa y con las propiedades catalíticas del hierro, produciría una reacción de tipo Fenton, ocasionando de este modo la muerte celular. Según sean las condiciones que se establezcan durante la síntesis, las FeNP están compuestas por magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), con unos tamaños que están en un intervalo de 5-100 nm, en donde a su vez por debajo de los 20 nm se puede ver propiedades superparamagnéticas (*Elrahman y Mansour., 2019*). En la *Figura 5* muestra una imagen

de microscopía SEM de nanopartículas de magnetita a partir de la síntesis por coprecipitación realizada en este TFM.

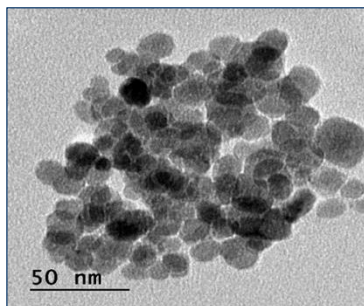


Figura 5. Imagen TEM de las FeNPs obtenidas a partir de la síntesis de coprecipitación.

A pesar de ser este el método más eficiente para generar FeNP, las partículas obtenidas tras la síntesis no pueden ser incorporadas directamente en las MSN. Esto se debe principalmente a que su superficie es hidrófila, por lo que no se produce la mezcla con el surfactante, sino que se forma una fase aislada, a causa de interacciones electrostáticas (Amstad *et al.*, 2011). Es por eso por lo que es necesario realizar una estabilización, usando para ello compuestos que sean hidrófobos (ácidos grasos, fosfatos, polietilenglicol, entre otros). No obstante, para el desarrollo de esta investigación se ha optado por estabilizar las FeNP vía ácido butírico. Esto se debe principalmente a que el ácido butírico posee una cadena de extensión corta, permitiendo de este modo la incorporación en el interior de las MSN en comparación a diferentes ácidos grasos como el oleico.

Las FeNP juegan un papel fundamental en la liberación de fármacos en MSN ya que permiten el dirigirlas hacia las células objetivo, en donde a su vez, se ha comprobado la biocompatibilidad y demostrado que los tejidos no se vean afectados por los campos magnéticos y ni presentan daños o efectos nocivos sobre las células (Lee *et al.*, 2015). Además, se ha podido estudiar que usar estas nanopartículas hacen que se incorporen en el ciclo metabólico natural del hierro, aunque cabe decir que por encima del valor de 300 nm estas pueden quedar obstruidas y atrapadas en los pulmones e incluso hígado (Kim *et al.*, 2017; Soenen *et al.*, 2011).

1.4. Estrategias de modificación de las MSN

Otros de los grandes retos y en donde se focaliza una parte importante del desarrollo de las MSN es la de poder aprovechar la superficie de estas, pudiendo otorgarle una función que favorezca al tratamiento terapéutico para el cual se usen a través de

modificaciones superficiales. Es por ello por lo que en función del tipo de modificación que se les realiza se pueden distinguir diferentes tipos de estrategias siendo (Hoang et al., 2019) mostradas en la *Figura 6*:

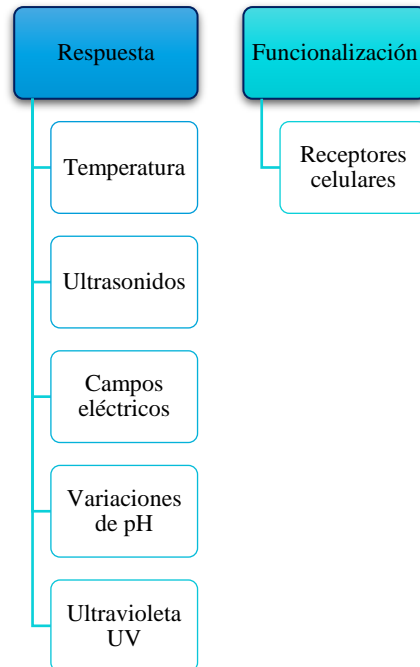


Figura 6. Tipos de estrategias de modificación de las MSN.

Este TFM se centrará en usar la estrategia de funcionalizar con receptores celulares, la cual consiste en realizar un anclaje a las MSN de ligandos que sean identificados por las células diana, permitiendo de este modo poder ayudar a la fagocitosis selectiva de las células. Se pueden usar ADN o ARN, glucosa e inclusive se está desarrollando el uso de la glucosa oxidasa. Poder realizar la funcionalización con glucosa, a través del anclaje a las MSN, permiten beneficiar a la endocitosis en las células de tipo cancerígenas. Para este caso, Niemelä et al., (Niemelä et al., 2015), demostraron la eficacia de realizar un recubrimiento de glucosa en MSN, las cuales poseían el fármaco celastrol sobre células cancerígenas. En cuanto al mecanismo de funcionalización, este se basa en la formación de un enlace tipo amida entre los grupos amino presentes en la superficie de las MSN, provenientes del aminosilano, y el ácido D-glucurónico, mediante una activación de grupos ácido vía hezafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil uronio (HATU).

2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es conseguir realizar la optimización de la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) utilizando como agente director de estructura un derivado del fármaco L-Arginina. Además, se incorporarán núcleos de magnetita para otorgarle propiedades magnéticas, así como también un recubrimiento con glucosa con el objetivo de aumentar su internalización a nivel celular.

A modo resumen, a lo largo de esta investigación se pretende alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis y caracterización del DSDA derivado de L-Arginina.
- Síntesis de nanopartículas magnéticas mediante coprecipitación y posterior hidrofobización.
- Síntesis y caracterización de nanopartículas de sílice mesoestructuradas (MSN) mediante síntesis sol-gel.
- Optimización de las condiciones de síntesis de las MSN.
- Incorporación de núcleos magnéticos en las MSN.
- Recubrimiento superficial de las MSN con glucosa.
- Estudio de la liberación controlada del fármaco en un medio corporal simulado.

3. Metodología

A lo largo del desarrollo de este capítulo se explica la metodología usada en la síntesis de los materiales sintetizados durante la investigación, así como también la incorporación tanto de la glucosa y la liberación en medio simulado del fármaco. Seguido de una descripción de las técnicas de caracterización y equipos utilizados.

3.1 Síntesis de los materiales MSN

3.1.1. Materiales sintetizados

A continuación, se muestra en la *Tabla 1* un resumen de los materiales sintetizados, así como las condiciones a las cuales se realizaron las respectivas síntesis.

Tabla 1. Resumen de los materiales sintetizados y las condiciones de síntesis.

Muestra	pH inicial	DSDA (eq)	APTES (eq)	TEOS (eq)	Fe ₃ O ₄ (eq)	H ₂ O (eq)
Arg-ref	10	1	1,22	11,8	-	2000
Arg-pH 9,5	9,5	1	1,22	11,8	-	2000
Arg-pH 9	9	1	1,22	11,8	-	2000
Arg-pH 8	8	1	1,22	11,8	-	2000
Arg-0,7	10	0,7	1,22	8,05	-	2000
Arg-0,5	10	0,5	1,22	5,90	-	2000
Arg-0,7-9,5	9,5	0,7	1,22	8,05	-	2000
Arg-0,5-9,5	9,5	0,5	1,22	5,90	-	2000
Arg-ref-Fe	10	1	1,22	11,8	0,65	2000
Arg-0,7-9,5-Fe	9,5	0,7	1,22	8,05	0,46	2000
Arg-0,5-9,5-Fe	9,5	0,5	1,22	5,90	0,33	2000
Arg-0,7-9,5-Glu	9,5	0,7	1,22	8,05	-	2000
Arg-0,5-9,5-Glu	9,5	0,5	1,22	5,90	-	2000
Arg-0,7-9,5-Fe-Glu	9,5	0,7	1,22	8,05	-	2000

Además, los rendimientos obtenidos de las síntesis de los materiales se encuentran recogidos en la *Tabla 8* del *Anexo*.

3.1.2. Síntesis del surfactante con actividad farmacológica

La síntesis del DSDA se desarrolla a una temperatura de 0°C, esto se debe a que la reacción posee una alta exotermicidad. En primer lugar, en un matraz de fondo redondo de una boca de 50 mL con agitación se disuelven 1,5 g de L-Arginina, añadiéndole 7 mL de H₂O destilada y 4 mL de acetona de síntesis. Es importante ir controlando el pH, se añade en este punto 3 mL del cloruro de oleoil gota a gota, nuevamente el pH vuelve a

bajar y para asegurar la reacción se añade NaOH 7,5 M de manera lenta, es en este punto donde se produce una rápida precipitación y se forma una bola de aspecto chicloso. Después de ello, se retira la agitación y se deja toda la noche reaccionar.

Al día siguiente se baja el pH a 5-6 para solubilizar la L-Arginina no reaccionada, usando ácido clorhídrico (HCl 37%). Por último, se procede a la filtración y secado a vacío a 40°C durante dos días.

3.1.3. Síntesis de las nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 -NPs)

La síntesis de las nanopartículas de hierro magnéticas se produce mediante coprecipitación a partir de cloruro férrico y ferroso con una relación molar 1:2, en medio básico y a una temperatura de 80°C. Para ello, en una atmósfera inerte (N_2), en un matraz de fondo redondo de 100 mL de dos bocas con agitación de pala se disuelven las cantidades de los compuestos $FeCl_3$ y $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$, siendo 2,433 y 5,981 g respectivamente y se añaden 50 mL de H_2O . Posteriormente, se añaden 20 mL de NH_4OH de manera lenta y se sube la agitación, se deja durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se quita la agitación y se pone en reflujo con N_2 toda la noche.

En cuanto a la purificación, se realiza a través de precipitación con un imán externo en un vaso de precipitado, para el posterior lavado con etanol y acetona. Por último, se filtra a vacío y se termina de secar a vacío durante 1 día.

3.1.4. Estabilización Fe_3O_4 NPs con ácido butírico

En lo que a la estabilización con ácido butírico se refiere, se lleva a cabo mediante el anclaje del compuesto a través de enlaces covalentes a la superficie de las FeNP. Primero, se deben machacar las partículas en un mortero, obteniendo unas partículas más pequeñas y homogéneas, seguidamente, se pesan 600 mg de MSN, 0,480 mg de ácido butírico y se añade 3 mL de NH_4OH (28-30%) en un recipiente de teflón con 80 mL de etanol. Todo ello se lleva a cabo en un baño de ultrasonidos a una temperatura de 80°C y durante 2 horas para finalmente lavar con etanol y acto seguido dejar secando en el desecador a vacío durante un día.

3.1.5. Síntesis de las nanopartículas mesoporosas silíceas (MSN)

La síntesis de las MSN a partir del DSDA se realizó siguiendo la metodología desarrollada por Morales et al., (*Morales et al., 2016*). Se comienza dispersando bajo agitación un día antes de realizar la síntesis y a 90°C, la cantidad de DSDA requerida en botes de cristales de síntesis, la cantidad de DSDA varía en función de la concentración a la que queramos obtener las MSN, siendo estas cantidades de 306, 428 o 618 mg, ya que hemos probado con tres concentraciones: referencia 0,5:2000, 0,7:2000 y 1:2000 relación en equivalentes de DSDA: H₂O. Cuando se ha dispersado, aproximadamente tras 12 horas, se baja la temperatura a 60°C para la realizar la síntesis, dependiendo de si la síntesis conlleva la incorporación de hierro o no, los protocolos serían:

MSN sin Fe:

- Para la obtención de las MSN sin hierro, tras la etapa previa de síntesis explicada anteriormente y a una temperatura de 60°C, se añade el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) que dependiendo de la concentración a la que queramos el material varía (0,2, 0,28 y 0,4 mL). Se esperan 5 minutos, para a posterior añadir el tetraetilortosilicato (TEOS) de manera lenta, es decir, gota a gota, y del mismo modo que con anterioridad, la cantidad de TEOS varía en función de la concentración, siendo de 3,7, 1,8 y 2,6 mL, por último, se esperan 10 minutos.

MSN con Fe:

- Para la obtención de MSN con hierro, al igual que antes, tras la etapa previa de síntesis y a 60°C, se pesa la cantidad de Fe a incorporar, que varía en cantidades de: 190, 95 y 133 mg dependiendo de la concentración de DSDA. Es importante quitar el imán del bote para poder añadir las partículas de Fe (previamente se machacan las partículas en el mortero para que estén finas al igual que se hace para las MSN). Más adelante, se lleva a ultrasonidos durante 10 minutos aproximadamente para que se agite bien, para ello, poner un agitador de pala a 200 rpm.

Tras la síntesis, se deja en reposo durante 24 horas sin agitación y a temperatura de 60°C, posteriormente se eleva la temperatura hasta 100°C y se deja reaccionar durante 72 horas. Por último, se debe realizar el lavado con agua y etanol y se deja secando a vacío durante 1-2 días.

3.1.6. Incorporación de la glucosa a las MSN

El recubrimiento con glucosa de las MSN por anclaje directo se realiza mediante la activación de ácido glucurónico vía HATU. Para ello, en un matraz de bola con dos salidas se añade 150 mg de MSN y se pone en una columna de reflujo con N₂ y H₂O, se añade posteriormente 10 mL de dimetilformamida (DMF).

Paralelamente, en otro matraz aparte se añaden 50 mg de ácido glucurónico y 95 mg de HATU, además de poner 10 mL de DMF y se deja borboteando en atmósfera inerte N₂ durante 10 minutos, pasado ese tiempo se añade 0,90 mL de DIPEA y se esperan otros 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se adiciona al matraz con las MSN. Se deja toda la noche reaccionando en agitación, con el reflujo de N₂ y H₂O y a temperatura ambiente. Al día siguiente se filtran y lavan con agua y etanol, para después dejarlos secando a vacío durante un día.

3.1.7. Liberación controlada del fármaco en medio simulado

El medio en el cual se realiza la simulación se trata de un medio corporal simulado con el pH controlado. El material MSN se confina en membranas poliméricas para evitar que durante la liberación salgan estas nanopartículas al medio simulado produciéndose así la pérdida de la muestra. La longitud medida de cada membrana es de aproximadamente 15 cm. Dichas membranas se meten en una disolución que se encuentra al 50% en volumen de H₂O y etanol. Todo ello se deja en agitación con una temperatura de 40°C y un tiempo de 1 hora, una vez pasado ese tiempo, se quita la disolución y se repite lo anteriormente descrito dos veces más. Finalmente, las membranas deben quedar introducidas en el medio donde se realiza la simulación durante 24 horas, en agitación y a temperatura ambiente.

La liberación comienza depositando, sobre una membrana ya preparada, una cantidad de 50 mg de la MSN a estudiar. Cerrando los extremos con pinzas y sumergiendo finalmente todo en el medio simulado, que tiene un volumen de 150 mL. En lo referido a las condiciones sobre las que se realiza la liberación del fármaco, se tiene en agitación lenta y a una temperatura de 37°C.

3.2 Técnica de caracterización utilizadas

3.2.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en estudiar un sistema de espines nucleares en presencia de un campo magnético estático, capaz de absorber energía de radiofrecuencia (RF) cuando se irradia con una fuente, el núcleo estudiado en esta investigación es el protón ^1H -RMN. El análisis de los núcleos permite poder reconocer grupos funcionales y analizar la estructura química de los compuestos orgánicos.

Se ha empleado el equipo *Varian Mercury AS400*, con campo magnético de 9,4 T, sonda de 4NUC (5mm). El análisis se ha realizado utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CHCl_3) con una frecuencia de 400 MHz, secuencia de 1 pulso sencillo, 16 acumulaciones y un tiempo de relajación de 1 segundo.

3.2.2. Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica experimental para el estudio y análisis de materiales, basada en el fenómeno de difracción de los rayos X a través de los sólidos en estado cristalino. La presencia de cualquier tipo de mesoestructura interna ordenada en las MSN pueden observarse haciendo uso del DRX, no obstante, en ocasiones no es posible que la muestra difracte por la presencia de restos de reacción o surfactante que se encuentre en el exterior.

Los espectros de rayos X se han obtenido a través del equipo *Phillips Xpert* a 40 mA y 450 kV, con un paso de $0,03^\circ$ y un tiempo de acumulación de 5 segundos. Los barridos de ángulos se realizaron entre $0,5$ y 10° , ya que las MSN suelen mostrar el pico característico entorno a 2° .

3.2.3. Adsorción y desorción de nitrógeno N_2 (BET)

El método BET permite determinar la superficie de un sólido basándose en la adsorción-desorción de un gas inerte, normalmente N_2 a una baja temperatura. En nuestro caso se hace uso de esta técnica para poder saber las propiedades texturales que presentan las MSN, donde el tamaño de poro se calcula a partir del método NLDFT (Non Local Density Functional Theory). El equipo utilizado para esta técnica es *Micromeritics TriStar 3000*, el proceso consiste en pesar 100 mg de la muestra a analizar,

desgasificándola en atmósfera inerte a 200°C durante 4 horas, para acto seguido ir adsorbiendo presiones crecientes de nitrógeno hasta alcanzar presión de la saturación con un valor de $\frac{p}{p_0} = 0,95$. Los tipos de isothermas y ciclos de histéresis clasificadas por la IUPAC (Sing et al., 1985) se recogen en la **Figura 7**.

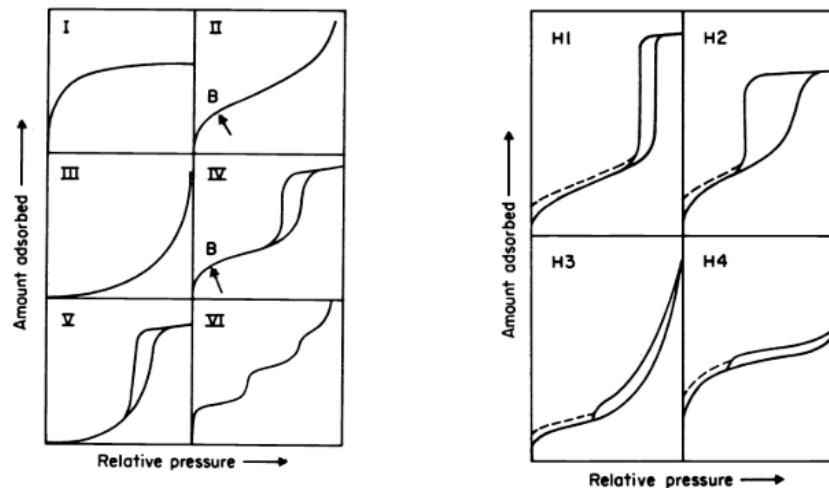


Figura 7. Tipos de isothermas por la IUPAC; adsorción (izquierda) y ciclos histéresis (derecha).
Fuente: (Sing et al., 1985).

3.2.4. Análisis termogravimétricos (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es un método que se basa en someter a una muestra a un análisis térmico en el cual la pérdida de masa se va midiendo a lo largo del tiempo, donde las especies pueden evaporarse, desorberse e incluso llegar a producirse la desorción. A través de esta técnica se puede obtener la cantidad orgánica presente en las MSN.

El equipo utilizado fue el *Mettler Toledo modelo 1 Star System*, con una temperatura comprendida entre 50°C-800°C y con una rampa de 5°C/minuto, todo ello bajo atmósfera de N₂.

3.2.5. Microscopía electrónica (TEM)

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) hace uso de un microscopio que emplea un haz de electrones para poder visualizar un material, pudiendo determinar el tamaño y morfología de este. En nuestro caso en partículas esta técnica fue usada para poder caracterizar las MSN sin y con Fe, pudiendo ver su ordenamiento.

Las imágenes fueron obtenidas a través del equipo *JEM 1400 PLUS* a 5.000, 10.000, 25.000 y 50.000 aumentos, con voltaje de aceleración de 200 kV.

3.2.6. Espectroscopía infrarroja (FTIR) y ultravioleta-visible (UV-vis)

Se tratan de técnicas basadas en la excitación de los estados de vibración en los que se encuentren los enlaces químicos al absorber la radiación, ya sea infrarroja o ultravioleta-visible.

Los espectros se han obtenidos haciendo uso del equipo *Varian Excalibur Series 3100*, con barrido en ATR desde 400 a 4000 cm^{-1} , 64 escaneos y resolución de 4 cm^{-1} para el caso de FTIR. En lo referido a UV-vis se hizo uso del equipo espectrofotómetros *Jasco V-630* para la medición de las absorbancias de la arginina durante la liberación, a 206 nm, y la de glucosa anclada a 430 nm.

3.2.7. Espectroscopía de plasma ICP-AES

La cantidad de hierro presente en los materiales sintetizados pueden determinarse al realizarle esta técnica, basada en que la absorción y emisión por parte de una muestra de la energía proveniente de una fuente caliente es proporcional a la cantidad de átomos que se encuentran en la muestra.

Previamente, se tiene que realizar un proceso de digestión de la muestra a analizar, a alta temperatura durante 30 minutos, tomando 100 mg de MSN y añadiendo 3 mL de H_2SO_4 y 10 mL de ácido fluorhídrico, una vez digerida se analiza con el equipo *Varian Vista AX Pro*. La parte correspondiente a la nebulización de la muestra con el equipo *U5000AT+*.

4. Resultados y discusión

En este capítulo se mostrarán los resultados sobre la caracterización de los surfactantes, síntesis de MSN y MSN magnéticas, recubrimiento con glucosa, así como la liberación del fármaco. Se comentarán y analizarán los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos. Por último, se destaca que en el *Anexo* se encuentran todas las caracterizaciones realizadas para cada material sintetizado no mostrado durante el capítulo.

4.1. Síntesis de surfactantes con actividad farmacológica

El agente director de estructura (DSDA) con incorporación de actividad farmacológica se ha sintetizado mediante la reacción de amidación entre la L-Arginina y el cloruro de oleoilo (C18), el resultado de ello se muestra en la *Figura 8*. Se observa que la molécula posee una zona polar, que es originada por la L-Arginina, y una cadena apolar, que proviene del ácido oleico.

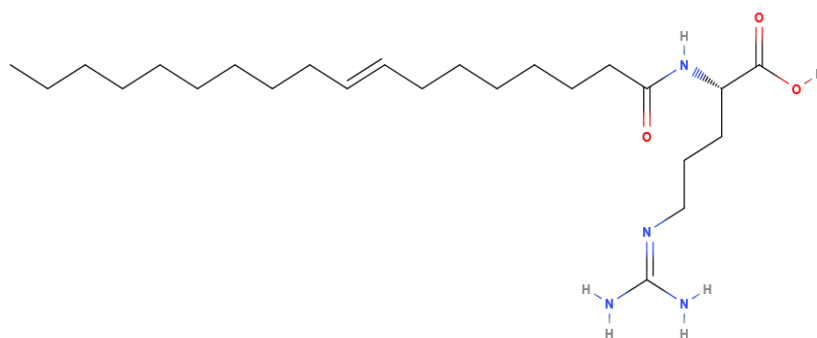


Figura 8. Estructura del DSDA formado a partir de la L-Arginina y el ácido oleico.

En la *Figura 9* se muestra el espectro de ^1H -RMN del DSDA. La parte comprendida entre 0 y 5,5 ppm corresponde a la zona desapantallada del espectro, en la que aparecen la totalidad de las señales de los protones de la molécula. Como aspectos más reseñables, cabe destacar la señal a 4,10 ppm, correspondiente al grupo $-\text{NH}$ del enlace peptídico, lo que muestra indudablemente la formación del compuesto. Junto a esta señal, y como se muestra en la zona aumentada, se observan otros tres singletes, correspondientes a los dos grupos $-\text{NH}$ de la cadena terminal de la L-Arginina y al grupo $-\text{OH}$ del ácido carboxílico. A 5,3 ppm se observan los protones de la insaturación, mientras que, por debajo de 2,5 ppm, se encuentran las señales del resto de protones de las cadenas alifáticas. Es evidente que, en esta zona, los protones más desapantallados corresponden a la cadena de arginina, puesto que están rodeados por diversos heteroátomos.

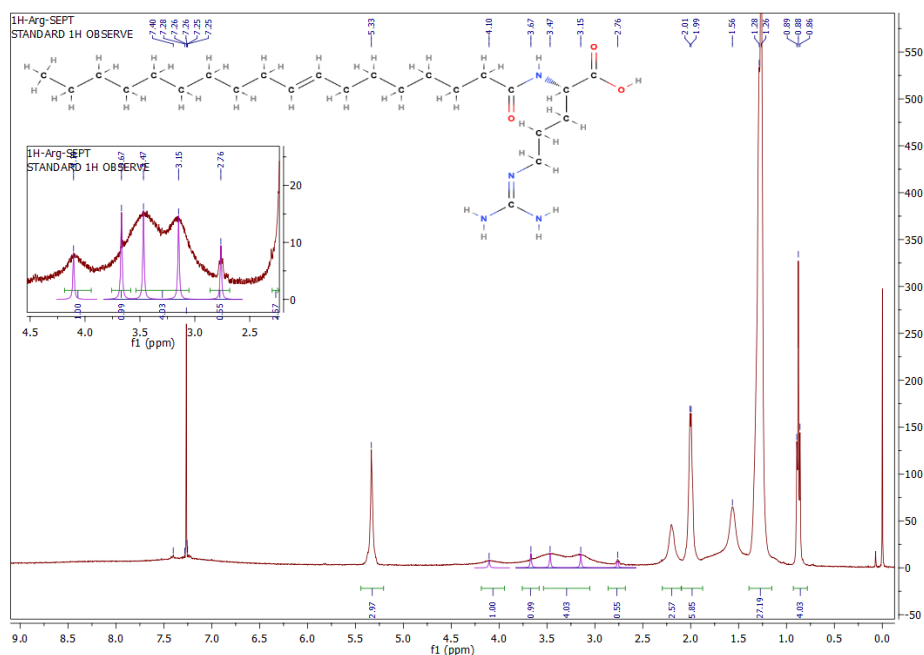


Figura 9. Espectro del ^1H -RMN del DSDA a partir de *L*-Arginina y oleico.

4.2. Nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)

Los valores de las concentraciones de surfactante DSDA utilizados durante las síntesis de los materiales fueron seleccionados teniendo en cuenta la concentración micelar crítica (CMC), concentración a partir la cual el surfactante forma estructuras micelares. Esta determinación se llevó a cabo por conductimetría, midiendo la conductividad de disoluciones con concentraciones crecientes de DSDA y viendo el punto donde se produce un cambio de pendiente, esto se puede ver reflejado en la [Figura 26 del Anexo](#). Donde, el valor obtenido de CMC es de 0,88 mg/mL. Esto indica que la concentración mínima para que el DSDA empiece a formar micelas es de 44 mg por cada 50 mL de agua. Corroborando de esta manera que la cantidad de surfactante utilizada en la síntesis de nanopartículas en condiciones de referencias de 618 mg en 50 mL de agua se encuentra por encima de la CMC y por tanto el surfactante estaría en fase micelar.

En la [Figura 10](#) se recogen las imágenes de TEM de las MSN de referencia sintetizadas, las cuales fueron obtenidas a partir del DSDA derivado de la *L*-Arginina siguiendo las condiciones de síntesis discutidas anteriormente para materiales sintetizados con surfactantes derivados de *L*-triptófano ([Morales et al., 2016](#)). Se puede observar que la morfología de las partículas en todos los casos es esférica, con una distribución de tamaño de partícula próxima a los 200-500 nm, y, en donde, las partículas aparecen mayoritariamente aglomeradas y unidas

entre sí. Se visualiza que prácticamente todas son de estructura tipo “onion like”. No obstante, también se puede apreciar que existe la presencia de algunas estructuras “hollow shell” en algunos de los casos. Todas estas estructuras son similares a las obtenidas para los materiales sintetizados con DSDA derivado del triptófano (*Morales et al., 2016*). Durante el desarrollo de este proyecto se realizará un estudio de las variables de síntesis más influyentes para lograr estructuras más homogéneas. En todos los casos, las partículas aparecen con restos de sílice a su alrededor y presentan roturas sin llegar a formar una estructura uniforme y homogénea.

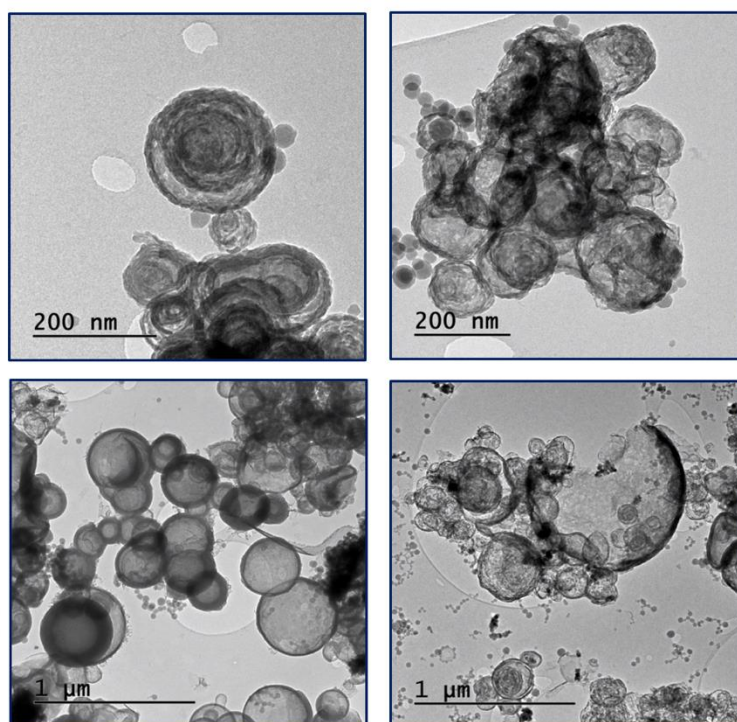


Figura 10. Imágenes TEM del material sintetizado de referencia.

En la *Tabla 3* y la *Figura 11* se muestran los resultados de las isotermas de adsorción-desorción de N_2 , obteniendo de este análisis el volumen de poro, la superficie específica y la distribución de tamaño de poro medio, calculado con el método NLDFT. A partir de estos resultados se obtiene la información necesaria de las propiedades texturales de las MSN. En este caso se presenta una isoterma tipo IV, atendiendo a la clasificación de la IUPAC. Además, se muestra una curvatura convexa seguido de un ciclo de histéresis tipo H3, lo que se asocia con porosidad de tipo laminar, todo ello es característico de los materiales mesoporosos. El valor obtenido de superficie para este tipo de material es de aproximadamente $340 \text{ m}^2/\text{g}$, con un volumen de poro de $0,35 \text{ cm}^3/\text{g}$ y un tamaño de poro de 26 \AA .

Tabla 3. Propiedades texturales del material sintetizado de referencia.

Muestra	pH inicial	DSDA: H ₂ O	Volumen de poro (cm ³ /g)	S _{BET} (m ² /g)	Tamaño de poro medio (Å)
Arg-ref	10	1:2000	0,35	339	26

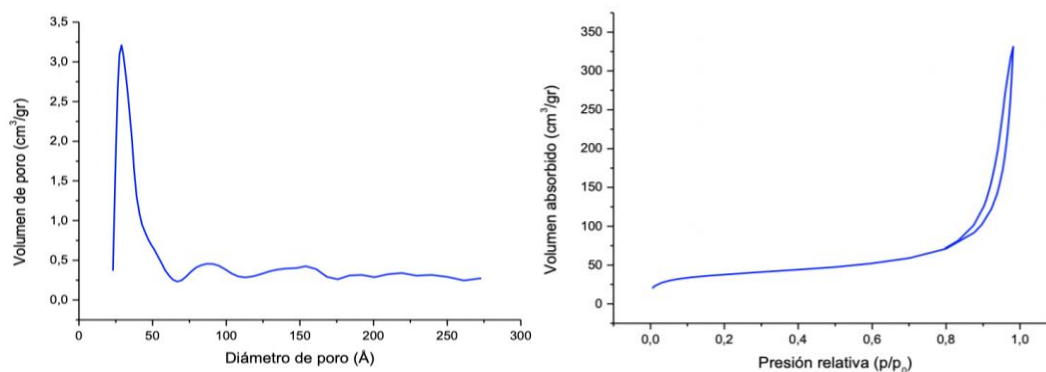


Figura 11. Isotherma de adsorción-desorción de N₂ del material sintetizado de referencia.

4.2.1. Estudio de variables de la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)

En base a los resultados obtenidos se realizará un estudio de las variables de síntesis con el objetivo de obtener un tipo de estructura más definida, sin presencia de sílice en los alrededores ni roturas. Para alcanzar este objetivo, se ha variado diferentes factores que son determinantes en la síntesis, siendo estos el pH y la concentración.

4.2.1.1. Estudio de la influencia del pH

Los pH seleccionados para el estudio han sido elegidos teniendo en cuenta el pH al cual se encuentra el medio inicial durante la realización de la síntesis del material de referencia, cuyo valor es en torno a 10. Los valores de pH probados fueron 8, 9 y 9,5. En la [Tabla 10](#) del [Anexo](#) se recoge de manera detallada la toma de datos de los pH durante todas las etapas que se llevan a cabo durante la síntesis.

En la [Figura 12](#) se observan las imágenes de TEM de los materiales sintetizados a los pH seleccionados. Para las diferentes variaciones de pH seleccionadas, puede concluirse que este influye de manera significativa en la síntesis de las MSN. Las muestras sintetizadas a pH 8 no llegan a formar una estructura definida del material obtenido, esto se puede corroborar observando los espectros de DRX de las muestras que se encuentran recogidas en la [Figura 29](#) del [Anexo](#), en los que para las muestras sintetizadas a pH 8 no se observa señal de difracción

en los ángulos característicos de este tipo de MSN. Sin embargo, el material sintetizado con un pH de 9,5 muestra un espectro de difracción similar a la estructura obtenido para las MSN sintetizadas de referencia, pudiendo ver que la presencia de sílice en los alrededores es casi inexistente y teniendo unos tamaños de partículas menores que los obtenidos para el material de referencia, siendo de 150-200 nm. En lo que respecta a la estructura, presentan la denominado “onion like”, mayoritariamente homogénea.

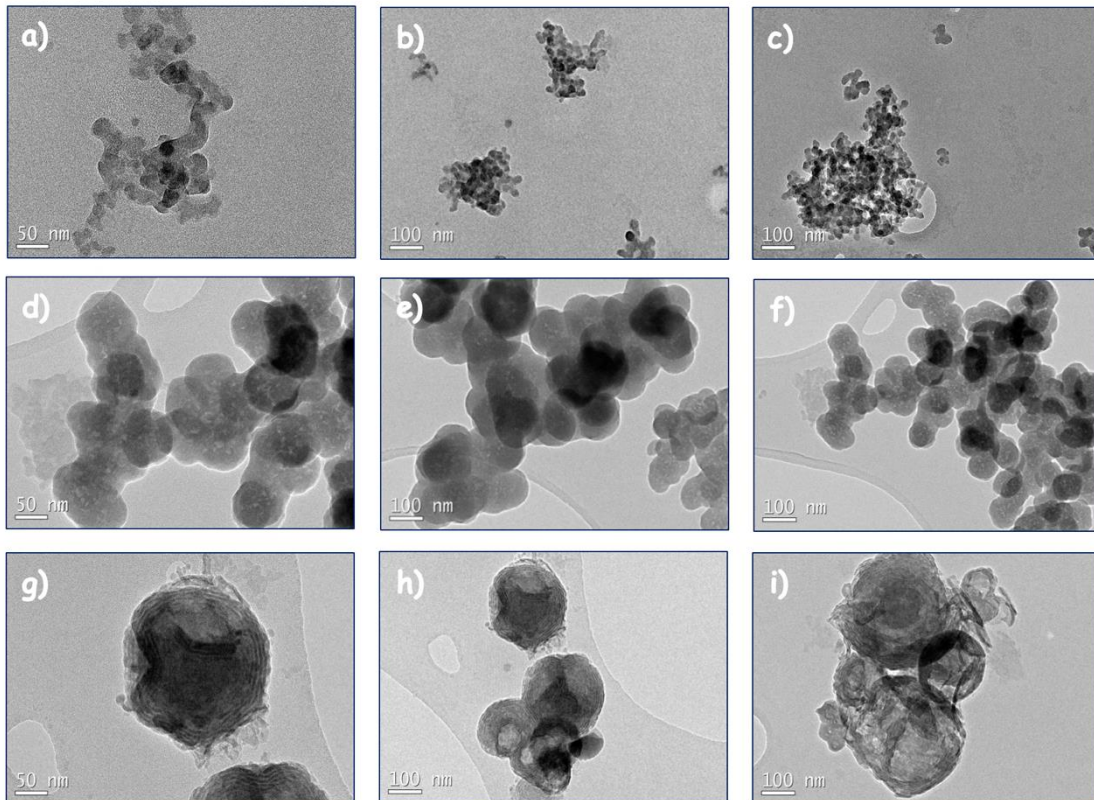


Figura 12. Imágenes TEM de los materiales sintetizados con cambio de pH desde a)-c) para pH 8, d)-f) para pH 9 y g)-i) para pH 9,5.

En la **Figura 13** se muestra el análisis termogravimétrico de las partículas, en donde el porcentaje de masa que se pierde es debido a la pérdida de los componentes orgánicos de las MSN, es decir el DSDA y el APTES incorporado en los materiales.

El porcentaje de orgánico perdido en el análisis de TGA es de aproximadamente un 20% para el caso del material de Arg-pH 8, 48% para Arg-pH 9 y del 35% para Arg-pH 9,5. Esto indica que la incorporación de DSDA en los materiales sintetizados a pH 8 es sensiblemente inferior al obtenido para los materiales sintetizados a pH 9 y 9,5, lo que corrobora que la incorporación del surfactante en las muestras sintetizadas a pH 8 no se produce.

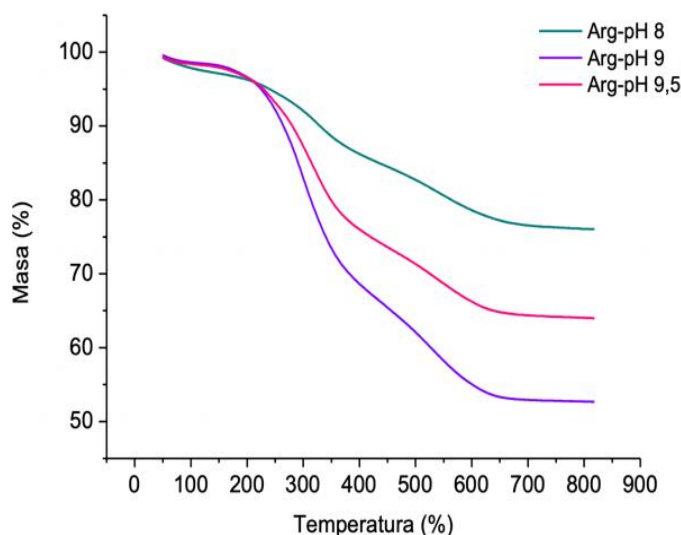


Figura 13. TGA de los materiales sintetizados con cambio de pH.

Las propiedades texturales recogidas en la *Tabla 2* permiten nuevamente ratificar que el material sintetizado con un pH de 9,5 es el que presenta mejores resultados de los tres materiales sintetizados con variación de pH, teniendo una superficie de 147 m²/g, volumen de poro de 0,26 cm³/g y tamaños de poro entorno a los 30 Å. Los valores de las propiedades texturales del material del pH 8 justifica lo mostrado en las imágenes TEM, la ausencia de difracción en 2° de los espectros de DRX y la menor pérdida de peso en el análisis de TGA.

Tabla 2. Propiedades texturales de los materiales sintetizados con cambio de pH.

Muestra	pH inicial	DSDA: H ₂ O	Volumen de poro (cm ³ /g)	S _{BET} (m ² /g)	Tamaño de poro medio (Å)
Arg-ref	10	1:2000	0,35	339	26
Arg-pH 8	8	1:2000	0,11	92	51
Arg-pH 9	9	1:2000	0,19	122	43
Arg-pH 9,5	9,5	1:2000	0,26	147	30

4.2.1.2. Estudio de la influencia de la concentración de surfactante

Se ensayaron distintas concentraciones de surfactante, en concreto las relaciones de DSDA fueron aquellas con una relación molar de DSDA: H₂O de 0,5:2000 (Arg-0,5) y 0,7:2000 (Arg-0,7), en este caso el pH no se modificó y se usó el que presentaba el medio natural de síntesis (pH 10), nuevamente nos encontramos con que las concentraciones de surfactantes de DSDA seleccionadas se encuentran por encima del CMC. En la *Figura 14* se recogen las imágenes TEM de muestras sintetizadas en las condiciones previamente mencionadas. En ambos casos las partículas tienen una estructura de tipo “onion like” y sin apenas presencia de

sílice, no obstante, las partículas con concentración de 0,5 se aglomeran en mucho mayor medida que las de 0,7. Asimismo las MSN de concentración 0,7 presentan un aspecto en cuanto a estructura mucho más definida.

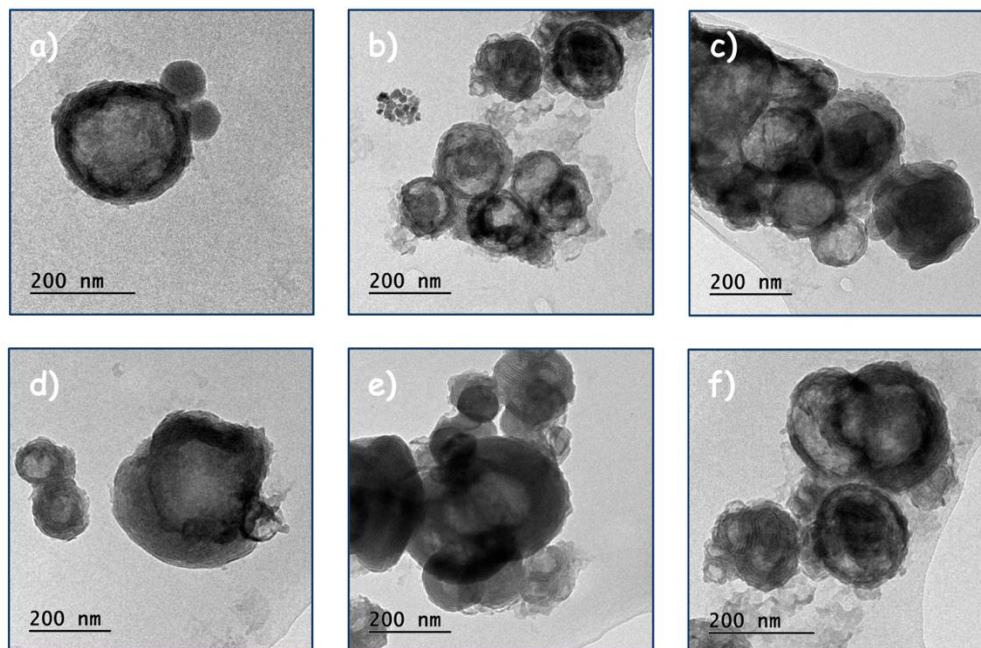


Figura 14. Imágenes TEM de los materiales sintetizados con variación en la concentración desde a)-c) para Arg-0,7 y desde d)-f) para Arg-0,5.

Las propiedades texturales recogidas en la *Tabla 3* muestran que las superficies y los volúmenes de poro son superiores en el material de 0,7, obteniéndose materiales con superficies de 268 m²/g y volúmenes de poro de 0,3 cm³/g. El tamaño de poro medio en los dos materiales es de 30 Å, cuyo origen reside en la morfología similar de ambos materiales, tal y como se ve en las imágenes TEM.

Tabla 3. Propiedades texturales de los materiales sintetizados con variación en la concentración.

Muestra	pH inicial	DSDA: H ₂ O	Volumen de poro (cm ³ /g)	S _{BET} (m ² /g)	Tamaño de poro medio (Å)
Arg-ref	10	1:2000	0,35	339	26
Arg-0,7	9,5	0,7:2000	0,30	268	30
Arg-0,5	9,5	0,5:2000	0,16	112	31

4.2.1.3. Estudio de la influencia de la variación de pH y concentración de DSDA simultánea

A raíz de los mejores resultados obtenidos durante el estudio de las variables para la síntesis de las MSN, se realizó un nuevo estudio en el que se ensayaron las concentraciones de 0,5 y 0,7 a un pH de 9,5. En la *Figura 15* se puede observar las fotografías de TEM de los materiales obtenidos, donde nuevamente se puede comprobar como las MSN que se obtienen presentan mejores estructuras y ausencia de sílice en comparación con las partículas sintetizadas en las condiciones de referencia. El material de Arg-0,7-9,5 además de presentar la estructura esperada de tipo “onion like”, posee un tamaño de partícula nuevamente más pequeño que el del material de referencia, estando alrededor de los 150-200 nm.

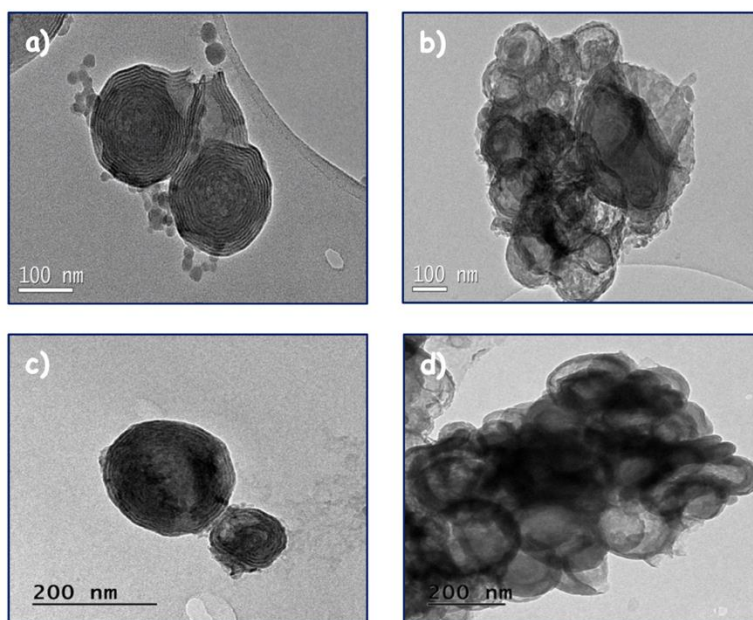


Figura 15. Imágenes TEM de los materiales con variación simultánea de pH y concentración de a) y b) para Arg-0,7-9,5 y c) y d) para Arg-0,5-9,5.

En la *Figura 16* se muestran los espectros de DRX de los materiales sintetizados, comparados con el material de referencia sintetizados en esta investigación. Todos los materiales presentan el pico de difracción característico de los materiales mesoporosos a 2° , relativo al ordenamiento típico de este tipo de materiales.

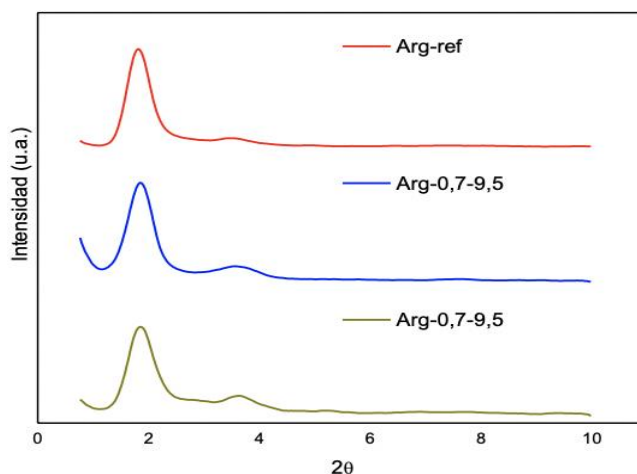
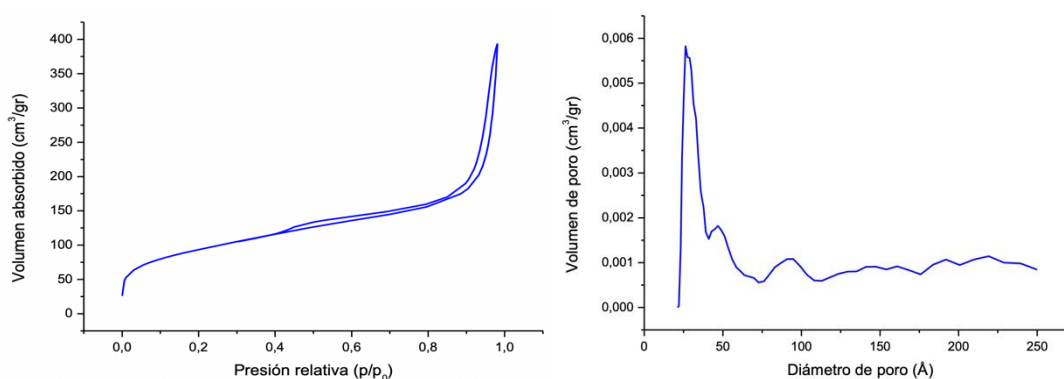


Figura 16. Espectros de difracción de rayos X de los principales materiales sintetizados.

En lo referido a las isothermas de adsorción y desorción de N₂ mostrados en la [Tabla 5](#) y [Figura 17](#), se observa que nuevamente, como ocurría con el material de referencia, las isothermas siguen la clasificación tipo IV y ciclos de histéresis tipo H3. Con respecto a los valores de las propiedades texturales para el caso de Arg-0,7-9,5, se obtiene una superficie de 363 m², superficie ligeramente superior a la obtenida para el material de referencia. Sin embargo, se obtienen valores de volúmenes de tamaño de poro ligeramente inferior a los valores obtenidos para el material referencia, 0,35 y 0,29 cm³/g para el material de referencia y Arg-0,7-9,5 respectivamente. Estos resultados concuerdan al ver las imágenes del material mostradas en la [Figura 15](#), las partículas tienen un menor tamaño, presentando una mayor esfericidad y homogeneidad.



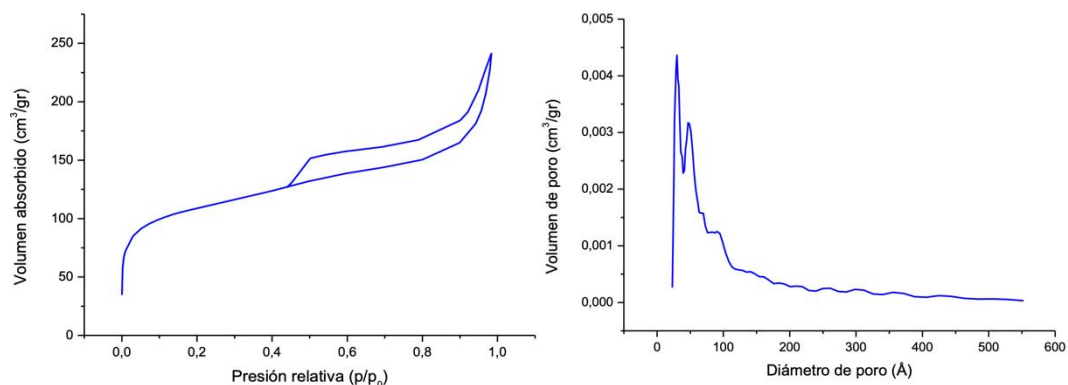


Figura 17. Isotherma de adsorción-desorción de N₂ de los materiales óptimos.

Tabla 4. Propiedades texturales de los materiales óptimos.

Muestra	pH inicial	DSDA: H ₂ O	Volumen de poro (cm ³ /g)	S _{BET} (m ² /g)	Tamaño de poro medio (Å)
Arg-ref	10	1:2000	0,35	339	26
Arg-0,7-9,5	9,5	0,7:2000	0,29	363	29
Arg-0,5-9,5	9,5	0,5:2000	0,28	167	33

4.2.2. Incorporación de Fe en las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN)

Las nanopartículas de hierro que se introdujeron en las MSN han sido obtenidas mediante síntesis por coprecipitación, concretamente nanopartículas de Fe de fase magnetita, con tamaños de partículas de unos 200 nm, tal y como se observa en el espectro DRX e imágenes SEM presentes en el *Anexo*.

El hierro incorporado a las MSN se observa en forma de esferas oscuras y se recoge en la *Figura 18*, *Figura 19* y *Figura 20*, donde se muestran también los microanálisis adjuntos. En base a esto, se puede decir que la magnetita sintetizada y estabilizada con ácido butírico es capaz de poder incorporarse a la estructura de las partículas sintetizadas. El microanálisis realizado permite ver que para el caso de la muestra Arg-0,7 la cantidad de Fe que entró fue superior al de material de Arg-0,5. En ambos casos los tamaños de partículas están entorno a los 200 nm, por lo que la incorporación de los núcleos de Fe no altera la forma de la estructura silíceo ni el tamaño de partícula.

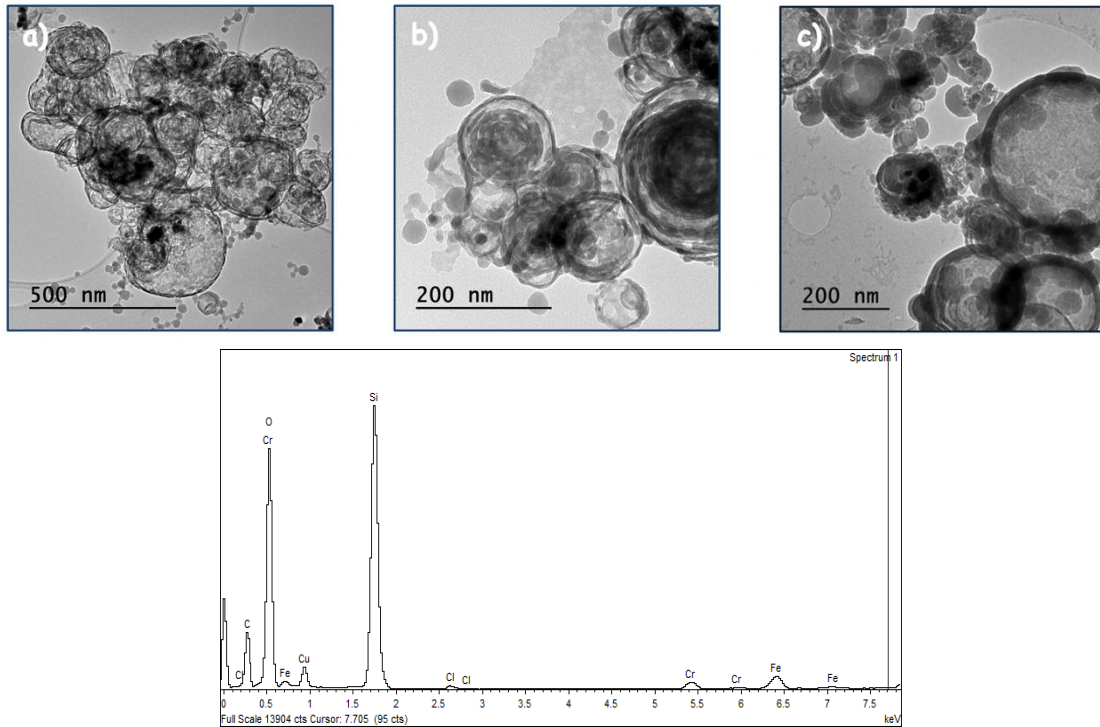


Figura 18. Imágenes TEM de los materiales de referencia de a) y c) con análisis elemental de una partícula de la imagen a) mediante detector rayos X.

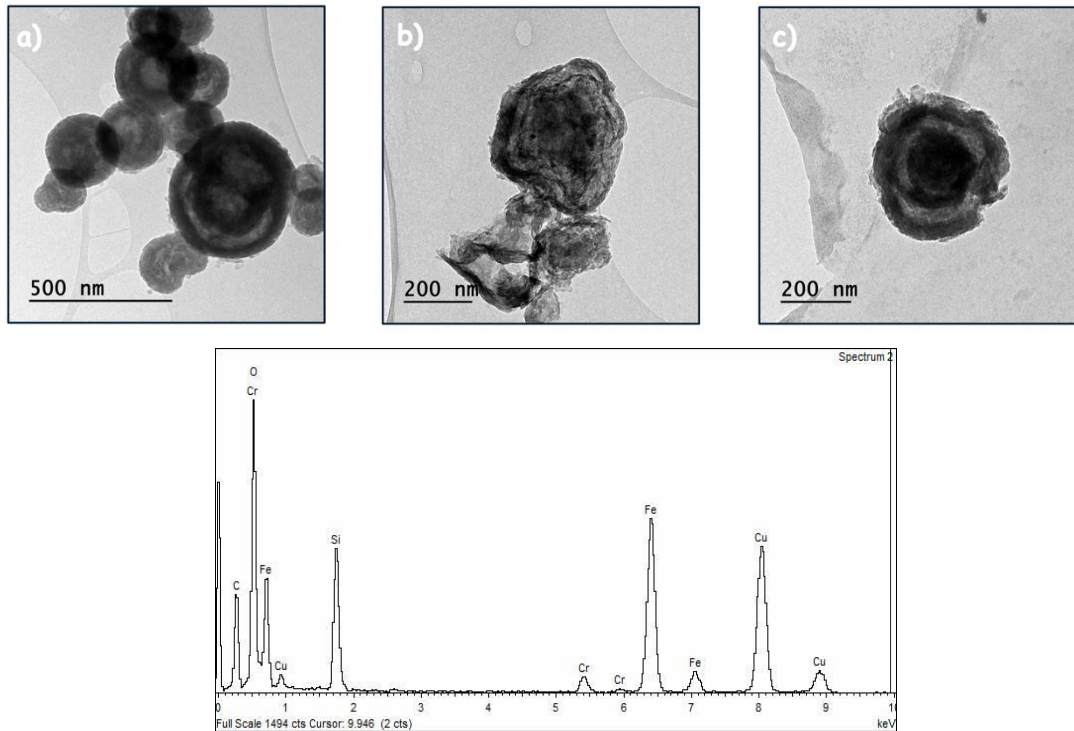


Figura 19. Imágenes TEM de los materiales con cambio de pH y concentración simultánea de 0,7 de a) y c) con análisis elemental de una partícula de la imagen c) mediante detector rayos X.

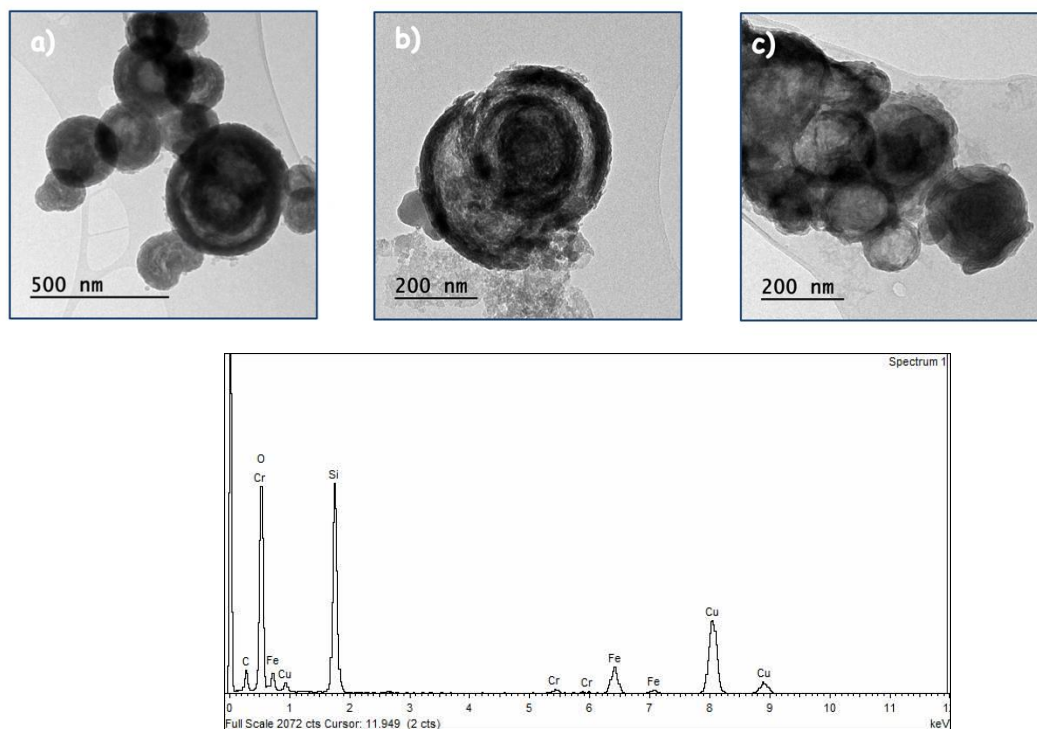


Figura 20. Imágenes TEM de los materiales con cambio de pH y concentración simultánea de 0,5 de a)- c) con análisis elemental de una partícula de la imagen b) mediante detector rayos X.

La cantidad de orgánico obtenido mediante análisis TGA es similar a los valores obtenidos para los materiales no magnéticos, lo que denota que la incorporación de Fe no afecta a la formación de estructura de los materiales, tal y como se observa en la *Figura 21*.

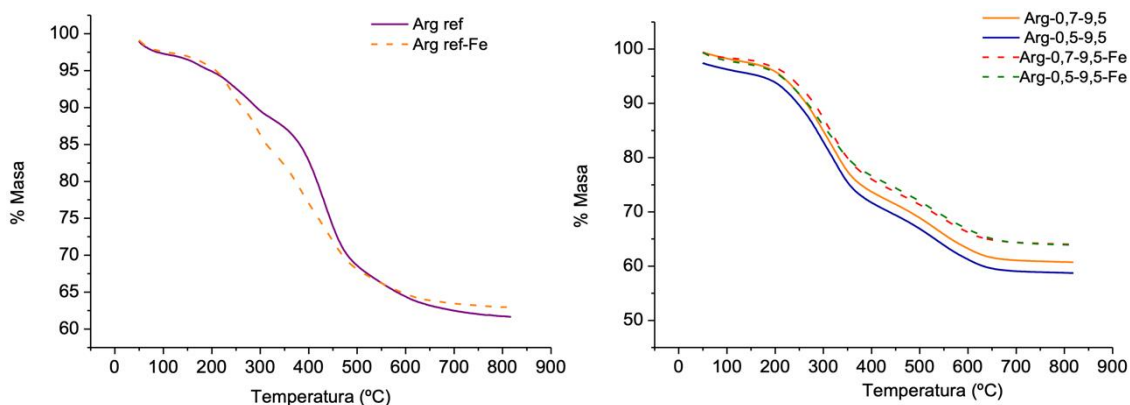


Figura 21. TGA de los materiales óptimos sintetizados.

La *Figura 22* recoge los espectros de DRX de las MSN magnéticas. Se puede observar un efecto claro de la incorporación de Fe, y es que en todos los casos no se observa una difracción de manera clara en el pico característico de las MSN en 2° . Sin embargo, en las imágenes TEM si podía verse que existe un ordenamiento de las paredes de sílice, lo que significa que la presencia de Fe en las MSN produce una alteración en los patrones característicos. Estudios como el de Ruiz-Hernández et al. demostraron este mismo efecto, en

el cual al incorporar hierro a las MSN con estructura SBA-15 no se producían difracciones claras en el pico característico (Ruiz-Hernández et al., 2007).

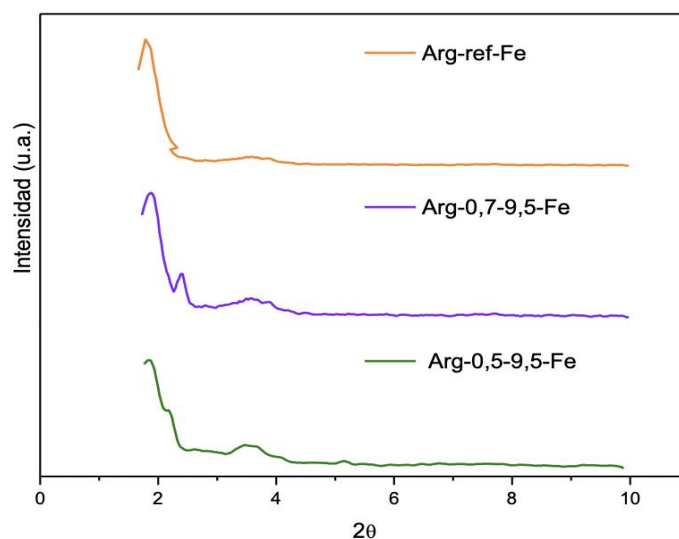


Figura 22. Espectros de difracción de rayos X de los materiales con incorporación de Fe.

En la *Tabla 5* se muestra que para el material de Arg-0,7-9,5-Fe se obtiene buenas propiedades texturales, con una superficie que está alrededor de los 270 m²/g, siendo la mitad para el caso del material de Arg-0,5-9,5-Fe, con aproximadamente 170 m²/g. La incorporación de Fe no afecta a los valores de volumen y diámetro de poro, sin embargo, en la muestra Arg-0,7-9,5 se observa una ligera disminución de la superficie específica respecto al material no magnético, siendo estas 268 y 363 m²/g respectivamente. En la *Tabla 5* se han incorporado también los valores de los % de Fe incorporado a los materiales y medido mediante ICP. En todos los materiales se observan incorporaciones entre el 5 y el 7 %, apreciándose la mayor incorporación para el material Arg-0,7-9,5 que presentaba mejor ordenamiento.

Tabla 5. Control de pH en las etapas de síntesis de las MSN.

Muestra	pH inicial	DSDA:Fe ₃ O ₄ :H ₂ O (eq)	Volumen de poro (cm ³ /g)	S _{BET} (m ² /g)	Tamaño de poro medio (Å)	Fe ICP (%)
Arg-ref	10	1:2000:0	0,35	339	26	0,41
Arg-ref-Fe	10	1:2000:0,65	0,25	178	30	5,32
Arg-0,7-9,5-Fe	9,5	0,7:2000:0,46	0,28	268	30	7,36
Arg-0,5-9,5-Fe	9,5	0,5:2000:0,33	0,22	167	32	6,85

4.2.3. Recubrimiento de las MSN con glucosa

Con el objetivo de poder favorecer el proceso de fagocitosis de las MSN por las células, se recubrieron superficialmente las nanopartículas de sílice mesoporosas sintetizadas con glucosa, a través de anclaje directo entre el ácido glucurónico y los grupos amino presentes en el material, derivados del coagente director de estructura, es decir, el APTES. El recubrimiento con glucosa de los materiales magnéticos permitiría fomentar la generación de radicales libres en el interior de las células. La generación de estos radicales se generaría mediante la degradación de la glucosa a través de la enzima glucosa oxidasa, la cual está presente en la célula, generando así H_2O_2 , que, en combinación con las propiedades catalíticas del hierro, produciría una reacción de tipo Fenton generando los radicales oxidantes y ocasionando de este modo la muerte celular.

Las concentraciones de glucosa anclada en los distintos MSN se muestran en la **Tabla 6**. Se observa como el mayor anclaje se produjo para el material con mejores propiedades texturales Arg-0,7-9,5-Glu, teniendo aproximadamente una cantidad de glucosa de 0,89% con respecto a la masa total del material. Los demás materiales también presentaron buenos resultados, siendo estos similares a los mostrados en bibliografía (*Niemelä et al., 2015*). Estos resultados demuestran que el método empleado para el anclaje de la glucosa a la superficie de las MSN es eficaz.

Tabla 6. Resultados del análisis de glucosa anclada en los principales materiales sintetizados.

Muestra	Glucosa (% w)
Arg ref-gluc	0,546
Arg-0,7-9,5-gluc	0,887
Arg-0,5-9,5-gluc	0,602
Arg-0,7-9,5-Fe-gluc	0,487

En la **Figura 23** se recoge el análisis termogravimétrico de las partículas con y sin recubrimiento de glucosa. Cabe destacar como los materiales, tras realizarle el anclaje superficial de la glucosa, pierden una cantidad significativa de su contenido orgánico, lo que se traduce en una pérdida de surfactante y por tanto de fármaco, dando pérdidas de un 82% para el material de Arg-ref, del 78% para el Arg-0,7-9,5 y del 76% para el Arg-0,5-9,5, todo ello con respecto al material sin recubrir. Esto indica que una parte del DSDA que se encuentra en los poros se libera durante el proceso de anclaje de la glucosa, en el medio de dimetilformamida donde se realiza. A pesar de ello, este aspecto no influye en el empleo que se le quiere otorgar

a estos materiales con el recubrimiento, ya que el principal reto es poder favorecer la asimilación de las células cancerígenas, para posteriormente favorecer la reacción Fenton a partir de la presencia de Fe y H₂O₂ generada por la degradación de la glucosa.

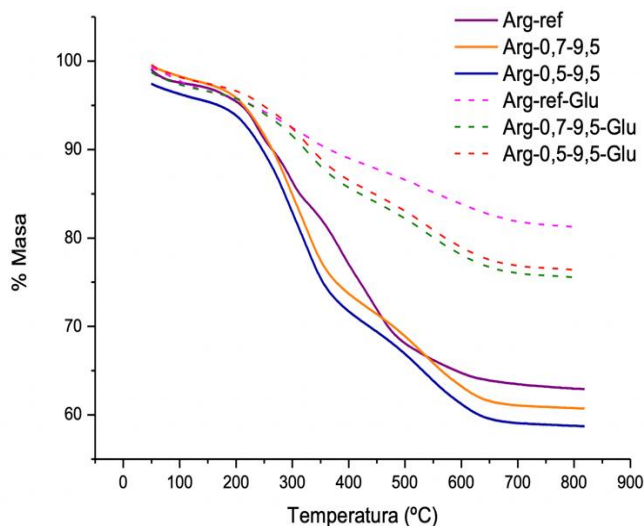
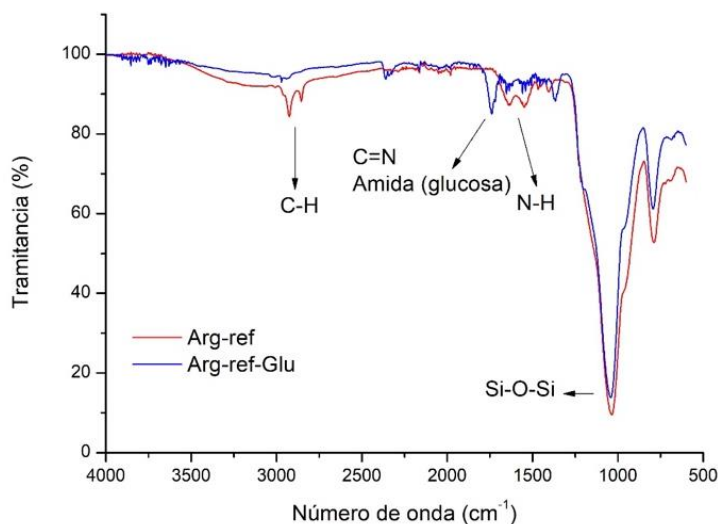


Figura 23. TGA de los materiales sin y con anclaje de glucosa.

En la *Figura 24* se observa las gráficas correspondientes a la prueba de FTIR, que permiten corroborar lo anteriormente expuesto, y es que, el anclaje de glucosa a las MSN se ve de manera clara en el espectro, observándose una tensión C-N en torno a 1700 cm⁻¹, la cual corresponde al enlace de la amida, presente en todas las muestras en las que se ha incorporado glucosa.



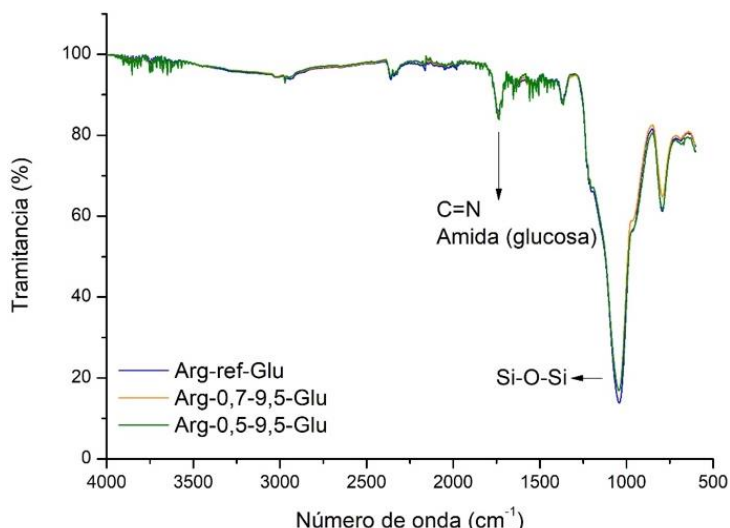


Figura 24. Espectros de FTIR de los materiales sintetizados y anclados con glucosa.

4.3. Liberación controlada del fármaco en medio simulado

En la *Figura 25* se pueden ver las curvas obtenidas a partir de la liberación en medio corporal simulado de las MSN sintetizadas con mejores propiedades. Estos materiales presentan una liberación inicial rápida para posteriormente liberar el fármaco de forma exponencial a lo largo de varias semanas. Cabe destacar que las curvas han sido ajustadas a una cinética de orden uno, siguiendo la expresión presente en la ecuación (1).

$$C(t) = C_{max} \cdot (1 - \exp^{-kt}) \quad (1)$$

De donde:

- “C” son los mg de arginina liberados por gramo de MSN.
- “t” es el tiempo en horas.

Los parámetros de los materiales se muestran a modo resumen en la *Tabla 7*, obteniéndose que los coeficientes de determinación de R^2 son de alrededor de 0,97, lo que indica que los datos se ajustan correctamente al modelo propuesto.

Tabla 7. Resultados de los parámetros de la cinética de liberación de los materiales probados.

Muestra	Arg-0,7 pH 9,5		Arg-0,5 pH 9,5	
Parámetro	Valor	Desviación estándar	Valor	Desviación estándar
C_{max} (mg/g)	176,93	1,35	173,71	1,50
k (h^{-1})	0,030	0,0086	0,029	0,0077
R^2	0,97		0,97	

Ambos materiales presentan tendencias exponenciales muy similares, no obstante, se puede ver como existe una pequeña correlación entre la cantidad del fármaco final liberado y la cantidad de orgánico que presentan las muestras, donde, el material con mayor contenido de orgánico, Arg-0,7-9,5, libera la mayor cantidad de arginina, 177 mg por gramo de MSN, mientras que, el que presenta mayor cantidad de orgánico, Arg-0,5-9,5, libera la menor cantidad, 174 mg por gramo. A su vez, poseen una cinética casi idéntica, con una constante para ambos casos alrededor de $k = 0,030 \text{ h}^{-1}$ y con un tiempo total de liberación entre 25-30 días. Estos resultados indican que los materiales se pueden utilizar para tratamientos terapéuticos que requieran una liberación lenta, como por ejemplo en enfermedades crónicas o enfermedades que requieran tratamientos de tiempos prolongados.

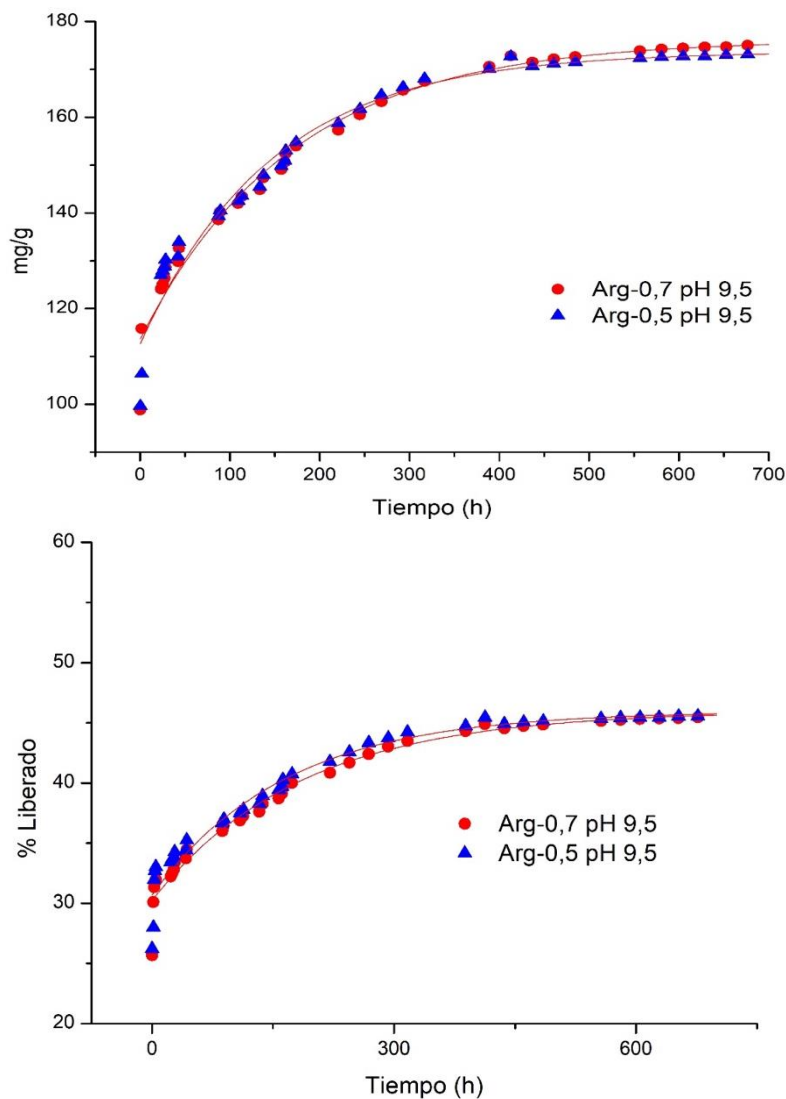


Figura 25. Curvas de liberación de la L-Arginina para cada material sintetizado en medio simulado.

5. Conclusiones

En base al análisis de resultados realizado a lo largo de la presente investigación se han llegado a una serie de conclusiones que se resumen en los siguientes puntos:

- Se ha sintetizado de forma exitosa el surfactante director de la estructura con actividad farmacológica (DSDA), mediante la reacción de amidación entre el fármaco L-Arginina y cloruro de oleilo. Comprobando la capacidad de este para formar micelas, lo cual indica que es capaz de usarse como patrón o template en la síntesis de los materiales mesoestructurados.
- Las MSN de referencia sintetizadas a partir del DSDA muestran dos poblaciones de nanopartículas con estructura “onion like” y “hollow shell”, teniendo para ambos casos unos materiales con alta presencia de sílice alrededor de las nanopartículas, con una estructura no homogénea y con un tamaño de partícula que ronda los 500-200 nm. Además, poseen una superficie específica de alrededor $340 \text{ m}^2/\text{g}$, volúmenes de poro de $0,35 \text{ cm}^3/\text{g}$ y tamaños de poro de aproximadamente 26 \AA .
- El estudio de la influencia del pH en la síntesis de MSN permitió concluir que, dentro del intervalo de pH analizados, el pH de 9,5 es el que da lugar a materiales con una estructura definida y que mejoran al material de referencia, ya que para el resto de los pH probados los resultados no mostraron partículas que llegaran a tener una estructura porosa definida. Además, para el pH de 9,5 se presenta un único tipo de estructura, tipo “onion like”, y partículas más pequeñas con tamaños de 150-200 nm. Para este caso la superficie específica era de $147 \text{ m}^2/\text{g}$, volúmenes de poro de $0,26 \text{ cm}^3/\text{g}$ y tamaños de poro de 30 \AA .
- Los resultados del estudio de la influencia de la variación de concentración de DSDA demuestran que, para las relaciones DSDA: H_2O de 0,7:2000 y 0,5:2000, las estructuras mejoran considerablemente, teniendo nuevamente partículas de tipo “onion like” muy homogéneas y con el mismo tamaño alrededor de 200 nm.

- Los materiales sintetizados a partir de la variación de pH y concentración de DSDA simultánea muestran una notable mejoría con respecto al material sintetizado de referencia, presentando una estructura homogénea y esférica, con un tamaño de partícula alrededor de 150-200 nm. En cuanto a las propiedades texturales, para los materiales con concentración de 0,7 y 0,5, se obtuvo de forma respectiva: una superficie específica de 363 y 167 m²/g, volumen de poro 0,29 y 0,28 cm³/g y un tamaño de poro de 29 y 33 Å.
- Se ha comprobado como la incorporación de la magnetita sintetizada mediante coprecipitación se introduce de manera exitosa en las MSN, modificando el ordenamiento interno y las propiedades texturales, pero sin que se vea afectado ni el tamaño ni la morfología de las partículas. Se obtuvieron incorporaciones de Fe entre el 5 y 7%.
- Los recubrimientos de glucosa de las MSN mediante la activación de ácido glucurónico vía HATU se han realizado en los materiales con mejores estructuras obtenidas, dando como resultado una cantidad de glucosa anclada entre el 0,5 y 1% de la masa total del material.
- Los ensayos de liberación controlada del fármaco en medio corporal simulado demuestran que la liberación se produce en un periodo entre 25-30 días, siguiendo una cinética de primer orden. Estos resultados indican que los materiales tienen potencial aplicación para tratamientos terapéuticos que requieran una liberación lenta, como por ejemplo en enfermedades crónicas o enfermedades que requieran tratamientos de tiempos prolongados.

6. Bibliografía

- Abd Elrahman A. and Mansour F.R., “Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 52, pp. 702–712, Aug. 2019.
- Alothman Z., “A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials, *Materials*”, vol. 5, pp. 2874, 2012.
- Amstad E., Textor M., and Reimhult E., “Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.” *Nanoscale*, vol. 3, n° 7, pp. 2819–2843, Jul. 2011.
- Aronson J.K., “Tryptophan,” *Meyler’s Side Eff. Drugs*, pp. 220–221, Jan. 2016.
- Beck J.S., Vartuli S.J.C., Roth W.J., Leonowicz M.E., Kresge C.T., Schmitt K.D., Chu C.T.W., Olson D.H., Sheppard E.W., McCullen S.B., Higgins J.B. and Schlenker J.L., “A new family of mesoporous molecular”., vol. 114, n° 27, pp. 10834-10843, 1992.
- Davoodi, P., Lee L.Y., Xu Q., Sunil V., Sun Y., and Soh S., “Drug delivery systems for programmed and on-demand release,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 132, pp. 104–138, Jul. 2018.
- Ding C. and Li Z., “A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1440–1453, Jul. 2017.
- Hoang Thi T.T, Du Cao V., Nguyen T.N.Q., Hoang D.T., Ngo V.C., and Nguyen D.H., “Functionalized mesoporous silica nanoparticles and biomedical applications,” *Mater. Sci. Eng. C.*, vol. 99, pp. 631–656, Jun. 2019.
- Hossen S., Hossain M.K., Basher M.K., Mia M.N.H., Rahman M.T., and Uddin M.J., “Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review,” *J. Adv. Res.*, vol. 15, pp. 1–18, Jan. 2019.
- Karge, H.G. and Weirkamp J., “Molecular sieves postsynthesis modification I”, vol. 97, pp. 157-163, 2002.
- Kim J., Cho H.R., Jeon H., Kim D., Song C., Lee N and Choi S.H., “Continuous O₂-Evolving MnFe₂O₄ Nanoparticle-Anchored Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Photodynamic Therapy in Hypoxic Cancer,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, n° 32, pp. 10992–10995, Aug. 2017.
- Kresge C.T., Leonowicz M.E., Roth W.J., Vartuli J.C and Beck J.S., “Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism”., vol. 359, pp. 710-712, 1992.
- Lee N., Yoo D., Ling D., Cho M.H., Hyeon T., and Cheon J., “Iron oxide-based nanoparticles for multimodal imaging and magnetoresponsive therapy,” *Chem. Rev.*, vol. 115, n° 19, pp. 10637–10689, Oct. 2015.
- Mamaeva V., C. Sahlgren, M. Linden, “Mesoporous silica nanoparticles in medicine-recent advances”., *Adv Drug Deliv Rev.*, vol. 65, pp. 689-702, 2013.

- Manzano M., Colilla M., Vallet-Regi M., “Drug delivery from ordered systems and bone tissue engineering”., vol.12, pp. 5934-5943, 2006.
- McNeal C.J., Meininger C.J., Wilborn C.D., Tekwe C.D., Wu G. “Safety of dietary supplementation with arginine in adult humans”., vol.50, pp. 1215-1229, 2018.
- Monnier A., Schuth F., Huo Q., Kumar D., Margolese D., Maxwell R.S.I, Stucky G.D, M. Krishnamurty, Petroff P., Firouzi A., Janicke M., Chmelka B.F., “Cooperative formation of inorganic-organic interfaces in the synthesis of silicate mesostructures”., vol. 261, pp. 1299-1303,1993.
- Morales V., Gutiérrez-Salmerón M., Balabasquer M., Ortiz-Bustos J., Chocarro-Calvo A. García Jiménez C. and García Muñoz Rafael A. “New Drug-Structure-Directing Agent Concept: Inherent Pharmacological Activity Combined with Templating Solid and Hollow-Shell Mesostructured Silica Nanoparticles”., Adv. Funct. Mater., vol. 26, pp. 13-14 2016.
- Moritz M. and M. Geszke-Moritz, “Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: Principles and applications,” Mater. Sci. Eng. C., vol. 49, pp. 114–151, Apr. 2015.
- Narayan R., U.Y. Nayak, A.M.Raichur, S.Garg, “Mesoporous silica nanoparticles: a comprehensive review on synthesis and recent advances”., MDPI pharmaceutics., vol.10, pp. 118, 2018.
- Niemelä E., Desai D., Nkizinkiko Y., Eriksson J.E., and Rosenholm J.M., “Sugar-decorated mesoporous silica nanoparticles as delivery vehicles for the poorly soluble drug celastrol enables targeted induction of apoptosis in cancer cells,” Eur. J. Pharm. Biopharm., vol. 96, pp. 11–21, Oct. 2015.
- Nieto A., S. Areva, T. Wilson, R. Vitala, M. Vallet-Regi, “Cell viability in a wet silica gel, Acta Biomaterialia”. vol 5., pp. 3478-3487, 2009.
- Ortiz Bustos J., “Correlación entre la funcionalización superficial de materiales silíceos mesoestructurados y la adsorción y liberación controlada de fármacos”, Universidad Rey Juan Carlos (Madrid), Tesis Doctoral, 2017.
- Ruiz-Hernandez E., Lopez-Noriega A., Arcos D., Izquierdo-Barba I., Terasaki O., and Vallet-Regi M., “Aerosol-assisted synthesis of magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting,” Chem. Mater., vol. 19, pp. 156-164, 2007.
- Sáez V., E. Hernández, L.López., “Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas”, Universidad del País Vasco (España), Tesis Doctoral, 2003.
- Shah D. and Shaikh A.R., “Interaction of arginine, lysine and guanidine with surface residues of lysozyme: implication to protein stability”., J. Biomol.Struct., vol. 34, pp. 104-114, 2016.
- Simovic S., N. Ghouchi-Eskandar, A. Moom Sinn, D. Losic, C.A. Prestidge, “Silica material in drugs”., Curr. Drug Discov. Technol., vol. 8, pp. 250–268, 2011.

- Sing K.S.W., Everett D.H., Haul R., Moscou L., Pierotti A., Rouquerol J. and Siemieniewska T., “Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 54, pp. 2201–2218, 1985.
- Soenen S.J., P. Rivera-Gil, J.-M. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt, and K. Braeckmans, “Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation,” *Nano Today*, vol. 6, n° 5, pp. 446–465, Oct. 2011.
- Vallet-Regi M. “Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery mesoporous matrices”, *Expert Opin Drug Deliv.*, vol. 6, pp. 1383-1400, 2009.
- Vallet-Regi M., A. Rámila, del Real R.P., and Pérez-Pariente J., “A new property of MCM-41: drug delivery system” *Chem. Mater.*, vol. 13, pp. 345-367, 2000.
- Wada N., Kurokawa Y., Tanaka K., “Perioperative nutritional support with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine in surgery for abdominal malignancies”, vol.6, pp. 251-6, 2018.
- Yanagisawa T., Yokoyama C., Kuroda K., and Kato C., “Synthesis of layered polysilicic acid-acrylamide intercalation compounds and polymerization in the interlayer spaces”, vol. 63, pp. 47-50, 1990.

Anexo

Tabla 8. Rendimientos de DSDA y materiales sintetizados.

Muestra	Rendimiento (%)
DSDA	93
Arg-ref	44
Arg-pH 8	23
Arg-pH 9	34
Arg-pH 9,5	35
Arg-0,7	56
Arg-0,5	52
Arg-0,7-9,5	64
Arg-0,5-9,5	61
Arg-ref-Fe	38
Arg-0,7-9,5-Fe	47
Arg-0,5-9,5-Fe	42

Tabla 9. Control de pH durante las etapas de síntesis de las MSN.

	Etapa previa	APTES	*APTES (HCl)	APTES +5'	*TEOS	TEOS (NaOH)	TEOS +10'
pH	Arg-ref						
	6	9	-	9,5	10,3	-	10,3
	Arg-pH 9,5						
	10,2	9,4	9,45	9,46	9,46	-	9,53
	Arg-pH 9						
	7,62	10,2	9,17	9,16	9,15	-	9,15
	Arg-pH 8						
	7,83	10,16	8,17	8,21	8,28	-	8,28
	Arg-0,5						
	6,60	9,88	-	9,85	9,75	-	9,34
	Arg-0,7						
	7,26	9,88	-	9,90	9,77	-	9,34
	Arg-0,7-9,5						
	6,68	10,21	9,47	9,41	8,68	9,37	9,57
Arg-0,5-9,5							
6,12	9,72	-	9,51	9,54	-	9,51	

*Fue necesario realizar un reajuste del pH con HCl o NaOH para establecer los valores que interesaba.

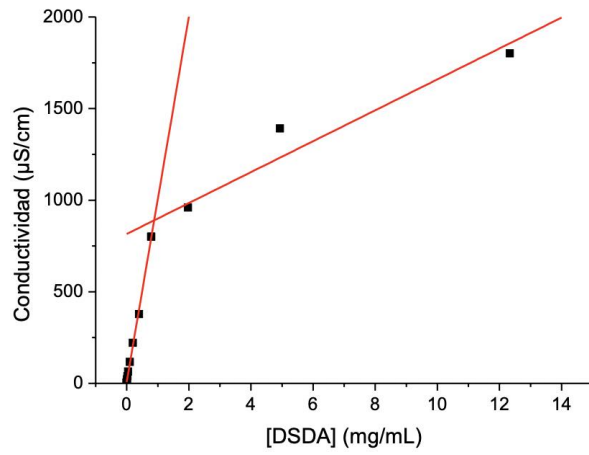


Figura 26. Concentración micelar crítica del DSDA de L-Arginina.

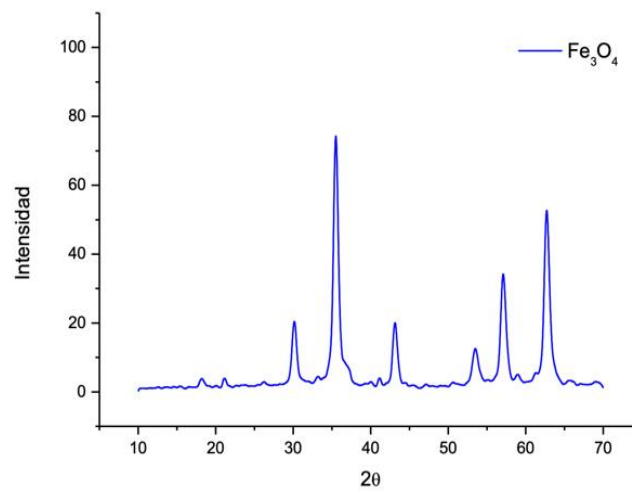


Figura 27. Espectros de difracción de rayos X de la magnetita sintetizada a través de coprecipitación.

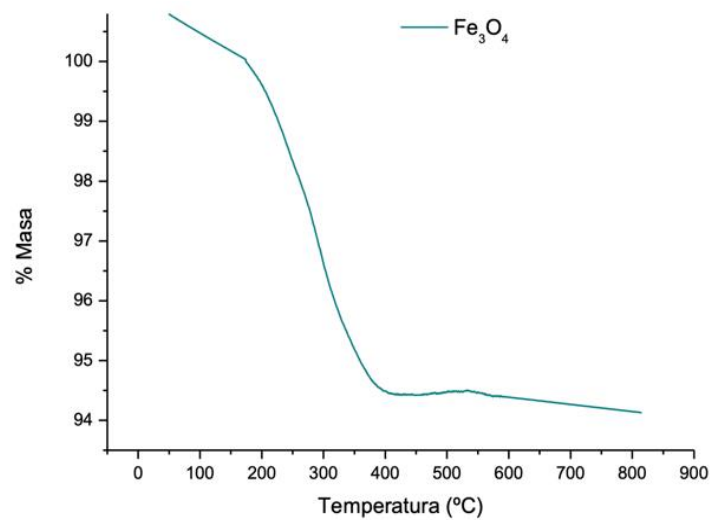


Figura 28. TGA de de la magnetita sintetizada a través de coprecipitación.

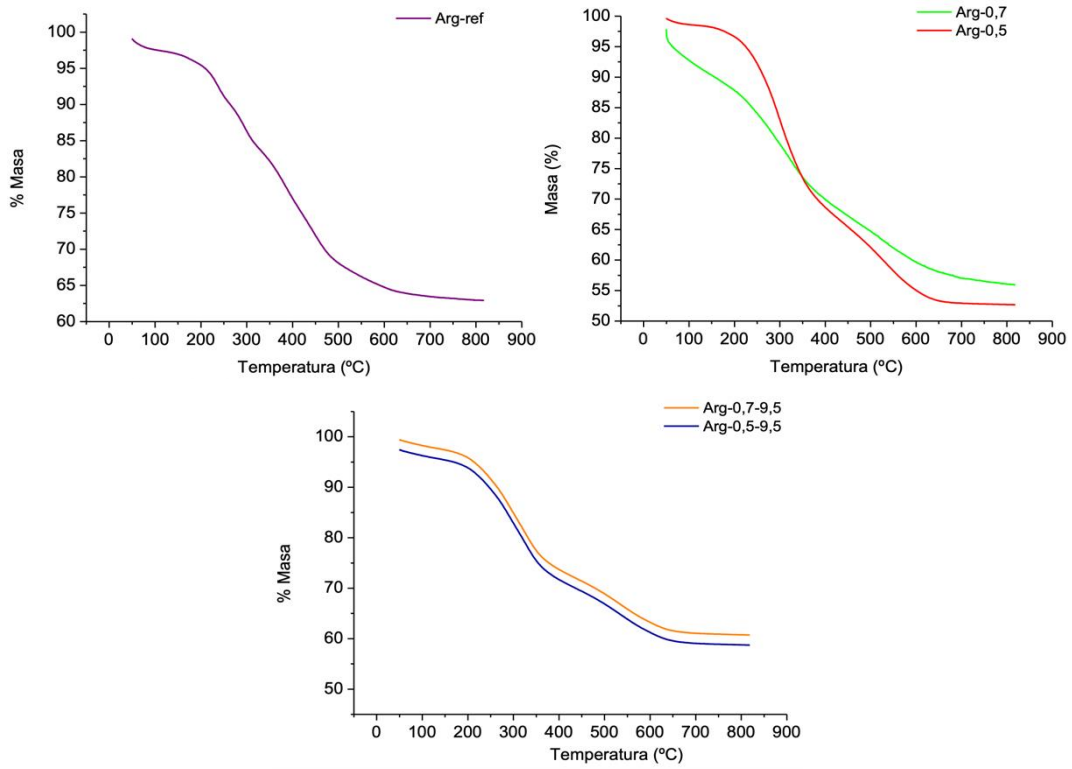


Figura 29. TGA de los materiales de referencia (superior-izquierda), con cambio de concentración (superior-derecha) y con variación pH y concentración DSDA (inferior).

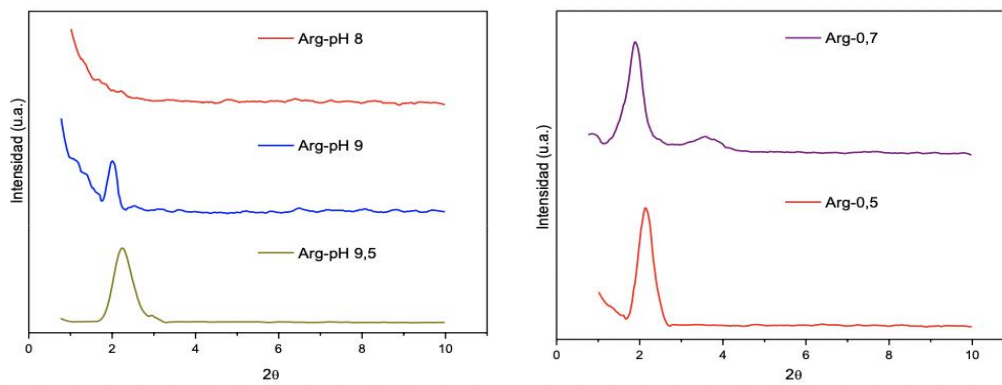


Figura 30. Espectros de difracción de rayos X de los materiales con cambio de pH (derecha) y con variación de la concentración (izquierda).

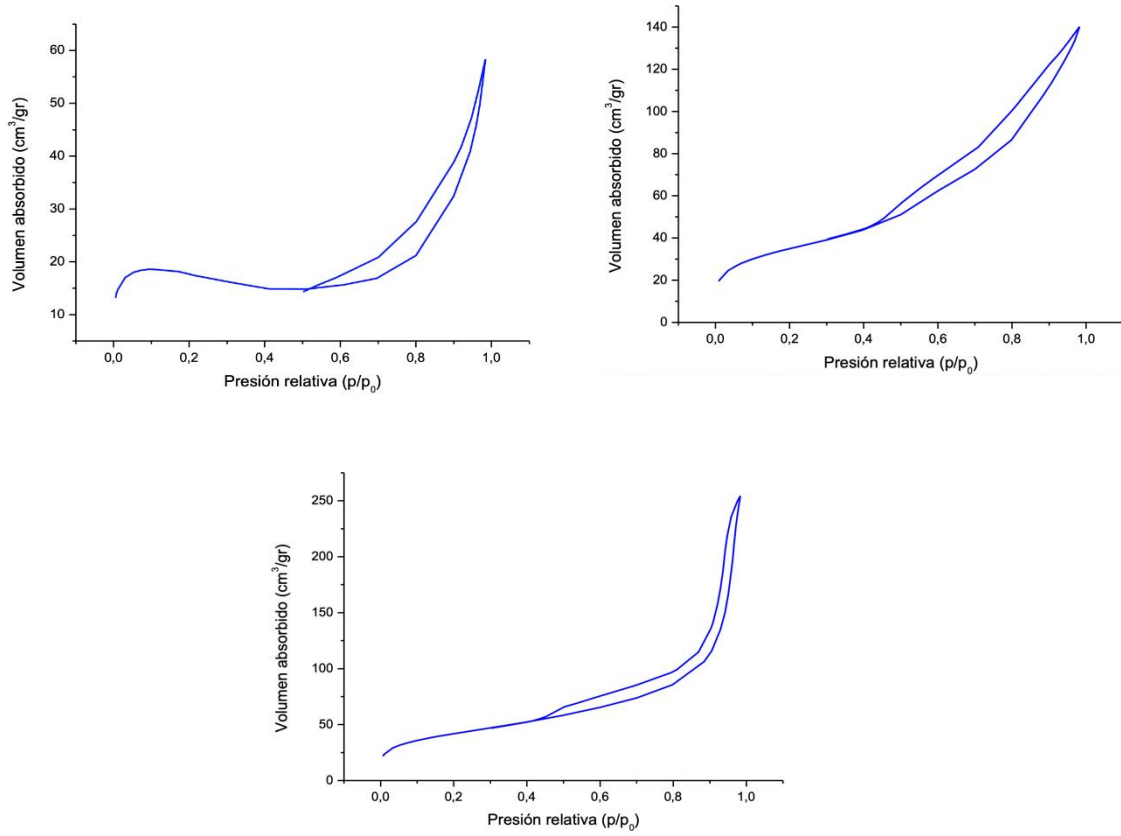


Figura 31. Isothermas de adsorción-desorción de N₂, pH 8 (superior-izquierda), pH 9 (superior-derecha) y pH 9,5 (inferior).

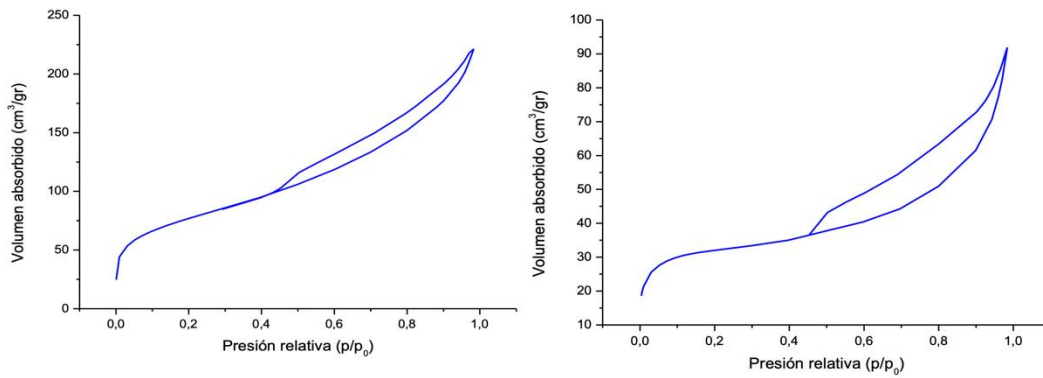


Figura 32. Isothermas de adsorción-desorción de N₂, Arg 0,7 (izquierda) y Arg 0,5 (derecha).

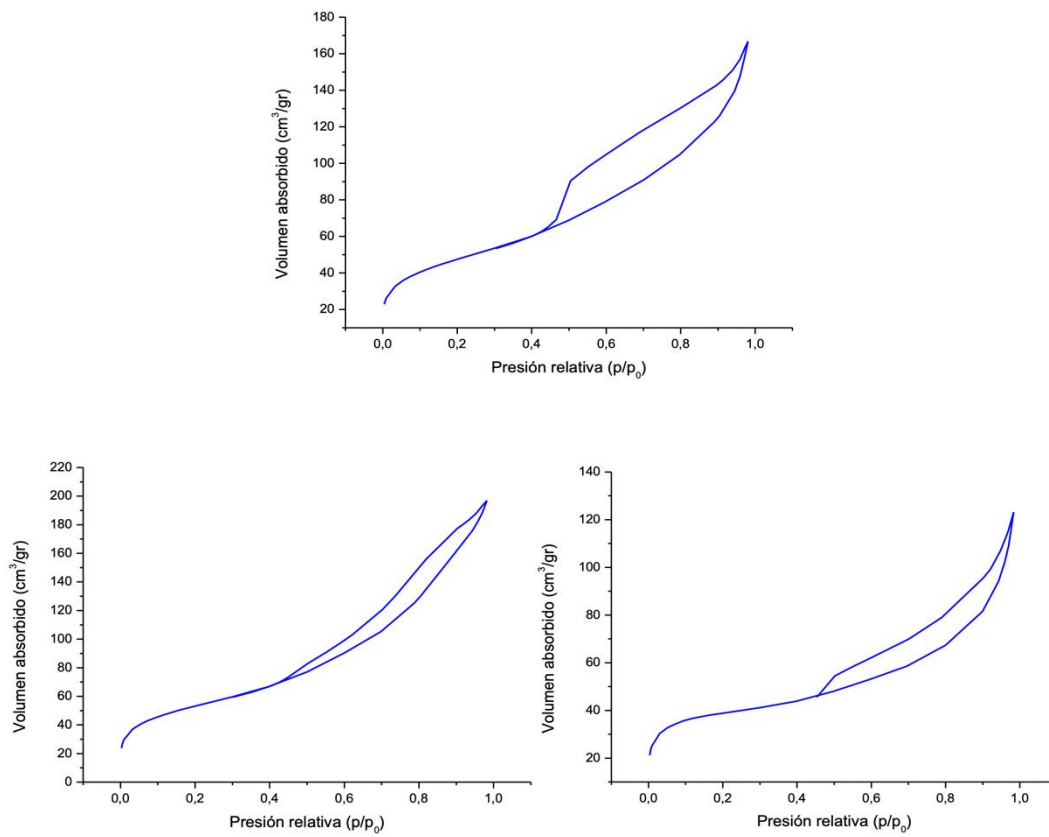


Figura 33. Isothermas de adsorción-desorción de N₂, Arg-ref-Fe (superior), Arg 0,7-9,5-Fe (izquierda) y Arg 0,5-9,5-Fe (derecha).