

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Inorgánica



TESIS DOCTORAL

**Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en
infección y cáncer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marina Martínez Carmona

Directora

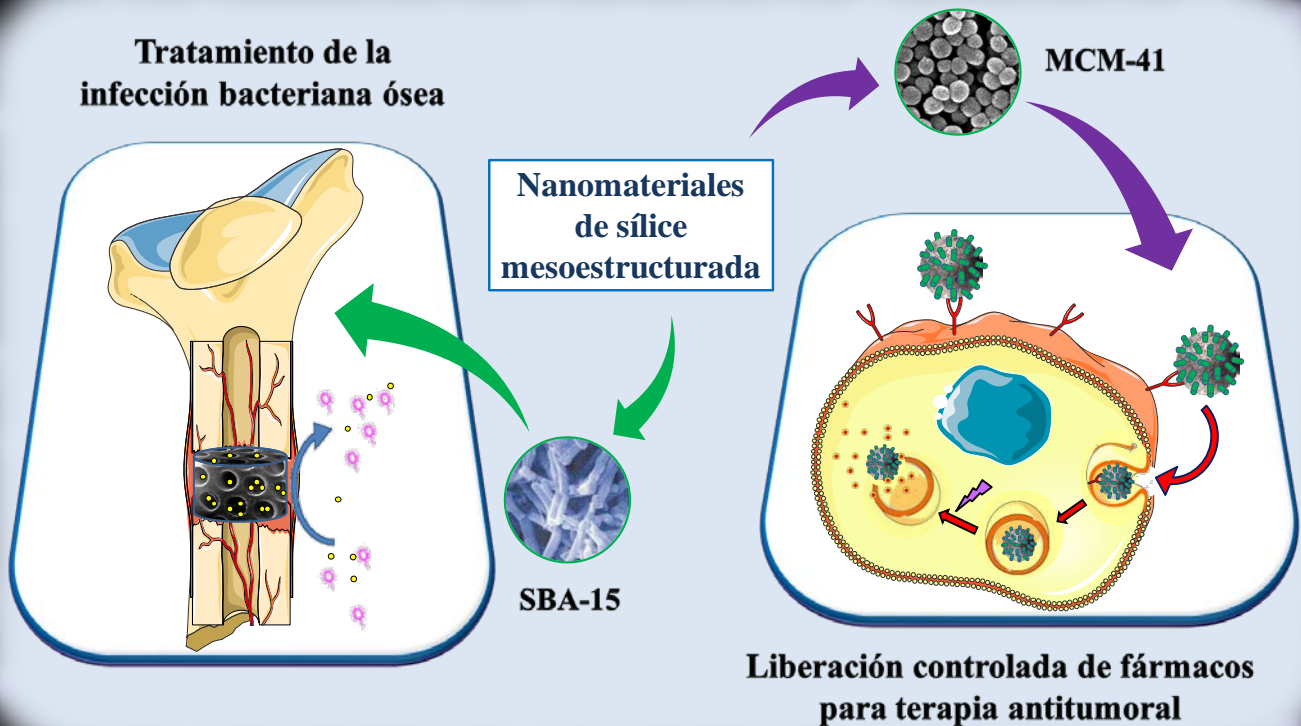
Montserrat Colilla Nieto

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica

Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer



Marina Martínez Carmona

**Tesis Doctoral mención Doctorado Europeo
Madrid 2016**

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica
Facultad de Farmacia



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer

Memoria presentada por

Marina Martínez Carmona

Directora

Dra. Montserrat Colilla Nieto

Para optar al Grado de Doctor con mención de Doctorado Europeo por la
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Dra. **Montserrat Colilla Nieto**, Profesora Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “**Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer**” ha sido realizada por la doctoranda **Marina Martínez Carmona** en el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo mi dirección y, autorizo su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Madrid, a 9 de julio 2016

Fdo.: Dra. Montserrat Colilla Nieto

Glosario de abreviaturas

Síntesis y caracterización de materiales

APTES	3-Aminopropiltriétoxissilano, del inglés <i>3-(Aminopropyl)triethoxysilane</i>
CES	Carboxietil silanotriol sal sódica, del inglés <i>Carboxyethyl silane triol sodium salt</i>
CL	Cristal líquido, del inglés <i>Liquid Cristal</i>
CMC	Concentración micelar crítica
CLCT	Del inglés <i>Cooperative Liquid Cristal Template</i>
ConA	Proteína Concanavalina A, del inglés <i>Concanavalin A</i>
CPX	Antibiótico cefalexina, del inglés <i>Cephalexin</i>
CTAB	Surfactante bromuro de hexadecil trimetilamonio del inglés <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
DAMO	N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimétoxissilano, del inglés <i>N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane</i>
DDS	Sistema de administración controlada de fármacos, del inglés <i>Drug Delivery System</i>
DLS	Dispersión de luz dinámica, del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i>
DOX	Doxorrubicina
D _p	Diámetro de poro
DPT	Diétilfosfatoetiltriétoxissilano, del inglés <i>diethylphosphatoethyltriethoxysilane</i>
DTA	Análisis termodiferencial, del inglés <i>Differential Thermal Analysis</i>
<i>e</i>	Espesor de la pared, del inglés <i>t_{wall}</i>
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva, del inglés <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EPR	Permeabilidad y retención aumentada, del inglés <i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, del inglés <i>Fourier Transform Infrared spectroscopy</i>
FA	Ácido fólico, del inglés <i>Folic Acid</i>
FA-R	Receptor de ácido fólico, del inglés <i>Folic Acid Receptor</i>
FFT	Transformada rápida de Fourier, del inglés <i>Fast Fourier Transform</i>
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, del inglés <i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
NMR	Resonancia magnética nuclear, del inglés <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
MCM-41	Nanomaterial de sílice mesoestructurada, del inglés <i>Mobil Composition of Matter-41</i>
NSN	Nanomateriales de sílice mesoestructurada
MSNs	Nanopartículas de sílice mesoporosa, del inglés <i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
P123	Surfactante <i>Pluronic</i> 123 (polióxido de etileno) ₂₀ (polióxido de propileno) ₇₀ (polióxido de etileno) ₂₀
PAA	Polímero de ácido poliacrílico, del inglés <i>polyacrylic acid polymer</i>
PEO	Polióxido de etileno, del inglés <i>Polyethylene oxide</i>
PPO	Polióxido de propileno, del inglés <i>Polypropylene oxide</i>
SBA-15	Nanomaterial de sílice mesoestructurada, del inglés <i>Santa Barbara Amorphous-15</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido, del inglés <i>Scanning Electron</i>

	<i>Microscopy</i>
S _{BET}	Superficie específica calculada por el método BET , del inglés <i>Brunauer, Emmer, Teller</i>
SN2	Sustitución nucleófila de tipo 2
STEM	Microscopía electrónica de transmisión y barrido, del inglés <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TEOS	Tetraetilortosilicato
Tf	Proteína transferrina, del inglés <i>Transferrin</i>
Tf-R	Receptor de transferrina, del inglés <i>Transferrin Receptor</i>
TGA	Análisis termogravimétrico, del inglés <i>ThermoGravimetric Analysis</i>
TLCT	Del inglés <i>True Liquid Cristal Template</i>
TMOS	Tetrametilortosilicato
TOP	Topotecan
UV	Ultravioleta
V _p	Volumen de poro
XRD	Difracción de rayos X, del inglés <i>X-Ray Driffraction</i>
XRF	Fluorescencia de rayos X, del inglés <i>X-Ray Fluorescence</i>

Cultivos microbiológicos y celulares

CM	Microscopía confocal, del inglés <i>Confocal Microscopy</i>
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	Bacteria Gram negativa <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FC	Citómetro de flujo, del inglés <i>Flow Cytometry</i>
FCUs	Unidades formadoras de colonias, del inglés <i>Colony-Forming Units</i>
MEM	Medio de cultivo esencial mínimo, del inglés <i>Minimum Essential Medium</i>
MTS	Compuesto de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximeto xifenil)-2-(4-sulfofenil), del inglés <i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)</i>
NADH	Nicotinamin adenin dinucleotido reducido, del inglés <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen</i>
NADPH	Nicotinamin adenin dinucleótido reducido fosfato reducido, del inglés <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate-buffered saline</i>
PI	Yoduro de propidio
<i>S. Aureus</i>	Bacteria Gram porsitiva <i>Staphylococcus Aureus</i>
THB	Caldo de cultivo Todd Hewith, del inglés <i>Todd Hewitt Broth</i>
TSA	Agar de soja trípica, del inglés <i>Tryptone Soya Agar</i>

RESUMEN/SUMMARY	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	15
1.1 Nanomateriales y nanomedicina	17
1.2 Nanomateriales de sílice mesoestructurada.....	18
1.3 Origen de los nanomateriales de sílice mesoestructurada	19
1.4 Síntesis de nanomateriales de sílice mesoestructurada	20
1.4.1. Surfactantes	21
1.4.2. Precursor de sílice	24
1.4.3. Mecanismo de formación de la mesoestructura	25
1.4.4. Eliminación del surfactante.....	27
1.4.5. Nanomateriales tipo MCM-41 y SBA-15	28
1.5 Funcionalización de nanomateriales de sílice mesoestructurada	32
1.6 Biocompatibilidad de los nanomateriales de sílice mesoestructurada	33
1.7 Aplicaciones biomédicas de los nanomateriales de sílice mesoestructurada	35
1.7.1. Infección bacteriana ósea	35
1.7.2. Tumores sólidos	38
CAPÍTULO 2: MATERIALES MESOESTRUCTURADOS TIPO SBA15 PARA EL TRATAMIENTO LOCAL DE LA INFECCIÓN BACTERIANA ÓSEA	41
2.1 Superficies zwiteriónicas.....	43
2.2 Nueva biocerámica zwiteriónica con acción antibacteriana dual.....	45

2.3 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución: una herramienta clave para entender la liberación de fármacos desde matrices mesoporosas	65
---	----

CAPÍTULO 3: NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA TIPO MCM-41 PARA TERAPIA ANTITUMORAL 85

3.1 Nanomateriales mesoporosos inteligentes para terapia antitumoral	87
3.2 Nanopartículas de sílice mesoporosa con una cubierta proteica que responde a la luz para terapia antitumoral altamente citotóxica	123
3.3 Liberación selectiva de topotecan en las células cancerosas mediante la vectorización de nanopartículas de sílice mesoporosa sensibles al pH.....	141
3.4. Efecto sinérgico antitumoral de nanopartículas de sílice mesoporosa sensibles al pH y vectorizadas con lectina	157

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS..... 175

ANEXO I: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN 185

ANEXO II: TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA BACTERIANA Y CELULAR 213

BIBLIOGRAFÍA 225

“Lo que le da su valor a una taza de barro es el espacio vacío que hay entre sus paredes.”

“Mold clay to form a bowl; It is the empty space which makes the bowl useful.”

Lao-tsé

Resumen / Summary

Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer

La nanomedicina es una disciplina científica que ha experimentado un gran apogeo en los últimos años, lo que ha permitido mejorar la calidad y la expectativa de vida en la sociedad contemporánea. Gracias a ella se han desarrollado nuevos nanomateriales, agentes terapéuticos y técnicas innovadoras para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Todo ello a partir de la comprensión de las bases moleculares de las distintas patologías, como enfermedades infecciosas, inmunes, neurodegenerativas, cáncer, etc.

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el desarrollo de biomateriales inteligentes para la prevención y/o el tratamiento de dos patologías diferentes, la infección bacteriana ósea y el cáncer, ambas de gran prevalencia e impacto sanitario y económico en la sociedad actual. Como punto de partida se han seleccionado los Nanomateriales de Sílice Mesoestructurada (NSM) por sus excelentes cualidades y su gran versatilidad, y se han diseñado y desarrollado estrategias innovadoras para dotar a estos sistemas de la funcionalidad adecuada dependiendo de los requisitos necesarios para tratar cada patología. Lao-Tsé, un antiguo filósofo chino considerado el fundador del taoísmo, dijo *“Lo que le da su valor a una taza de barro es el espacio vacío que hay entre sus paredes”*. Este proverbio refleja perfectamente la esencia de los NSM cuya principal característica es el elevado volumen de poro y el gran área superficial que presentan entre sus paredes de sílice amorfa. Sin embargo no es esta su única cualidad, ya que poseen una mesoestructura con tamaños de poro modificables, una estrecha distribución de tamaños de poro, una arquitectura porosa sistemáticamente controlable, y una superficie fácilmente funcionalizable; cualidades que convierten a estos nanomateriales en candidatos idóneos para la administración controlada de fármacos.

Partiendo de las anteriores premisas los **objetivos concretos** de esta Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

Objetivo 1. Elaboración de NSM zwitteriónicos tipo SBA-15 como implantes óseos capaces de prevenir la infección bacteriana, factor clave que en muchos casos provoca el rechazo del biomaterial. Este estudio se ha planteado desde dos enfoques distintos y a la vez complementarios: el diseño de superficies antiadherentes que eviten la adhesión bacteriana y la formación del “biofilm”; y la liberación local y controlada de antibióticos capaces de erradicar las bacterias circundantes.

Objetivo 2. Síntesis de NSM inteligentes basados en nanopartículas tipo MCM-41 capaces de dirigirse preferentemente a las células tumorales frente a células sanas y de liberar el citotóxico confinado en sus poros en respuesta a un estímulo externo o interno. Como estímulo externo se ha seleccionado la luz por su baja toxicidad y porque su aplicación puede ser controlada espacial y temporalmente mediante una selección precisa

de la zona y del tiempo de exposición. Como estímulo interno se ha seleccionado el pH, ya que permite la liberación del fármaco de forma activa como respuesta al pH ácido de los compartimentos intracelulares (endo/lisosomas) de las células cancerosas.

Para la consecución de los objetivos propuestos, se han optimizado las propiedades fisicoquímicas de los NSM tipo SBA-15 y MCM-41 en función de la patología a tratar, y dichas propiedades han sido ampliamente caracterizadas utilizando numerosas técnicas, tal y como se refleja en el **Anexo I**. Atendiendo a las diferentes características que presentan estos materiales y que se recogen en el **Capítulo 1**, se ha seleccionado el SBA-15 “en bulk” como material de partida para el diseño de pequeños implantes óseos que prevengan a nivel local la infección bacteriana, y las nanopartículas esféricas tipo MCM-41 para el tratamiento de tumores sólidos.

Desde su irrupción en el campo de los biomateriales, el SBA-15 ha sido utilizado en la fabricación de pequeños implantes óseos para la liberación local de uno o más antibióticos con el fin de tratar la infección bacteriana. Sin embargo, hoy día se buscan derivados más avanzados de estos materiales que permitan tanto inhibir la adhesión bacteriana como liberar antibióticos. En este trabajo se ha sintetizado un nuevo material con acción antibacteriana dual basado en un NSM tipo SBA-15. Este material posee una superficie zwiteriónica que inhibe la adhesión bacteriana (primera etapa de la formación de un “biofilm”) y que contiene cefalexina (CPX, un antibiótico de amplio espectro) cargada en los poros. Ambas funciones, antiadherente y antibiótica han sido evaluadas *in vitro* para conocer su potencial aplicación *in vivo*. En el **Anexo II** se recoge una descripción detallada de los fundamentos y técnicas empleadas para llevar a cabo dichos experimentos con cultivos microbiológicos así como los realizados con cultivos celulares.

En el desarrollo de otros NSM zwiteriónicos se ha observado que determinados tratamientos post-síntesis resultan ser demasiado agresivos y destruyen parcialmente su estructura mesoporosa. La degradación de las muestras ha sido detectable sólo gracias al uso de la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). Esta técnica ha resultado ser una herramienta clave para comprender la liberación de fármacos desde NSM. Toda la investigación llevada a cabo sobre estos materiales tipo SBA-15 se recoge detalladamente en el **Capítulo 2** de esta Tesis Doctoral.

El **Capítulo 3** demuestra la importancia de las nanopartículas de sílice mesoporosa tipo MCM-41 (MSNs) como dispositivos inteligentes para el tratamiento de tumores sólidos. Estos nanosistemas administrados vía sistémica son capaces de dirigirse selectivamente a la diana (órgano, tejido y/o célula tumoral) donde liberan su carga como respuesta a un estímulo que puede ser tanto externo como interno.

Como ejemplo de nanodispositivo sensible a un estímulo externo se presenta un sistema basado en MSNs cargadas con doxorubicina (DOX), con un recubrimiento proteico que actúa como agente de bloqueo o “capping” de los poros y que contiene transferrina (Tf) como agente de vectorización o “targeting”. Este sistema responde liberando el fármaco confinado en su interior tras ser irradiado con luz UV.

Se presentan también dos dispositivos que responden al pH como estímulo interno aprovechando la diferencia de pH entre el torrente sanguíneo ($\text{pH} \approx 7,4$) y el interior de los endo/lisosomas ($\text{pH} < 5,5$). El primero posee un recubrimiento de gelatina entrecruzada con glutaraldehído y tiene anclado ácido fólico (FA) como agente de vectorización. La gelatina actúa como recubrimiento multifuncional: reduciendo la salida prematura del fármaco desde el interior de los poros, protegiendo el topotecan (TOP, potente fármaco antitumoral cuya limitación clínica reside en que se degrada a pH fisiológico) y sirviendo como punto de anclaje al FA. El segundo sistema sensible al pH contiene DOX como citotóxico, está recubierto con un polímero a través de un enlace hidrolizable a pH ácido y presenta una lectina (la concanavalina A, ConA), como agente de vectorización. La ConA además tiene acción terapéutica por lo que este dispositivo produce un efecto sinérgico antitumoral.

La capacidad citotóxica de los distintos nanosistemas ha sido estudiada frente a líneas celulares adecuadas, mostrando en todos los casos mayor selectividad y muerte celular en células tumorales frente a células sanas, gracias al aumento de la internalización en las células cancerosas mediada por los receptores sobreexpresados en su superficie.

Los resultados obtenidos muestran un buen funcionamiento de los materiales en todos los casos y constituyen un avance prometedor en el campo de la nanomedicina. El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a 5 trabajos de investigación y a un artículo de revisión científica titulado “**Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy**”. Estos trabajos de investigación (4 de ellos publicados y 1 en proceso de preparación) se resumen en la **Figura R1**. Las **conclusiones más relevantes** derivadas de los mismos se presentan a continuación:

I. En general los NSM presentan unas propiedades únicas para la administración controlada de fármacos, pero a la hora de seleccionar el biomaterial más adecuado para una aplicación biomédica determinada hay que escoger aquel que reúna las características concretas necesarias para desempeñar dicha función. La robustez del SBA-15 ligada a su gran reactividad de superficie lo convierten en una buena opción para su utilización como pequeño implante óseo. Por el contrario, en el tratamiento de tumores sólidos, las nanopartículas de sílice tipo MCM-41, con un tamaño adecuado para acumularse en el tumor y con una distribución mesoporosa de canales individuales no conectados entre sí, constituyen la mejor solución para evitar una liberación prematura del fármaco cargado.

Dentro de NMS tipo SBA-15 para el tratamiento local de la infección:

II. Se ha diseñado y sintetizado el primer material biocerámico mesoporoso con carácter zwitteriónico y capacidad de inhibición bacteriana a pH fisiológico. Este logro ha sido posible gracias a que la superficie del SBA-15 ha sido provista de pares de iones zwitterión ($-\text{NH}_3^+/\text{SiO}^-$ y $>\text{NH}_2^+/\text{SiO}^-$) capaces de disminuir la adhesión bacteriana relativa desde un 100 % a valores inferiores a 0,1 %, en ensayos *in vitro* con

Staphylococcus aureus. Este material incorpora además el antibiótico CPX, que es liberado de forma sostenida durante periodos de tiempo prolongados, lo que contribuye a erradicar las bacterias en los alrededores del implante. Estos resultados se describen ampliamente en el artículo titulado “**A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability**”.

- III. La caracterización exhaustiva de los materiales mesoporosos mediante HRTEM es indispensable para comprender su comportamiento como sistema de administración de fármacos. Esta herramienta resulta de vital importancia para estudiar muestras mesoporosas funcionalizadas que han sido sometidas a tratamientos post-síntesis agresivos para obtener ciertos grupos orgánicos. Como se describe en el artículo titulado “**High resolution transmission electron microscopy: A key tool to understand drug release from mesoporous matrices**” los estudios realizados por HRTEM revelan daños mesoestructurales importantes en determinadas muestras tratadas con HCl concentrado. Esta alteración origina grandes cambios en los perfiles de liberación de los materiales, pasando de una liberación sostenida durante más de 2 semanas en el material original, a una liberación masiva donde el 100 % de la molécula cargada se libera en tan sólo 10 horas.

En el marco de las MSNs para terapia antitumoral:

- IV. Se ha desarrollado un nuevo nanosistema (MSN-Tf) capaz de transportar especies citotóxicas al interior de las células cancerosas y liberarlas en respuesta a un estímulo externo: la irradiación con luz UV. En este nanodispositivo, una corteza proteica que garantiza la biocompatibilidad del nanodispositivo, está anclada a la superficie de las MSNs a través de un ligando fotosensible y actúa al mismo tiempo como ligando de “targeting” y como agente de bloqueo de los poros. El dispositivo ha demostrado, a muy baja concentración de nanopartículas, una elevada capacidad citotóxica *in vitro* frente a varias líneas tumorales que sobreexpresan receptores de Tf. Todo este estudio se detalla en el artículo titulado “**Mesoporous silica nanoparticles grafted with light-responsive protein shell for highly cytotoxic antitumoral therapy**”.
- V. En el artículo titulado “**Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles**” se presenta un nuevo nanodispositivo (MSN-FA) capaz de cargar y proteger el TOP hasta ser internalizado por las células tumorales donde es liberado como respuesta a un estímulo interno: la disminución del pH endo/lisosomal. Las MSN-FA poseen un revestimiento de gelatina multifuncional responsable de proteger el TOP, de prevenir la liberación prematura del mismo antes de alcanzar las células tumorales, y de aportar puntos de anclaje para moléculas de vectorización como el FA.
- VI. Se ha diseñado un segundo dispositivo sensible al pH (MSN_{ConA}) con una gran capacidad antitumoral debido a la sinergia DOX/ConA que multiplica el poder citotóxico de cada elemento por separado. Como se expone en el trabajo de

investigación titulado "Synergistic antitumor effect of lectin-targeted pH-responsive mesoporous silica nanoparticles", la salida prematura del fármaco del interior de los poros se evita con un recubrimiento polimérico unido a la superficie de las MSNs mediante moléculas pH sensibles que se rompen una vez que han sido internalizadas por las células tumorales. Para evitar elementos redundantes la ConA actúa al mismo tiempo como agente antitumoral y de vectorización.

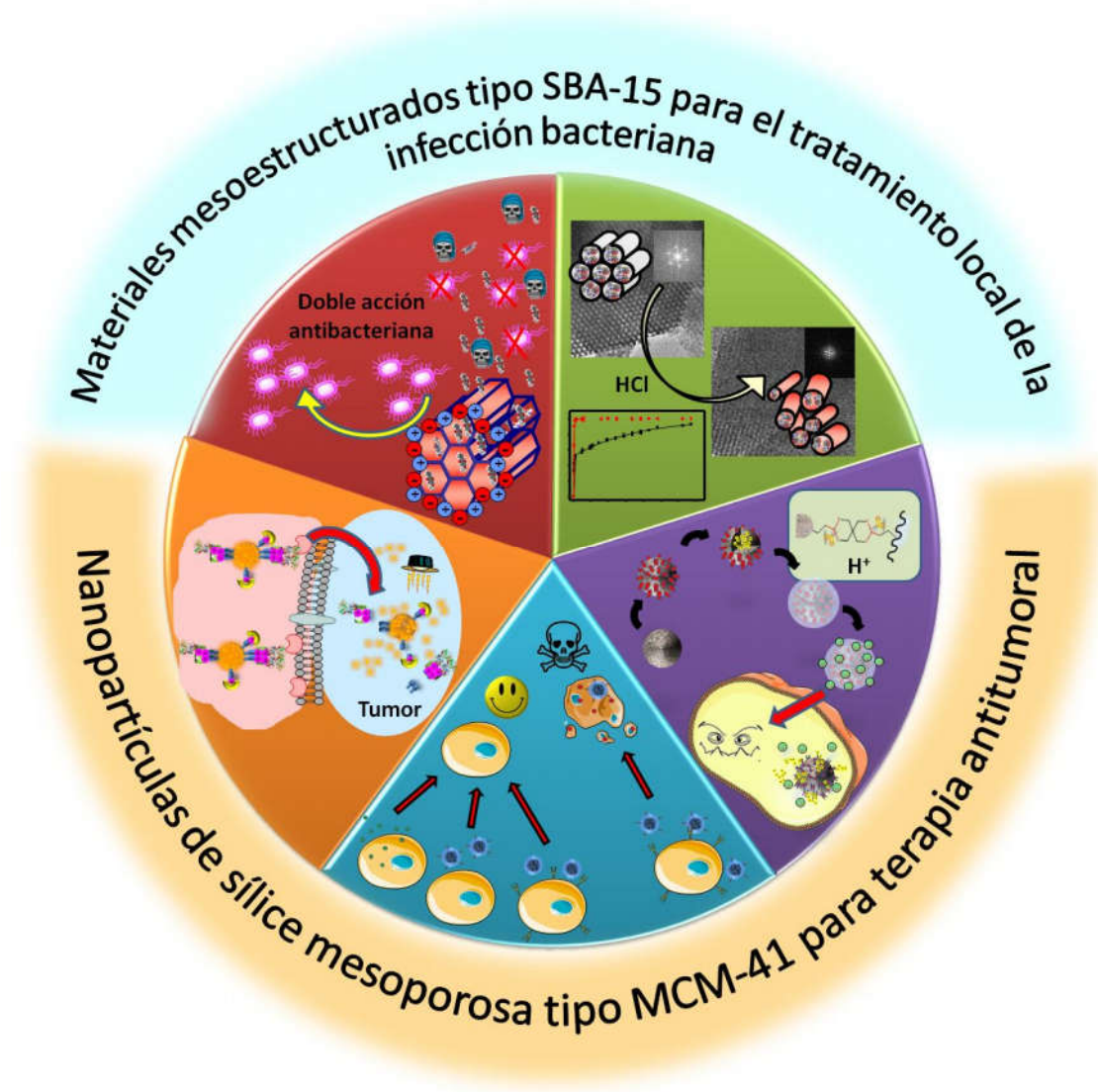


Figura R1. Esquema general que resume los cinco trabajos de investigación derivados de la presente Tesis Doctoral.

Mesostructured silica nanomaterials: application in infection and cancer

Nanomedicine is a scientific discipline that has experienced a great apogee in recent years, which has improved the quality and life expectancy in the contemporary society. As a result, new nanomaterials, therapeutic agents and innovative techniques for diagnosis, prevention and treatment of different diseases have been developed. All this from the understanding of the molecular basis of various pathologies, such as infections, immune or neurodegenerative diseases, cancer, etc.

This PhD Thesis has focused on developing intelligent biomaterials for the prevention and/or treatment of two different diseases: bacterial bone infection and cancer, both of them with high prevalence and sanitary-economic impact in current society. Mesostructured Silica Nanomaterials (NSM) have been selected as starting materials for their excellent qualities and great versatility, and innovative strategies have been designed and developed to provide these systems of the proper functionality depending on the requirements to treat each pathology. Lao-Tsé, an ancient Chinese philosopher considered the founder of Taoism, said “*Mold clay to form a bowl; It is the empty space which makes the bowl useful.*” This proverb perfectly reflects the essence of the NSM whose main characteristic is the high pore volume and high surface area present within their amorphous silica walls. However this is not the only quality, NSM also have a mesostructure with tunable pore sizes, narrow pore size distributions, systematically controllable porous architectures, and easily functionalizable surfaces; features that make these nanomaterials suitable candidates for controlled drug delivery.

On this basis the **specific objectives** of this PhD Thesis are listed below:

Objective 1. Development of SBA-15 type zwitterionic NSM as bone implants able to prevent bacterial infection, a key factor that in many cases is responsible of the biomaterial rejection. This study has been raised from two different and complementary approaches: the design of antifouling surfaces to prevent bacterial adhesion and "biofilm" formation; and local and controlled release of antibiotics that can eradicate the surrounding bacteria.

Objective 2. Development of smart nanodevices based on MCM-41 type NSM capable of preferentially targeting tumor cells from healthy ones and release the cytotoxic confined in their pores in response to an external or internal stimulus. Light has been selected as external stimulus for its low toxicity and because its application can be spatially and temporally controlled by precisely setting the area and the exposure time. As internal stimulus the pH has been chosen, allowing drug release in a controlled manner in response to acid pH of the intracellular compartments (endo/lysosomes) of cancer cells.

In order to achieve these objectives, the physicochemical properties of the SBA-15 and MCM-41 type NSM have been optimized as a function of the pathology to be treated, and these properties have been extensively characterized using numerous techniques, as reflected in **Annex I**. According to the different characteristics of these materials, listed in **Chapter 1**, SBA-15 "in bulk" has been selected as starting material for the design of small bone implants to prevent local bacterial infection, and spherical nanoparticles type MCM-41 for the treatment of solid tumors.

Since their appearance in biomaterials field, SBA-15 has been used in the manufacture of small bone implants for local delivery of one or more antibiotics in order to treat bacterial infection. However, currently more advanced derivatives of these materials that allow both bacterial adhesion inhibition and antibiotic release, are desired. Herein a new material based on SBA-15 type NSM with dual antibacterial capability has been synthesized. This material has a zwitterionic surface that inhibits bacterial adhesion (first stage of the biofilm formation), and contains cephalexin (CPX, a broad spectrum antibiotic) loaded into the pores. Both functions, antifouling and antibiotic, have been evaluated *in vitro* to estimate their potential usefulness *in vivo*. In **Annex II** a detailed description of the fundamentals and techniques used to carry out such experiments with microbiological cultures is collected as well as those made with cell cultures. While developing other zwitterionic NSM it has been observed that certain post-synthesis treatments result too aggressive and partially destroy their mesoporous structure. The degradation of the samples was detectable only through the use of high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM). This technique has proved to be a key tool for understanding drug release from NSM. All research carried out on these materials SBA-15 type is collected in detail in **Chapter 2** of this PhD Thesis.

Chapter 3 summarizes the importance of MCM-41 mesoporous silica nanoparticles (MSNs) as smart devices for the treatment of solid tumors. These nanosystems are able to selectively reach the target (organ, tissue and/or tumor cell) and once there release their cargo in response to an external or internal stimulus.

As example of a sensitive external stimulus nanodevice herein is presented a new nanosystem loaded with doxorubicin (DOX), with a protein coating which acts as cap of the pores and containing transferrin (Tf) as targeting agent. This nanosystem is able to release the drug trapped therein after being irradiated with UV light.

Two more devices that respond to pH as internal stimulus are also presented. Those nanocarriers take advantage of the pH differences between the bloodstream (pH \approx 7.4) and the endo/lysosomes (pH $<$ 5.5) interior. The first one has a gelatin coating crosslinked with glutaraldehyde and folic acid (FA) anchored as targeting agent. The gelatin acts as multifunctional coating: reduces the premature exit of the drug from the interior of the pores, protects the topotecan (TOP, an antitumor drug that inactivates at physiological pH) and serves as anchor point to the FA. The second pH sensitive nanosystem contains DOX, is coated with a polymer through an acidic pH hydrolyzable bond and has a lectin, concanavalin A (ConA), as targeting agent. ConA also has therapeutic action so this device has an antitumor synergistic effect.

The cytotoxicity of the different nanosystems has been studied against appropriate cell lines, showing in all cases greater selectivity and cell death in tumor cells compared with healthy ones, due to an increased internalization in cancer cells mediated by the overexpression of receptors on their surface.

Results show good performance of materials in all cases, which constitute a promising advance in the field of nanomedicine. The development of this PhD Thesis has led to 5 research publications and a scientific review entitled “**Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy**”. These research works (4 of them published and 1 in preparation) are summarized in **Figure R1** and the **main conclusions** are as follows:

I. NSM have unique properties for controlled drug delivery, but when selecting the most suitable biomaterial for a particular biomedical application the one that meets the specific characteristics necessary for this function must be chosen. The increased robustness of the SBA-15 linked to its high surface reactivity make it a good choice for using as small bone implant. By contrast, in the treatment of solid tumors, MCM-41 type nanoparticles, with an appropriate size for tumor accumulation and with a mesoporous distribution of not connected individual channels, constitute the best solution to prevent premature release of the loaded drug.

Within NSM SBA-15 type for treatment of local infections:

- II.** The first zwitterionic mesoporous bioceramic with dual antibacterial capacity at physiological pH has been designed and synthesized. This achievement has been possible by providing the surface of SBA-15 in bulk with pairs of zwitterionic ions ($-\text{NH}_3^+/\text{SiO}^-$ and $>\text{NH}_2^+/\text{SiO}^-$) capable of reducing relative bacterial adhesion from 100 % to values lower than 0.1 %, during the *in vitro* assays with *Staphylococcus aureus*. This material also includes CPX antibiotic, which is released steadily over long periods of time, contributing to eradicate the proliferation of bacteria around the implant. These results are fully described in the article entitled “**A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability**”
- III.** Deep characterization of mesoporous materials by HRTEM is essential to understand their behavior as drug delivery systems. This tool is vital to study functionalized mesoporous samples that have been subjected to aggressive post-synthesis treatments to obtain certain organic groups. As described in the article entitled “**High resolution transmission electron microscopy: A key tool to understand drug release from mesoporous matrices**” studies by HRTEM reveal important mesostructural damage in certain samples treated with concentrated HCl. This alteration causes great changes in the release profiles of materials, from a sustained release for more than 2 weeks in the untreated material to a burst release where 100 % of the charged molecule is released only after 10 hours in the treated one.

As part of the MSNs for antitumor therapy:

- IV. A new nanosystem (MSN-Tf) capable of carrying cytotoxic species within cancer cells and release them in response to UV light irradiation as external stimulus has been developed. In this nanodevice, a protein shell that ensures the nanodevice biocompatibility is anchored to the surface of the MSNs through a photosensitive ligand that simultaneously acts as targeting and pore blocking agent. The nanodevice has shown, at very low concentration, high cytotoxic ability *in vitro* against several tumor lines overexpressing Tf receptor. This study is detailed in the paper entitled **"Mesoporous silica nanoparticles grafted with light-responsive protein shell for highly cytotoxic antitumoral therapy"**.
- V. The manuscript **"Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles"** shows a new nanodevice (MSN-FA) able to load and protect TOP until its internalization by tumor cells, where it is released in response to an internal stimulus: endo/lisosomal pH decrease. The MSN-FA has a multifunctional gelatin coating responsible of the protection of TOP (a potent antitumor drug whose clinical limitation is that degrades at physiological pH), the prevention of the premature release of TOP before reaching the tumor cells and provide points for anchoring targeting molecules such as FA.
- VI. The second pH sensitive designed device, (MSN_{ConA}) has a high antitumor capacity because of the DOX/ConA synergy that multiplies the anticancer effect of each element individually. As discussed in the research work entitled **"Synergistic antitumor effect of lectin-targeted pH-responsive mesoporous silica nanoparticles"**, the premature release of the drug inside the pores is avoided with a polymeric coating bonded to the surface of MSNs by pH sensitive molecules that break once internalized by tumor cells. To avoid redundant elements ConA simultaneously acts as targeting and antitumor agent.

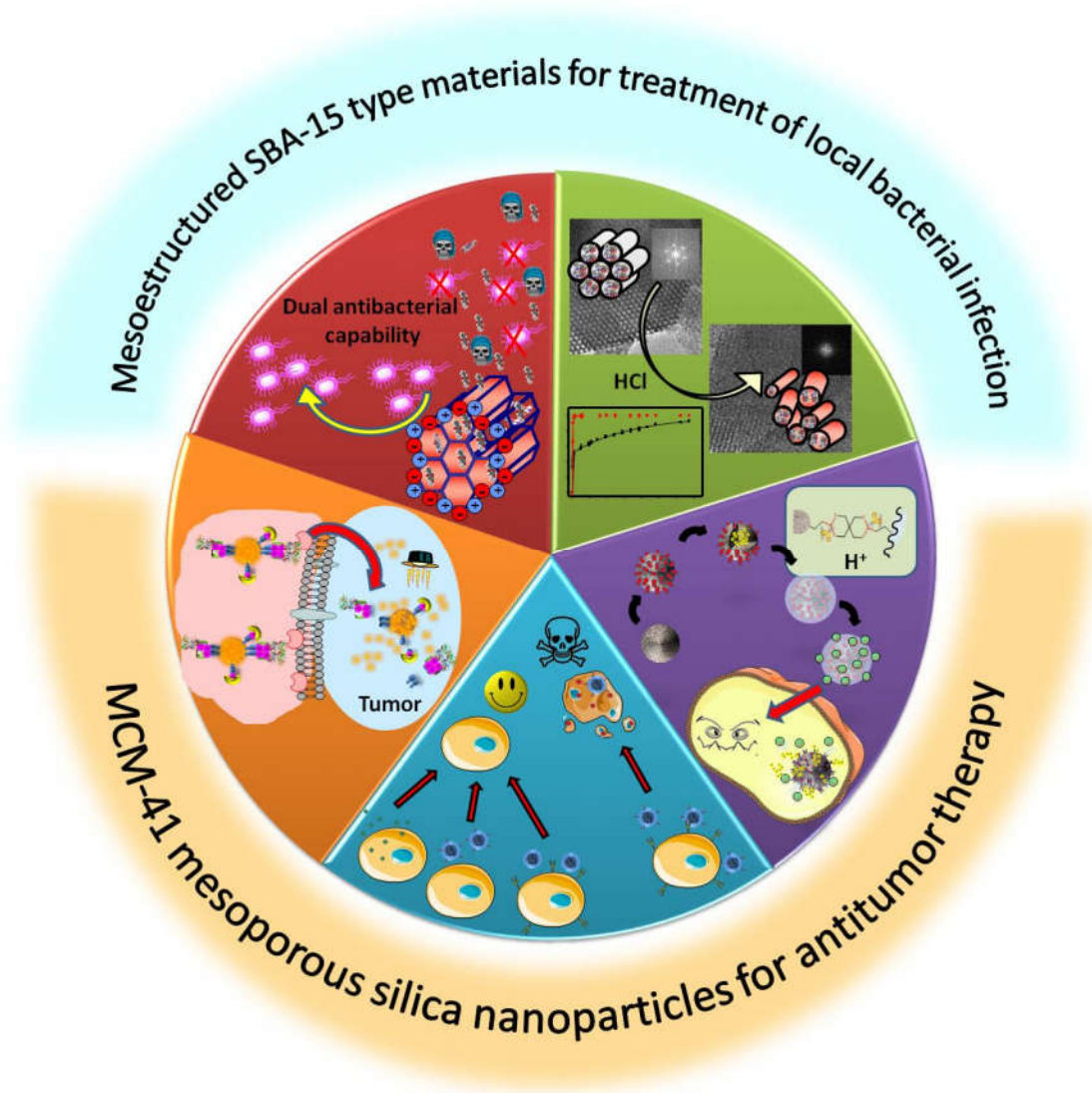
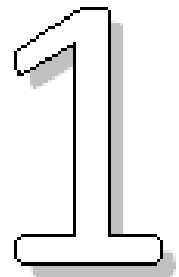


Figure R1. General scheme that summarizes the five research publications derived from this PhD Thesis.

“Un viaje de mil millas comienza con el primer paso.”

Benjamín Franklin

Introducción general



1.1 Nanomateriales y nanomedicina

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el tratamiento, diagnóstico, seguimiento y control de los sistemas biológicos.¹ En los Institutos Nacionales de Salud (*National Institutes of Health*, NIH) de los Estados Unidos definen la nanotecnología como "la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas mediante el control de la materia en una escala comprendida entre 1 y 100 nm, y la explotación de las nuevas propiedades y fenómenos en dicha escala".^{2,3} Por tanto, la clave de la nanotecnología no está en la miniaturización, sino en los cambios que se producen en las propiedades físicas y químicas de los materiales cuando se dividen hasta la escala nanométrica. Propiedades como la conductividad eléctrica, el color, la resistencia mecánica, o el punto de fusión, entre otras, pueden variar incluso radicalmente respecto a las del mismo material a escala macroscópica. Por ello, la nanotecnología tiene gran aplicación en diferentes campos, entre los que destacan la electrónica, la energía, la medicina y la ciencia de los materiales.⁴ Un nanomaterial es aquel constituido por partículas, tubos, fibras, etc. en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en la escala nanométrica (siendo 1 nm la milmillonésima parte de un metro $1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$). En la **Figura 1.1** se muestran algunos de los nanomateriales que se han desarrollado en los últimos años.¹ El mercado mundial de los nanomateriales ha experimentado un crecimiento extremadamente rápido. Se estima que cada año se producen 11 millones de toneladas de nanomateriales, con un valor de mercado de 20 millones de euros.^{5,6}

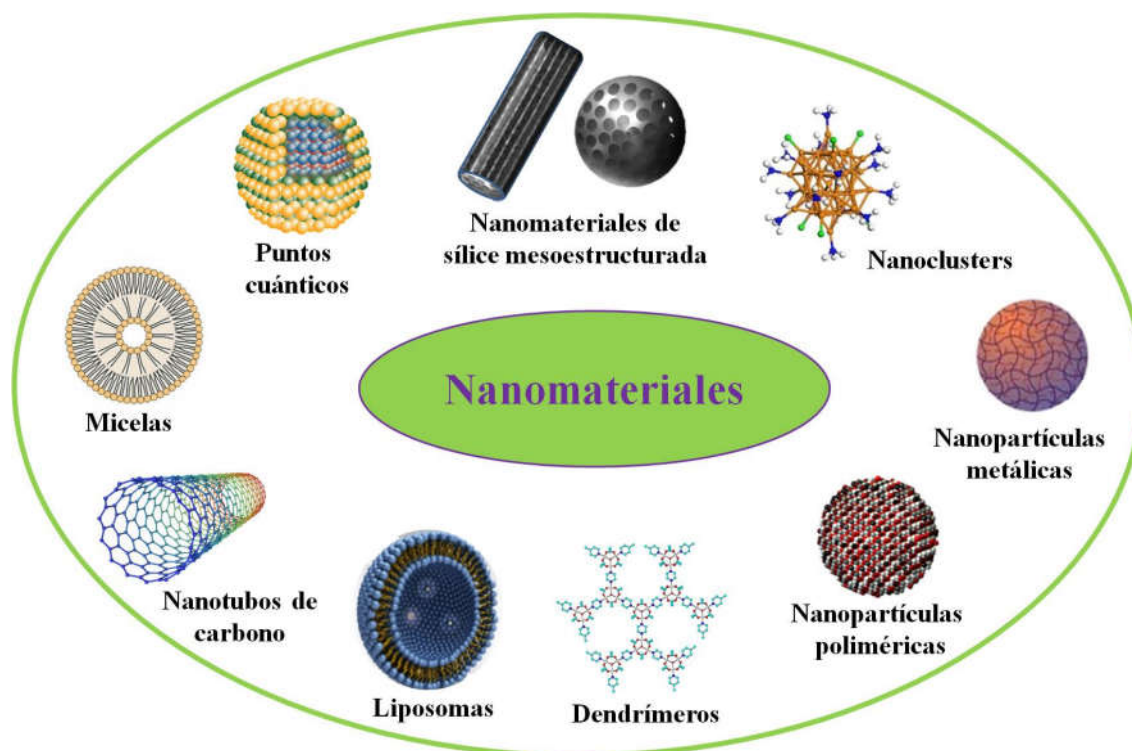


Figura 1.1 Esquema de algunos de los nanomateriales más empleados actualmente en nanomedicina.

En la actualidad son muchas y variadas las aplicaciones que los nanomateriales tienen en el ámbito de la salud, tanto a nivel de diagnóstico como de terapia.⁷ Entre los que están recibiendo un enorme interés a nivel de investigación, podemos destacar:

- Nanosensores que circulan dentro del cuerpo con el fin de monitorizar los niveles de glucosa, colesterol u hormonas en el organismo.⁸⁻¹⁰
- Nanopartículas inteligentes capaces de dirigirse específicamente a una zona dentro del cuerpo humano para suministrar con precisión una dosis programada de medicamento.¹¹⁻¹³
- Nanopartículas que combaten bacterias que son resistentes a los antibióticos.^{14,15}
- Nanomateriales para la sustitución de tejidos capaces de prevenir la infección bacteriana.¹⁶⁻¹⁸
- Nanomateriales para la separación y purificación de biomoléculas y células.¹⁹⁻²¹
- Nanomateriales para la mejora del contraste en pruebas de Resonancia Magnética Nuclear.²²⁻²⁴

Si bien todas estas líneas de investigación están en pleno auge, las mayores esperanzas están depositadas en aquellas relacionadas con la administración local de medicamentos.

Como se demostrará a lo largo de esta Tesis Doctoral, de entre todos los nanomateriales existentes, aquellos basados en sílice mesoestructurada poseen unas cualidades únicas que los convierten en una buena elección para la administración controlada de fármacos en el tratamiento de distintas patologías.^{25,26}

1.2 Nanomateriales de sílice mesoestructurada

Los Nanomateriales de Sílice Mesoestructurada (NSM) son únicos en varios sentidos. Como se observa en la **Figura 1.2** los NSM poseen una estructura muy particular, que exhibe orden a escala mesoscópica mientras está desordenada a nivel atómico, como ocurre en los vidrios convencionales.

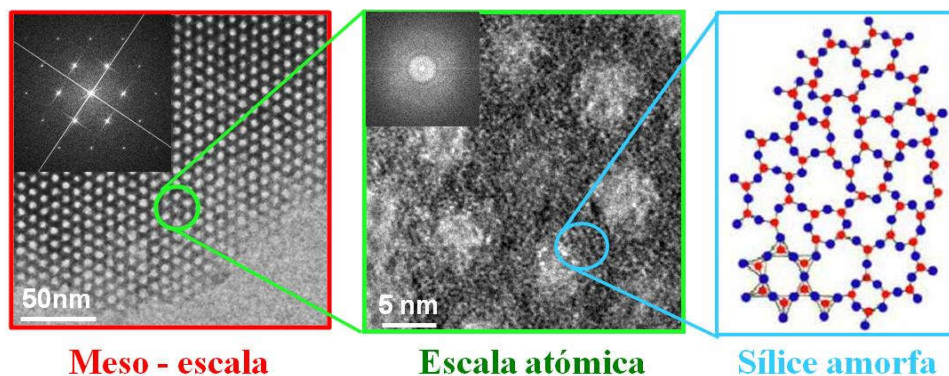


Figura 1.2 Estudio del orden estructural de los NSM a distintas escalas. Adaptada de la referencia 27

Asimismo presentan distribuciones de tamaños de poro estrechas y modulables que oscilan entre 2 y 30 nm, una arquitectura porosa sistemáticamente controlable, una elevada área superficial (500-1500 cm²/g), un gran volumen de poro (~1 cm³/g) y un elevado número de grupos silanol (Si-OH) en superficie que permiten modificar fácilmente la naturaleza fisicoquímica del material mediante funcionalización.²⁷ Además pueden sintetizarse con morfologías muy diversas, como material en “bulk”,^{28,29} fibras,³⁰ láminas,^{31,32} esferas,³³ etc.

Estas características los convierten en candidatos adecuados para una gran diversidad de aplicaciones como adsorción,^{34,35} separación,³⁶⁻³⁸ catálisis,³⁹⁻⁴² semiconductores nanométricos,^{43,44} etc. Sus aplicaciones en nanomedicina incluyen, entre otras, la administración controlada de fármacos,⁴⁵⁻⁵⁰ la regeneración de tejido óseo,⁵¹⁻⁵⁴ la transfección génica,⁵⁵⁻⁵⁸ marcadores celulares^{59,60} o la inmovilización de proteínas o enzimas.⁶¹⁻⁶³ La capacidad de los NSM para albergar moléculas biológicamente activas en el interior de sus poros para su posterior liberación ha despertado un creciente interés en la comunidad científica como sistemas de administración controlada de fármacos (*Drug Delivery Systems*, DDS). De hecho, desde que en el año 2001 fueron propuestos por primera vez como DDS por el grupo liderado por la Prof. M. Vallet-Regí,⁶⁴ los artículos y el número de citas recibidas cada año en este área han aumentado de forma exponencial (**Figura 1.3**).



Figura 1.3 Número de publicaciones y de citas anuales recibidas desde el año 2001 hasta julio de 2016 sobre “Mesoporous materials drug delivey” a través de la fuente *ISI Web of Knowledge*.

1.3 Origen de los nanomateriales de sílice mesoestructurada

En los años 70 surge la necesidad de encontrar alternativas a los combustibles derivados del crudo del petróleo y nace la primera crisis energética a nivel global. En 1976 la empresa Mobil Oil Corporation desarrolló un proceso para convertir el metanol en una fracción hidrocarbonada que contenía compuestos aromáticos y alifáticos con puntos de ebullición y propiedades similares a los de la gasolina. En esta reacción las

zeolitas se empleaban como catalizadores pero el rendimiento era insuficiente. Durante el proceso se formaba carbono coke que bloqueaba los microporos de las zeolitas y limitaba la difusión de los reactivos y los productos. Como respuesta a la necesidad de ampliar el tamaño de poro de las zeolitas, en 1992 dicha empresa descubrió una nueva familia de NSM^{28,65} con tamaños de poro comprendidos entre 2 y 10 nm que se denominaron MCM-*n* (*Mobil Composition of Matter*) series donde *n* es un número que corresponde a una estructura específica de poro y a un agente surfactante concreto. Simultáneamente el grupo de investigación dirigido por el Prof. Kuroda en la Universidad de Waseda en Japón diseñó un mecanismo alternativo para sintetizar NSM.⁶⁶ Este estaba basado en la formación de láminas de sílice en presencia de kanemita y la posterior modelización de la estructura porosa por adición e internalización de un surfactante catiónico. Sin embargo con el tiempo esta ruta se ha abandonado, pues se vio que no era generalizable a otros tipos de estructuras que han cobrado más importancia en la comunidad científica.

Posteriormente en 1998 Zhao y col.^{29,67} diseñaron los primeros materiales de sílice mesoporosa sintetizados con polímeros tribloque no iónicos y lograron aumentar el tamaño de poro hasta valores de 30 nm. Estos materiales se denominaron SBA-*n* (*Santa Barbara Amorphous*) series. Con el tiempo aparecieron otras estructuras mesoporosas como las MSU-*n* (*Michigan State University*) series,⁶⁸ KIT-1 (*Korea advanced Institute of science and Technology no.1*) series⁶⁹ and FSM-16 (*Folded Sheed Material no. 16*) series.⁷⁰ De entre todos estos NSM los más conocidos y estudiados son el MCM-41 y el SBA-15, que desde su descubrimiento han ido ganando importancia rápidamente con el tiempo, no sólo en el área de catálisis sino también en los campos de la separación, el intercambio iónico, el tamizado molecular, la adsorción y cada vez más en la liberación controlada de fármacos.^{45,50,54,71,72}

1.4 Síntesis de nanomateriales de sílice mesoestructurada

La síntesis de los NSM se basa en el método sol-gel en presencia de surfactantes como agentes directores de la estructura. Para ello se sigue una aproximación ascendente “bottom-up”, es decir, construir unidades organizadas complejas a partir de moléculas más pequeñas y sencillas, y empleando los conceptos de química supramolecular, la cual estudia el ordenamiento y ensamblaje de moléculas por fuerzas intermoleculares. Este método permite adaptar la estructura, la composición y el tamaño de los poros; bien modificando durante la síntesis la estequiometría de los reactivos, la naturaleza de los surfactantes, los productos químicos auxiliares (como agentes de hinchamiento de micelas) o las condiciones de reacción; o bien mediante técnicas de funcionalización posteriores a la síntesis. La **Figura 1.4** muestra algunas de las estructuras mesoporosas que pueden presentar los NSM.^{73,74}

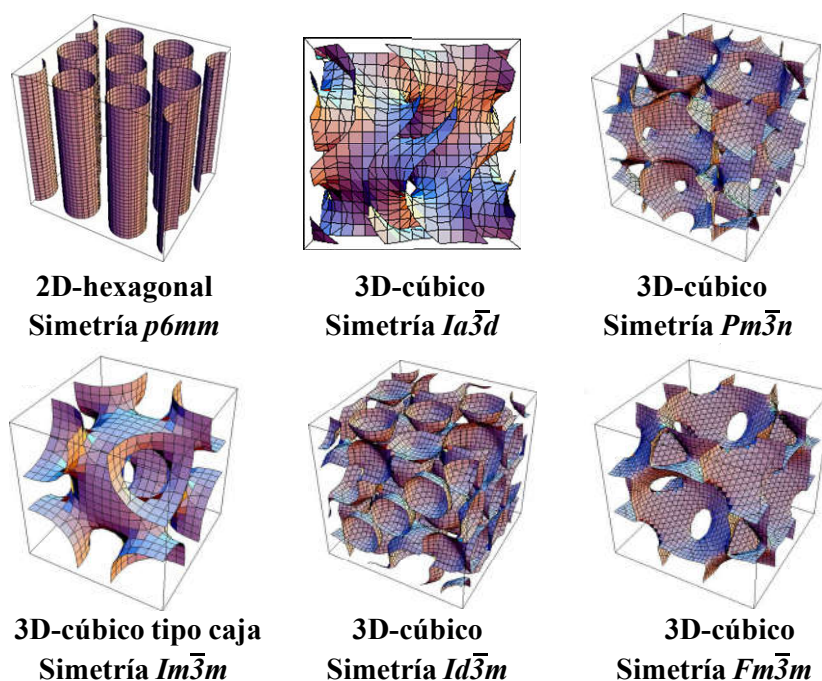


Figura 1.4 Reconstrucción de algunas estructuras mesoporosas y sus simetrías. Adaptada de la referencia 27.

La síntesis de los NSM es relativamente sencilla y requiere el empleo de dos componentes fundamentales, un precursor de sílice y un surfactante como agente director de la estructura.

1.4.1. Surfactantes

Como se muestra en la **Figura 1.5A**, un surfactante es una molécula anfifílica, es decir, posee una región hidrofílica (que tiene afinidad por el agua) y otra hidrofóbica (que es repelida por el agua). Debido a este carácter anfifílico, los surfactantes forman micelas en disolventes apolares o en disoluciones acuosas (presentando en el exterior de la micela en contacto con el fluido, su parte hidrofóbica o hidrofílica respectivamente) para reducir la energía libre en el sistema (**Figura 1.5B**). Existen varios tipos de surfactantes que, en función de la naturaleza de su región polar, pueden clasificarse en: catiónicos como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB),^{28,65} aniónicos como el ácido N-myristoyl-L-glutámico,⁷⁵ no iónicos como por ejemplo el Pluronic®,⁶⁷ neutros como aminas de cadena larga, o anfotéricos como la N-docecil glicina.⁷⁶ A modo de ilustración en las **Figuras 1.5 C y D** se muestran el CTAB y el Pluronic® P123, los dos surfactantes que se han empleado en el desarrollo de esta Tesis.

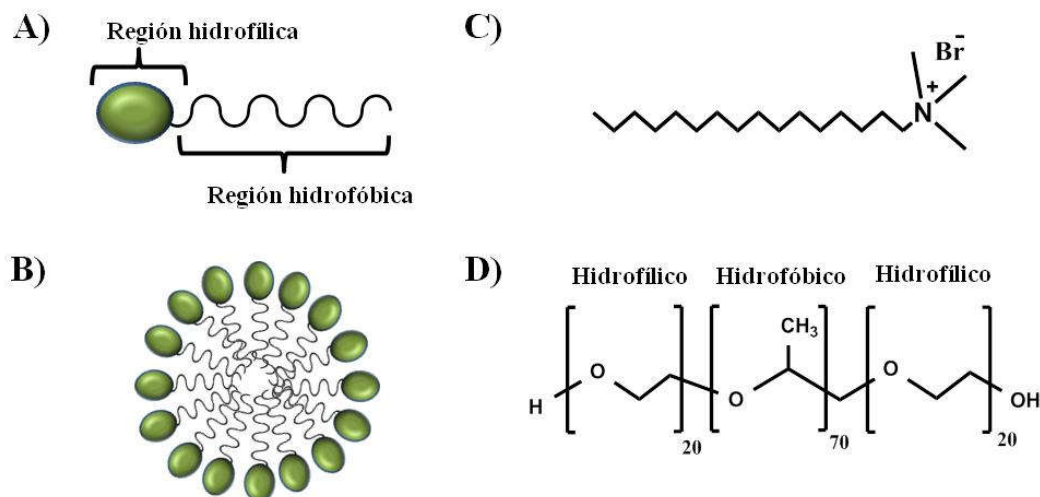


Figura 1.5 A) Esquema de una molécula de surfactante; B) micela en un medio acuoso; C) CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), un surfactante catiónico; D) P123 (polióxido de etileno)₂₀ (polióxido de propileno)₇₀ (polióxido de etileno)₂₀, un copolímero tribloque no aniónico.

La forma de las micelas depende de la naturaleza del surfactante y de lo que se denomina parámetro de empaquetamiento g , definido por la siguiente ecuación:

$$g = \frac{V}{a_0 l_c}$$

Donde V es el volumen efectivo de la porción hidrofóbica del surfactante, a_0 es el área superficial del grupo que forma la cabeza hidrofílica, y l_c es la longitud de la cadena hidrofóbica.

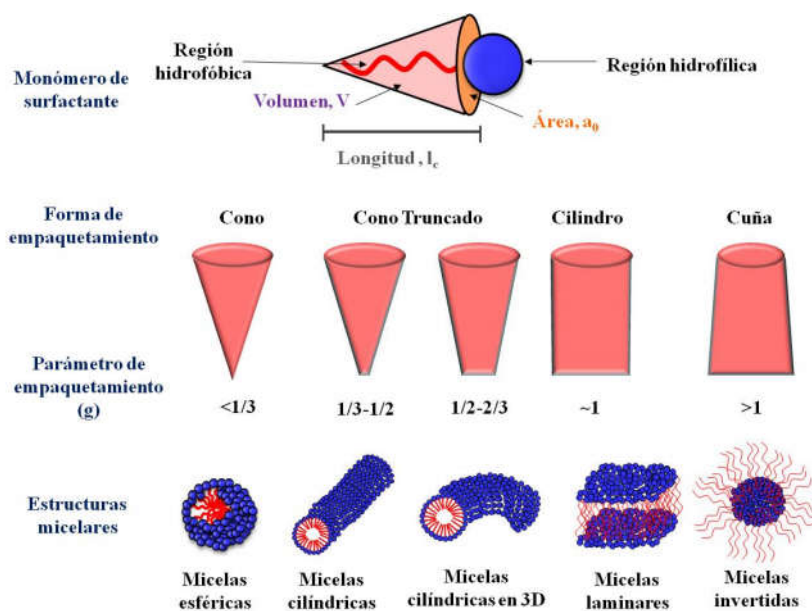


Figura 1.6 Representación esquemática de la relación entre el parámetro de empaquetamiento de un surfactante catiónico y la estructura micelar resultante. Adaptada de la referencia 27.

El valor del parámetro g determina la geometría básica del surfactante, lo que influye, a su vez, en la forma de las micelas.⁷⁷ En general, valores pequeños de este parámetro conducen a estructuras micelares que poseen un radio de curvatura pequeño, mientras que para un valor de $g = 1$ se formará una estructura laminar. La **Figura 1.6** ilustra la influencia del parámetro g en la formación de distintas estructuras micelares.

El grado de micelización, la forma de las micelas y su agregación para formar cristales líquidos depende de la concentración de surfactante. A bajas concentraciones las moléculas del surfactante se encuentran de forma libre disueltas en la disolución acuosa. A concentraciones ligeramente superiores y por encima de la temperatura de *Kraft*,⁷⁸ se alcanza la Concentración Micelar Crítica 1 (CMC1) a partir de la cual las moléculas individuales de surfactante comienzan a agregarse formando esferas, es decir, micelas. A concentraciones mayores (CMC2) la cantidad de disolvente disponible entre moléculas disminuye y las micelas esféricas se unen entre sí formando micelas cilíndricas alargadas. Tras este punto si la concentración aumenta ligeramente se alcanza lo que se conoce como fase de cristal líquido (CL) y las micelas cilíndricas se agregan de forma hexagonal. A medida que la concentración sigue aumentando estas evolucionan hacia un cristal líquido cúbico bicontínuo seguido de una fase de CL laminar. A veces, a muy altas concentraciones de surfactante se obtiene la fase inversa y el agua se solubiliza en el interior de las micelas y las cabezas polares se orientan hacia el interior. Esta evolución en el proceso de micelización en función de la concentración de surfactante es lo que se conoce como diagrama de fases del surfactante y permite entender la formación de los NSM según la aproximación del CL. A modo de ejemplo, en la **Figura 1.7** se muestra de forma esquemática el diagrama de fases del CTAB en agua.

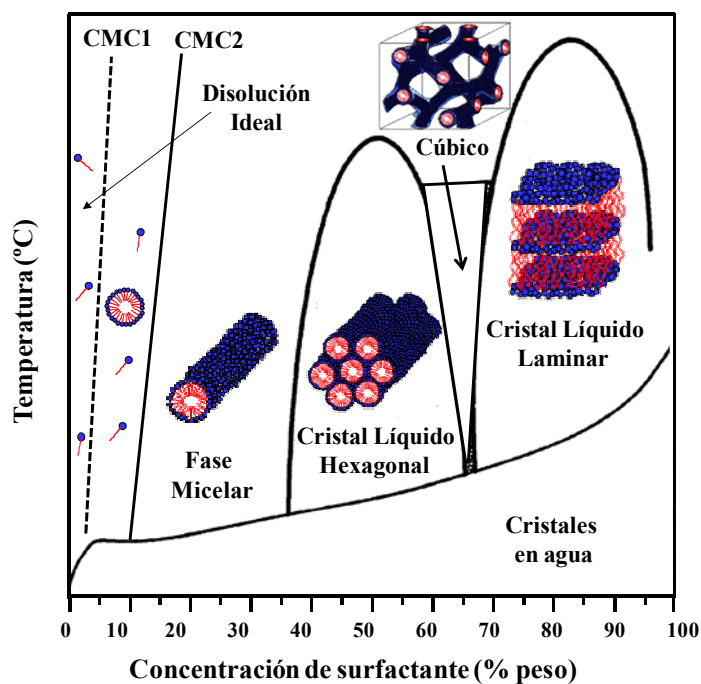


Figura 1.7 Esquema del diagrama de fases de CTAB en agua. Adaptada de la referencia 27.

1.4.2. Precursor de sílice

La síntesis de los NSM se lleva a cabo mediante el denominado proceso sol-gel el cual se basa en la hidrólisis y policondensación de los precursores de tipo alcóxido.⁷⁹ Para este proceso de síntesis se pueden emplear varios tipos de precursores de sílice, los más comunes son los alcoxisilanos, especialmente el tetrametil ortosilicato (TMOS) o el tetraetil ortosilicato (TEOS) (**Figura 1.8A**). Aunque también pueden emplearse otros alcóxidos con cadenas alquílicas más largas,⁸⁰ silicato de sodio^{81,82} o combinaciones de los mismos.⁸³

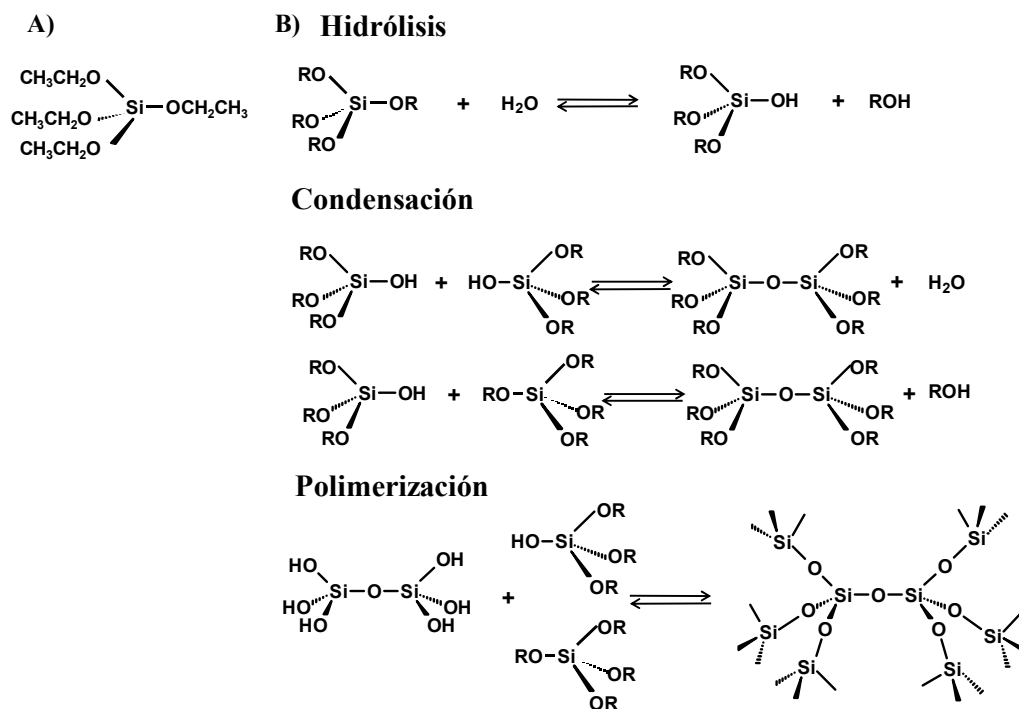


Figura 1.8 A) Fórmula química del TEOS, precursor de sílice más habitual B) Procesos de hidrólisis, condensación y polimerización del TEOS durante la síntesis de los NSM.

Debido a su inmiscibilidad en agua, es frecuente la adición de un co-disolvente (alcohol) como agente homogeneizador. Sin embargo, el propio alcohol es generado como un subproducto durante la reacción de hidrólisis de los alcoxisilanos, por lo que es suficiente homogeneizar el sistema inicial de fases separadas para que no sea necesaria la adición del alcohol. Cuando se requiere que el proceso de hidrólisis ocurra de forma rápida y completa, es un ácido o una base la que actúa como catalizador del proceso. En ambos casos la reacción ocurre por ataque nucleófilo de un átomo de oxígeno de una molécula de agua al átomo de silicio, como se ilustra en la **Figura 1.8B**. La hidrólisis de alcoxisilanos es un proceso que transcurre en dos etapas y en el que se forma un intermedio pentacoordinado. De acuerdo a un mecanismo tipo SN2, un grupo alcóxido es reemplazado por un grupo hidroxilo con inversión del tetraedro de silicio. En una etapa posterior, las moléculas de silano hidrolizadas condensan y forman enlaces siloxano (Si-O-Si). La condensación también tiene lugar por medio de una reacción entre una molécula de alcoxisilano y un grupo silanol. Si la condensación se produce en numerosos

puntos tiene lugar la polimerización. Aunque las etapas de hidrólisis y condensación son representadas como reacciones separadas en realidad ocurren simultáneamente. Sin embargo, la velocidad de reacción de ambos procesos tiene una dependencia diferente con el pH, lo que determina la estructura del material silíceo.^{84,85} Bajo condiciones ácidas, la hidrólisis se ve favorecida y la condensación es la etapa determinante de la velocidad. Además, como el número de enlaces siloxano alrededor de un átomo central de silicio aumenta, la velocidad de condensación disminuye. Esto conduce a estructuras poliméricas largas débilmente ramificadas. Por otra parte, bajo condiciones básicas, la condensación está favorecida y la hidrólisis es la etapa determinante. En este caso, la velocidad de reacción incrementa con el incremento de enlaces siloxano. De este modo se forman preferentemente estructuras ramificadas.

1.4.3. Mecanismo de formación de la mesoestructura

Desde su descubrimiento a principios de los años 90 numerosos grupos de investigación han tratado de elucidar el mecanismo de formación los NSM, siendo el MCM-41 el material objeto de un estudio más exhaustivo.⁸⁶ Así, se han propuesto distintos mecanismos que coinciden en que las moléculas de surfactante juegan un papel fundamental en la ordenación de los precursores de sílice en disolución pero discrepan en el tipo de interacción que se establece entre ellos. Los investigadores de la Mobil Oil propusieron el "Liquid-Crystal Template" (LCT) como mecanismo por el cual se formaban estas mesoestructuras ordenadas.^{28,65,87} El término "template" se asociaba con el CL porque este determinaba la mesoestructura del material sólido. Según este modelo los surfactantes son los encargados de moldear la estructura porosa interna del material, ya que forman agregados micelares en disolución. El precursor silíceo una vez hidrolizado, condensa y polimeriza alrededor de dichos agregados. Dentro de este mecanismo Beck y col.⁶⁵ barajaron dos rutas distintas para la obtención de la misma estructura (**Figura 1.9**).

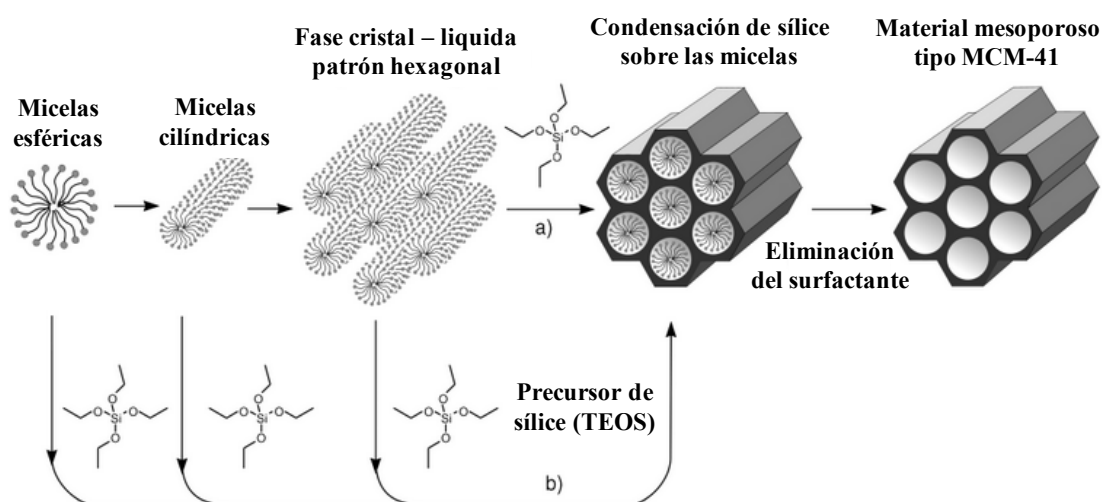


Figura 1.9 Formación del MCM-41 por agentes directores de estructura via: a) "True Liquid Cristal Template", b) "Cooperative Liquid Cristal Template". Adaptada de la referencia 88.

1. “True Liquid Cristal Template” (TLCT). Según esta teoría, las moléculas de surfactante en medio acuoso, bajo unas determinadas condiciones de temperatura y concentración, pasan por distintas fases de agregación hasta producir estructuras hexagonales ordenadas denominadas CL. Esta ordenación es previa a la adición de las especies inorgánicas, que posteriormente migran y polimerizan alrededor de las estructuras hexagonales. Sin embargo, la ruta TLCT no está totalmente aceptada considerando que algunos materiales MCM-41 pueden ser formados a concentraciones de surfactante muy por debajo de la CMC requerida para la formación de la fase de CL hexagonal.^{89,90} Además Davis y col.⁹⁰ mediante medidas de ¹⁴N NMR realizadas *in situ* en el medio de síntesis concluyeron que la fase líquida cristalina no está presente en el medio de síntesis durante la formación de MCM-41. Sin embargo, se ha demostrado que bajo determinadas condiciones de síntesis la ruta TLCT es válida.⁹¹
2. “Cooperative Liquid Cristal Template” (CLCT). Esta teoría sostiene que el precursor de sílice de alguna manera media en la ordenación de los surfactantes para formar las estructuras hexagonales. La ruta CLCT sí explicaría la formación de la fase de CL hexagonal incluso a concentraciones muy bajas de surfactante ya que en este mecanismo cooperativo, la densidad de carga de las especies inorgánicas determina la cantidad de surfactante que se asocia a cada especie inorgánica. Además, también dirige la orientación preferida de la región polar del surfactante en relación con las especies inorgánicas. En otras palabras, la densidad de carga en juego determina la distancia media entre los grupos polares del surfactante.

En este tipo de proceso están implicados tres tipos de interacciones: inorgánica-orgánica, orgánica-orgánica e inorgánica-inorgánica. Huo y col.⁹² estudiaron la naturaleza de las interacciones entre la especie inorgánica (I), la región polar del surfactante (S) y los iones del medio (X) en función del pH al que tiene lugar la síntesis. El punto isoeléctrico de la sílice se encuentra en torno a 2 y por tanto a un pH > 2 las especies de sílice se encuentran como aniones (I⁻) mientras que por debajo de dicho valor estarán presentes como cationes (I⁺). En base a esto, establecieron los siguientes tipos de interacciones (**Figura 1.10**):

- **Interacción iónica S⁺I⁻**. Implica atracciones electrostáticas entre surfactantes catiónicos (como sales de amonio cuaternario) y especies inorgánicas aniónicas.
- **Interacción iónica S⁻I⁺**. Implica atracciones electrostáticas entre surfactantes aniónicos (suele ser un anión sulfónico) y especies inorgánicas catiónicas.
- **Interacción iónica S⁺X⁻I⁺ y S⁻M⁺I⁻**. Ambas interacciones implican la mediación de un contraión para poder permitir el ensamblaje de especies catiónicas o aniónicas entre sí. Con surfactantes catiónicos, es necesario añadir un ion mediador X⁻ (habitualmente un haluro: Cl⁻, Br⁻). Si el surfactante es aniónico (*i.e.* fosfatos de cadena larga), se necesita un ion mediador M⁺: Na⁺, K⁺, para asegurar la interacción entre ambas especies cargadas negativamente.

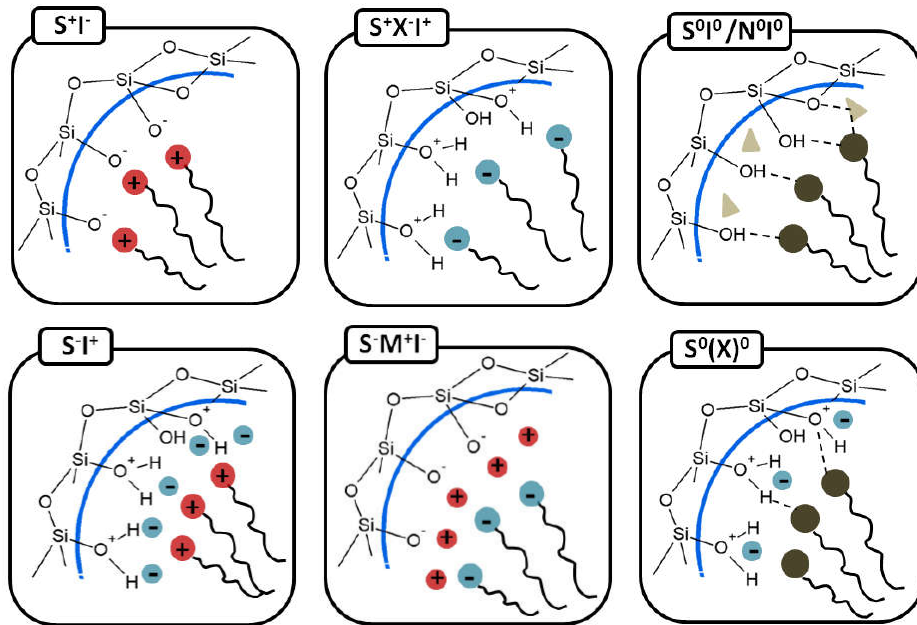


Figura 1.10 Tipos de interacciones entre el precursor de silicio, el surfactante y el resto de especies presentes en el medio durante la formación de los NSM. Adaptada de las referencias 92 y 93.

- Aparte de estos cuatro tipos de interacciones de carácter electrostático, Pinnavaia y col.⁹³ propusieron nuevas interacciones atractivas mediadas por enlaces de hidrógeno o de naturaleza dipolar (**Figura 1.10**). En este caso se utilizan surfactantes no iónicos (*i.e.* *Brij*s® o *Pluronic*s®) o neutros (N^0 : polióxido de etileno, S^0 : aminas de cadena larga) con especies de sílice no cargadas, y se obtienen **interacciones de tipo S^0I^0 , N^0I^0 o pares iónicos $S^0(X)^0$** . Los materiales así sintetizados carecen de ordenamiento poroso debido a la ausencia de interacciones electrostáticas que normalmente controlarían el empaquetamiento micelar. Sin embargo, la síntesis con un surfactante neutro produce silicatos mesoporosos con paredes más gruesas y, consecuentemente, con mayor estabilidad térmica que las tradicionales mesoestructuras inorgánicas.

1.4.4. Eliminación del surfactante

Independientemente de la ruta de síntesis seguida, al finalizar la condensación y una vez estabilizado el material, se elimina el surfactante mediante tratamiento térmico o extracción con disolventes, para obtener un sólido mesoestructurado.²⁸ La calcinación es un método muy sencillo que permite eliminar el surfactante en su totalidad mediante un tratamiento térmico. La calcinación a alta temperatura (por lo general 550 °C) elimina parcialmente los restos de silanol junto con las moléculas orgánicas presentes. Sin embargo, los grupos silanol del material calcinado se pueden recuperar por ebullición en agua. Además hay que tener en cuenta que la calcinación puede afectar a las propiedades texturales de los NSM ya que a mayor temperatura aumenta el grado de entrecruzamiento

y la estabilidad térmica pero disminuyen el volumen de poro, el área superficial y el grosor de las paredes de sílice.^{94,95}

La extracción con disolventes es un tratamiento más suave que permite eliminar el surfactante sin provocar cambios en la mesoestructura o en la naturaleza química de los materiales. Al ser un método más suave no permite eliminar el surfactante en su totalidad y en algunos casos requiere el uso de grandes volúmenes de disolvente. Sin embargo ofrece varias ventajas: la posibilidad de obtener NSM con mayor tamaño de poro y más silanoles en superficie e incluso la extracción de materiales ya funcionalizados sin afectar la naturaleza de los grupos anclados. Etanol, tetrahidrofurano, acetona o disoluciones de etanol acidificado con ácido clorídrico o con nitrato amónico son algunos de los disolventes más empleados para la extracción.^{93,96-99}

1.4.5. Nanomateriales tipo MCM-41 y SBA-15

Los NSM tipo MCM-41 y SBA-15 se encuentran entre los nanomateriales más ampliamente estudiados para aplicaciones biomédicas. Dado que esta Tesis versa sobre estos dos tipos de materiales dedicaremos el presente apartado a reflejar sus diferencias y analogías en diversos aspectos sintéticos, estructurales y texturales.

El primer paso antes de profundizar en el estudio de estos materiales es describir los reactivos y el proceso de síntesis para cada uno ellos ya que serán estos los factores responsables de sus propiedades finales.

En la presente Tesis Doctoral el material tipo MCM-41 se emplea para el tratamiento de tumores sólidos y se sabe que en este campo, en contraste con otras morfologías, las nanopartículas ofrecen una serie de ventajas como son: una mayor velocidad de transporte de masa, una adhesión de los sustratos más efectiva y una mejor dispersión en disolución. La síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa tipo MCM-41 (MSNs) para aplicaciones biomédicas debe cumplir dos condiciones: *i*) una nucleación bien controlada y una velocidad de crecimiento con tamaños uniformes en el rango de los 50 a los 300 nm;¹⁰⁰ *ii*) una ausencia de autoagregación de las nanopartículas.^{101,102} Actualmente existen numerosos métodos que permiten la síntesis de MSNs.^{103,104} De entre todos ellos, uno de los más utilizados es el método de Stöber modificado, ya que permite un buen control del tamaño y de la dispersión de las nanopartículas. Por esta razón ha sido elegido como método de síntesis para las MSNs en esta Tesis Doctoral.

El método de Stöber modificado generalmente tiene lugar bajo condiciones básicas y alta dilución en una mezcla de alcohol y agua.¹⁰⁵ Los alcoholes más empleados son metanol, etanol, n-propanol y n-butanol, y el amoníaco o el hidróxido de sodio los catalizadores del crecimiento coloidal más habituales. A diferencia de otros este método da lugar a MSNs monodispersas y uniformes de tamaño modulable. Ha sido ampliamente descrito que es posible controlar el tamaño de las partículas modificando parámetros de síntesis como el pH, la temperatura o el tiempo de reacción.^{103,104,106-108} Basándonos en

este método, la síntesis de nanopartículas tipo MCM-41 se ha realizado como se muestra en la **Figura 1.11A**: en un matraz de 1 L de fondo redondo, se añade 1g de CTAB, 480 mL de H₂O (Milli-Q), y 3,5 mL de NaOH (2 M). La mezcla se calienta a 80 °C y se agita a velocidad constante y estable. Después se añaden 5 mL de TEOS gota a gota con ayuda de un inyector electrónico. La suspensión blanca obtenida se agita durante 2 horas más a 80 °C. Se elimina el surfactante por intercambio iónico con una disolución de nitrato de amonio (10 mg/mL) en etanol (95 %) a 65 °C durante toda la noche bajo agitación magnética, se lava con abundante agua, después con etanol y por último se deja secar a vacío.

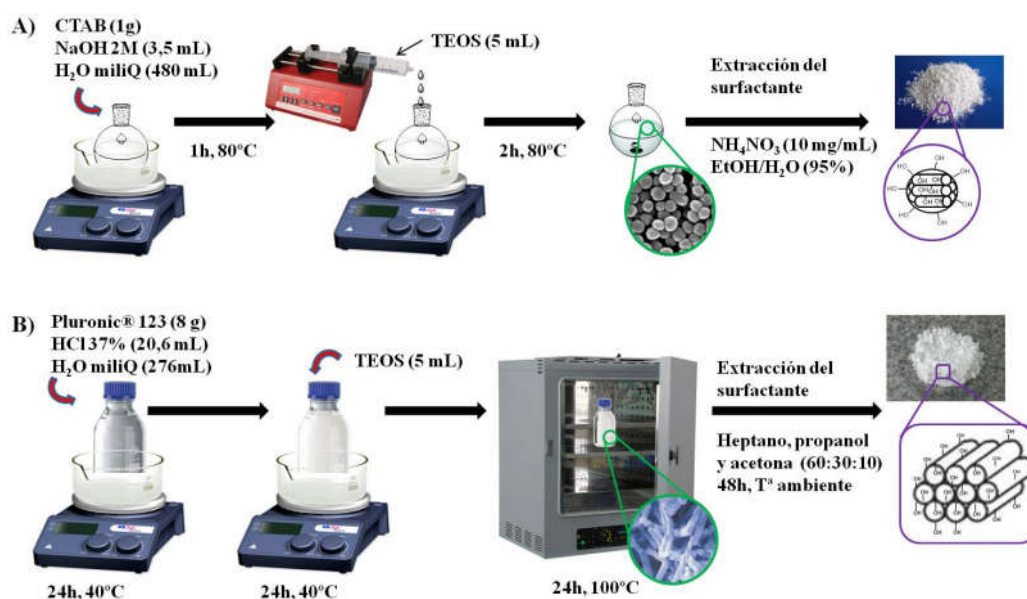


Figura 1.11 Esquema de síntesis de los NSM llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral A) nanopartículas tipo MCM-41 y B) SBA-15 en “bulk”.

En el caso del SBA-15, su aplicación en el tratamiento de la infección bacteriana ósea no requiere la obtención del material en forma de nanopartículas. Concretamente, la síntesis del SBA-15 se realizó en “bulk” tal y como se muestra en la **Figura 1.11B**. Primero el Pluronic® P123 se disuelve en ácido clorhídrico y entonces se añade el precursor de sílice en este caso TEOS, y otros alcoxisilanos en el caso de que se desee funcionalizar por co-condensación, como se describirá más adelante (apartado 1.5). Esta disolución se agita durante un tiempo determinado (2-20 h) a 40 °C y después se aumenta la temperatura hasta 100 °C durante 24 h (tratamiento hidrotermal). Por último, el producto se recoge por filtración y se elimina el surfactante por extracción.

Como se ha dicho anteriormente, la principal característica común de estos materiales es la elevada área superficial y volumen de poro que presentan, pero es importante realizar un estudio pormenorizado de su estructura para conocer las similitudes y diferencias que presentan y maximizar sus posibilidades.

Para la síntesis de MSNs se sigue exactamente el esquema descrito en la **Figura 1.11A** y se obtienen nanopartículas tipo MCM-41 con una distribución hexagonal ordenada de poros, con gran área superficial ($\sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), con un volumen de poro en torno a $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ y poros de unos 2,5 nm de diámetro (**Figura 1.12**).

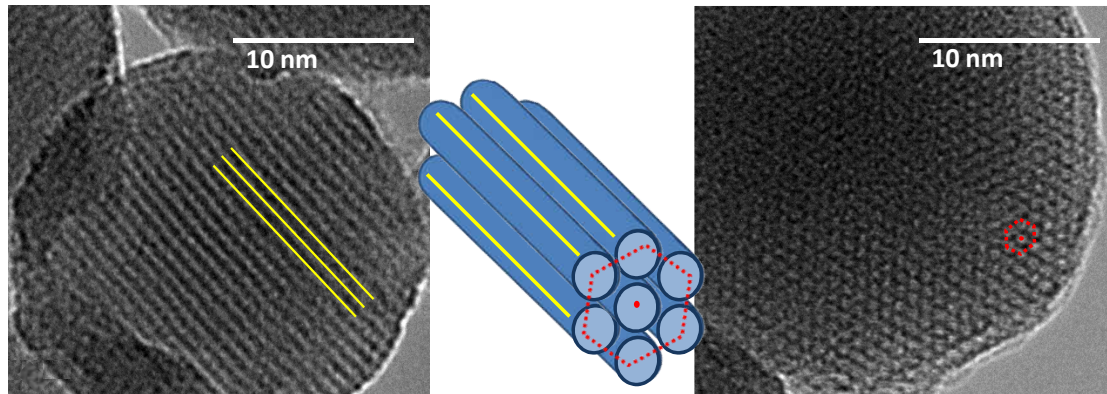


Figura 1.12 Representación e imágenes de TEM de las MSNs.

Se considera que la formación del SBA-15 tiene lugar mediante los mismos mecanismos de LCT, sugeridos para la síntesis del MCM-41 sin embargo presenta ciertas diferencias responsables de su distinta morfología y propiedades texturales.

La principal variación es el surfactante, responsable de que en el SBA-15 los mesoporos presenten un diámetro mayor, la pared sea más gruesa y los mesoporos estén conectados entre sí por una red de microporos. En el MCM-41 el CTAB posee una cabeza polar más voluminosa que la cadena hidrofóbica, por lo tanto en medio acuoso a la hora de formar las micelas las cadenas quedan totalmente protegidas en el interior mientras que los precursores de sílice hidrolizados (TEOS) se van disponiendo en su superficie (**Figura 1.13A**).

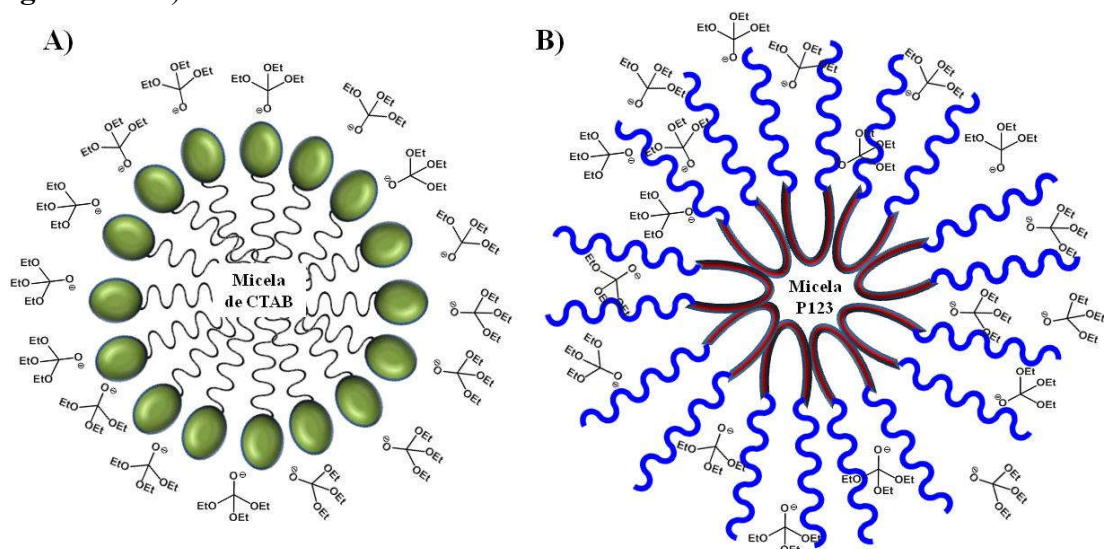


Figura 1.13 Esquema de interacción entre los precursores de sílice hidrolizados y las micelas de A) CTAB y B) P123.

En el SBA-15 el Pluronic® P123, un copolímero no iónico de tres bloques, presenta la estructura opuesta, una cabeza hidrofóbica de polióxido de propileno (PPO) de menor tamaño y dos cadenas hidrofílicas de polióxido de etileno (PEO) más voluminosas que quedan expuestas en el exterior. Cuando el precursor de sílice polimeriza comienza en la corona¹⁰⁹ dejando las cadenas de PEO ocluidas en su interior (**Figura 1.13B**). Esto provoca que el SBA-15 tenga mesoporos cilíndricos dispuestos de forma hexagonal (igual que el MCM-41) pero que además presente una red microporosa que interconecta los mesoporos entre sí (**Figura 1.14A**). Que durante la síntesis del SBA-15 la polimerización de la sílice tenga lugar a partir de la corona supone además que la pared presente un espesor mayor que en el MCM-41 por lo que ofrece mayor estabilidad térmica e hidrotérmica, características muy interesantes para el uso de este material en adsorción.^{29,110} La tercera consecuencia del cambio de surfactante es el tamaño de poro, ya que el P123 es un surfactante más voluminoso que el CTAB y por tanto da lugar a mesoporos de mayor diámetro (entre 4 y 30 nm).

El tratamiento térmico es un factor que origina también importantes diferencias en la estructura de estos materiales. La síntesis del MCM-41 tiene lugar a 80 °C y durante este proceso la temperatura facilita la polimerización de la sílice y junto a otros factores permite la obtención de nanopartículas de forma esférica.

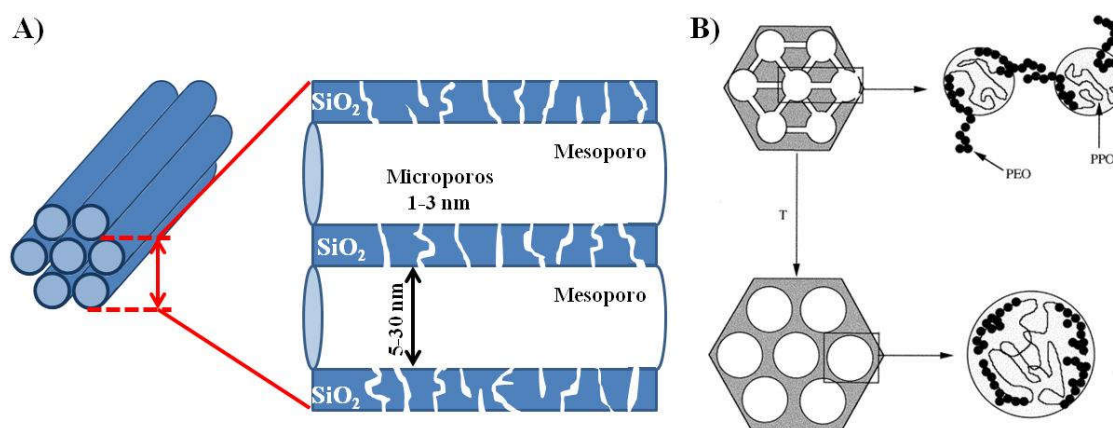


Figura 1.14 A) Representación de los canales micro y mesoporosos que conforman el material SBA15; B) (izquierda) Representación esquemática de la variación de la estructura porosa del SBA-15 en función de la temperatura de síntesis. (Derecha) Estado de las cadenas de PEO a temperaturas próximas a 35 y 130 °C. Adaptada de la referencia 111.

En la formación del SBA-15 se podría decir que el tratamiento térmico es todavía más relevante. El P123 es dependiente de la temperatura y sus propiedades varían en función de esta, por lo tanto jugar con la temperatura da lugar a cambios en términos de tamaño de poro, volumen de microporos y área superficial del producto final.²⁹ El tratamiento hidrotérmico afecta después de la formación de la estructura hexagonal cuando las cadenas de PEO se encuentran atrapadas en la red de sílice (fuente de los microporos en el producto final).¹¹² Cuando la temperatura se eleva, la hidrofiliidad de las cadenas

de PEO cambia, se hacen más hidrófobas y se retraen de la pared de sílice para introducirse en el núcleo hidrófobo de las micelas. Los microporos se forman debido a las interacciones de las cadenas de PEO de diferentes micelas, por lo tanto, un aumento de temperatura supone una disminución de la microporosidad y del área superficial y un aumento del tamaño de los poros.¹¹¹ El efecto del tratamiento hidrotérmico se ilustra en la **Figura 1.13B**. Al aumentar la temperatura de 35 a 130 °C es posible aumentar el tamaño de los mesoporos en varios nanómetros, observándose un cambio especialmente significativo por encima de 60 °C. Por encima de esta temperatura, la microporosidad y el área superficial se reducen y cuando el tratamiento se lleva a cabo a 130 °C los microporos desaparecen y el material presenta una estructura similar al MCM-41.^{111,113}

Para ambos materiales la morfología es variada y puede ser controlada en función de las necesidades. Habitualmente el MCM-41 y el SBA-15 se sintetizan en forma de nanopartículas o fibras y bastoncillos respectivamente, aunque también es posible diseñarlos con morfologías tales como toroides, plaquetas o esferas huecas modificando algunos de los parámetros de síntesis.^{114,115}

Finalmente podemos decir que el MCM-41 y el SBA-15 son dos materiales cuya estructura es equivalente en simetría y que tienen numerosas cualidades en común: una gran área superficial, un elevado volumen de poro y una distribución de tamaños de poro estrecha y homogénea fruto de una estructura altamente ordenada. Por no mencionar una gran actividad química superficial que les permite la fácil modificación de sus propiedades fisicoquímicas en función de los requerimientos. Pese a las numerosas similitudes hemos visto que presentan ciertas diferencias derivadas de los distintos reactivos y de los diferentes procesos de síntesis, las cuales hay que considerar a la hora de seleccionar el material de partida adecuado para cada aplicación.

1.5 Funcionalización de nanomateriales de sílice mesoestructurada

Dentro de las múltiples cualidades de los NSM, la gran cantidad de grupos silanol potencialmente funcionalizables (asociada a defectos de conectividad durante el proceso de condensación de la red de sílice) ha favorecido que se realicen esfuerzos considerables para incorporar componentes orgánicos en su superficie. Esta simbiosis es muy atractiva desde el punto de vista de los materiales debido a la posibilidad de combinar la enorme variedad funcional de la química orgánica con las ventajas de un sustrato inorgánico térmicamente estable y robusto.

La funcionalización de los NSM es posible por tres vías diferentes:^{88,116}

1. Método de post-síntesis o “grafting”. Consiste en la funcionalización de la superficie de la sílice una vez que esta ya ha sido sintetizada. Este proceso se lleva a cabo principalmente mediante la reacción de organosilanos del tipo $(R'O)_3SiR$, con grupos silanol libres de la superficie (**Figura 1.15A**). Esta vía da

lugar a una distribución no homogénea de los grupos funcionales y suele ir acompañada de una disminución del tamaño de los poros o un bloqueo parcial de la entrada de los mismos. Sin embargo presenta como ventajas que no modifica la estructura ordenada del material y que permite funcionalizaciones asimétricas, con grupos diferentes dentro y fuera de los poros. Es posible decorar la superficie externa con un organosilano, eliminar el surfactante y decorar la superficie interna con otro agente funcionalizante.

2. Método de co-condensación. Supone la incorporación simultánea de la sílice y los precursores organosilíceos en un solo paso. De esta forma los grupos funcionales se encuentran decorando ambas superficies, interna y externa y su incorporación no bloquea la entrada de los poros ya que el surfactante está presente durante la síntesis. Una desventaja en este caso es que la funcionalización normalmente no puede exceder el 40 % (puede que incluso menos dependiendo del agente funcionalizante) para no dar lugar a la pérdida de la estructura mesoporosa (**Figura 1.15B**).
3. Organosilicatos mesoporosos periódicos. Esta vía se basa en el uso de precursores organosilíceos bis-sililados del tipo $(R'O)_3Si-R-(OR')_3$ en presencia de surfactantes. Los puentes orgánicos son componentes integrales de la red de sílice, es decir forman parte de la red tridimensional mediante dos enlaces covalentes y por tanto su distribución es homogénea en las paredes de los poros (**Figura 1.15C**).

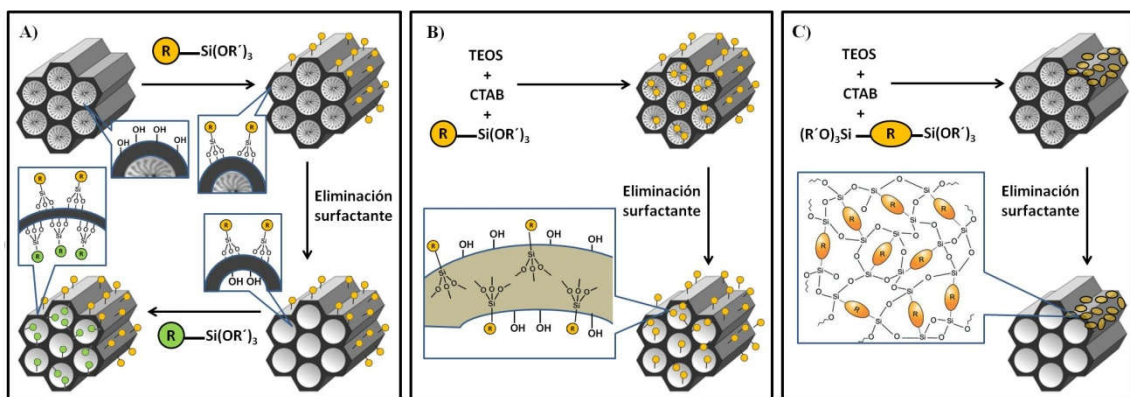


Figura 1.15 Esquemas de las vías de funcionalización de los NSM; A) funcionalización por post-síntesis; B) funcionalización por co-condensación; C) funcionalización de mesoporosos periódicos de sílice. Adaptado de la referencia 88.

1.6 Biocompatibilidad de los NSM

Cualquier material diseñado para ser utilizado en el organismo debe cumplir unas condiciones mínimas de biocompatibilidad, es decir debe desempeñar la función buscada, sin provocar ningún efecto indeseable local o sistémico en el beneficiario de la terapia, pero al mismo tiempo generando la mejor respuesta celular o tisular en esa situación

específica.^{117,118} Los NSM pueden funcionalizarse con componentes muy diversos y es necesario estudiar la biocompatibilidad de cada sistema individualmente. Sin embargo un buen punto de partida es estudiar la posible toxicidad derivada de la composición química base de los NSM: la sílice. Se sabe que la inhalación de sílice cristalina, en particular cuarzo, puede ocasionar graves enfermedades respiratorias.¹¹⁹ Sin embargo, la sílice amorfa obtenida por el método sol-gel se considera no tóxica, biocompatible y biodegradable.^{120,121} De hecho la sílice coloidal y la sílice porosa se emplean como adyuvantes en tecnología farmacéutica y en elementos de diagnóstico en investigación biomédica.¹²²⁻¹²⁷ Hasta la fecha se han descrito un gran número de estudios sobre la biocompatibilidad y la estabilidad de diversos materiales de sílice.^{101,128-132} Así, se sabe que la concentración, el tamaño de partícula y la funcionalización de la superficie de la sílice mesoporosa juegan un papel fundamental en su estabilidad y toxicidad *in vitro*.^{133,134} Sin embargo, no sólo hay que prestar atención a la citotoxicidad o biocompatibilidad del material en su totalidad sino que también es importante evaluar la capacidad de degradación, y la excreción de los NSM. En este punto es muy importante diferenciar entre NSM como implantes óseos y nanopartículas para liberación de fármacos, ya que su administración y vías de eliminación son muy diferentes.

En cuanto a implantes, es imprescindible estudiar la interacción del material a implantar con los fluidos fisiológicos. Como resultado de la respuesta inflamatoria y la actuación del sistema inmune, la secuencia de reacciones biológicas desencadenada cuando un material se pone en contacto con la sangre lleva, en la mayoría de los casos, a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del material que lo aísla como a un cuerpo extraño. Esta cápsula supone una barrera para que un sistema de liberación de fármacos implantable pueda cumplir su función.¹³⁵⁻¹³⁷ De este modo, la osteointegración es imprescindible en los sistemas de liberación controlada que actúan como implantes en injertos o rellenos óseos.¹³⁸ En este sentido, los materiales tipo SBA-15 han demostrado ser bioactivos, es decir, favorecen la regeneración ósea en contacto con los fluidos biológicos.^{54,139} Estudios *in vitro* frente a células MC3T3-E1 *in vivo* han demostrado que la incorporación de péptidos osteoinductores como la osteostatina en matrices mesoporosas ordenadas de sílice reduce la encapsulación con tejido fibroso y promueve la formación de hueso.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Por otro lado, las MSNs, han demostrado ser no tóxicas para los sistemas biológicos si se preparan optimizando ciertas características estructurales y se aplican en las dosis correctas.^{58,143,144} Numerosos estudios han sido realizados para investigar cómo el tamaño, la forma, y otras muchas características estructurales de las MSNs afectan a sus actividades biológicas tales como: endocitosis a través de las membranas celulares, interferencias dentro de la señalización celular, interacción con orgánulos celulares, etc.¹³¹ Así, experimentos *in vitro* han demostrado que nanopartículas de hasta 110 nm son internalizadas por las células sin efectos tóxicos¹⁴⁵ y que la funcionalización orgánica de la matriz conduce incluso a una mejora de la biocompatibilidad.^{101,146,147} Tal y como demuestran ensayos *in vivo* la dosis y la vía de administración influyen también en la respuesta del organismo a estos materiales. Así, la inyección subcutánea de MSNs

conduce a una respuesta biocompatible mientras que la inyección intraperitoneal o intravenosa resulta tóxica y letal como resultado de la formación de trombos en el torrente sanguíneo, lo que conduce generalmente a embolia.^{132,144,148} La biodegradación de la sílice *in vivo* se produce principalmente por disolución en los fluidos biológicos. Existen varios estudios que avalan la eliminación de los MSNs a través de las vías renal y hepática en forma de orina y heces fecales que contienen los MSN sólidos o productos degradados, siendo la excreción renal la ruta principal.^{126,149-151} Que la sílice disuelta en forma de ácido silícico se excrete en la orina, contribuye al interés en el empleo de las matrices síliceas en aplicaciones biomédicas.^{120,152}

1.7 Aplicaciones biomédicas

El reto de esta Tesis ha consistido en abordar dos enfermedades de gran relevancia y prevalencia en la sociedad actual como son las la infección bacteriana en implantes óseos y el cáncer. Para tratar cada patología se ha seleccionado y optimizado el NSM que ofrece las mejores prestaciones en cada caso. Para el diseño de pequeños implantes óseos nos decantamos por el material más robusto y cuya metodología de síntesis resulta relativamente más sencilla, como es el SBA-15 en “bulk”. Además la estructura micro/mesoporosa del SBA-15 contribuye a la regeneración ósea, donde los microporos pueden actuar como sitios de nucleación para la mineralización del hueso mientras que los mesoporos de mayor diámetro de poro permiten cargar no sólo antibióticos sino también proteínas osteoinductoras, nutrientes o factores de crecimiento.⁵⁴ Por el contrario, en el tratamiento de tumores sólidos, las MSNs, resultan la elección más acertada ya que presentan una morfología y un tamaño adecuados para acumularse en el tumor. Además poseen canales mesoporosos paralelos independientes sin ninguna interconexión, cada poro tiene sólo dos aberturas, lo que supone una gran ventaja a la hora de diseñar un sistema de “liberación prematura cero”; donde no es necesario que el bloqueo de los poros sea perfecto, sino que basta con bloquear correctamente ambas aberturas de un cierto número de mesoporos.^{153,154} A continuación se ofrece una visión global de estas dos patologías.

1.7.1. Infección bacteriana ósea

Una infección consiste en la invasión de un anfitrión por un microorganismo patógeno, su multiplicación en los tejidos y la reacción del anfitrión a su presencia y a la de sus posibles toxinas.¹⁵⁵ Las infecciones pueden deberse a bacterias, hongos, virus, protozoos o priones. En la mayoría de los casos, la aparición de una infección por la implantación de un biomaterial es de origen bacteriano, por ello nos centraremos en este tipo concreto.^{156,157}

De forma natural nuestro organismo presenta una serie de mecanismos de defensa contra las bacterias, siendo las primeras barreras las defensas físicas: piel y mucosas.¹⁵⁸ Sin embargo durante el proceso de implantación estas barreras se pierden, ya que supone la incorporación de un cuerpo extraño en el organismo, que en algunos casos no va solo sino acompañado por bacterias. Desde la introducción de las técnicas de cirugía aséptica en la década de 1860 este riesgo ha disminuido considerablemente.¹⁵⁹ A pesar de ello hoy día la infección es la complicación más grave asociada a la implantación de biomateriales en un organismo.¹⁶⁰⁻¹⁶² Según diversos datos estadísticos se ha llegado a la conclusión de que la infección bacteriana se produce aproximadamente en un 1-2 % de las cirugías y en un 14 % de los casos de revisión post-quirúrgica, siendo responsables de múltiples operaciones, amputaciones, y en algunos casos mortalidad del paciente, así como demandas al hospital y al médico que realiza las operaciones.¹⁶³⁻¹⁷⁰

Las infecciones asociadas a implantes se clasifican en tres grupos: *i)* infecciones superficiales inmediatas causadas por bacterias que normalmente habitan en la piel y comienzan a colonizar el biomaterial; *ii)* infecciones profundas inmediatas que se hacen evidentes poco después de cirugías invasivas y pueden deberse a la reubicación inadvertida de las bacterias de la piel en el cuerpo como consecuencia de prácticas de implantación sin la debida asepsia; *iii)* infecciones profundas tardías que aparecen meses o años después de la cirugía y pueden ser debidas tanto a una contaminación durante la cirugía como a bacterias que migraron desde otro sitio anatómico al lugar del implante.¹⁷¹

La susceptibilidad a la infección depende del estado inmunológico del paciente así como de la virulencia de los microorganismos implicados.¹⁷² Las infecciones asociadas a implantes óseos son complicaciones graves que, en última instancia, conducen a la osteomielitis con los consiguientes efectos devastadores sobre el hueso y los tejidos blandos circundantes.¹⁷³⁻¹⁷⁵ La aparición de la infección induce el reclutamiento de células inflamatorias en la zona, afectando a la integración del implante en los tejidos circundantes. Llegados a este punto, cuando el “biofilm” bacteriano ya es maduro y la infección se ha vuelto crónica, las terapias médicas convencionales basadas en una administración sistémica de antibióticos no son eficaces. Por tanto hoy en día, la sustitución del implante representa la única posibilidad real de erradicar la infección, aunque el riesgo de una recaída sigue siendo alta.^{176,177}

La unión de las bacterias a las superficies hidrofóbicas de los implantes es energéticamente favorable y es un primer paso crítico en la formación de los “biofilms”.¹⁷⁸ Los “biofilms” o biopelículas se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz extracelular protectora autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte, y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ El desarrollo del “biofilm” se produce de una manera escalonada, comienza con la adhesión de las bacterias a la superficie del implante, continua con la proliferación y diferenciación durante la cual las bacterias comienzan a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz extracelular, y culmina con su dispersión, en la que las bacterias de la matriz del “biofilm” se liberan del

mismo para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del “biofilm” (Figura 1.16).^{170,182-184}

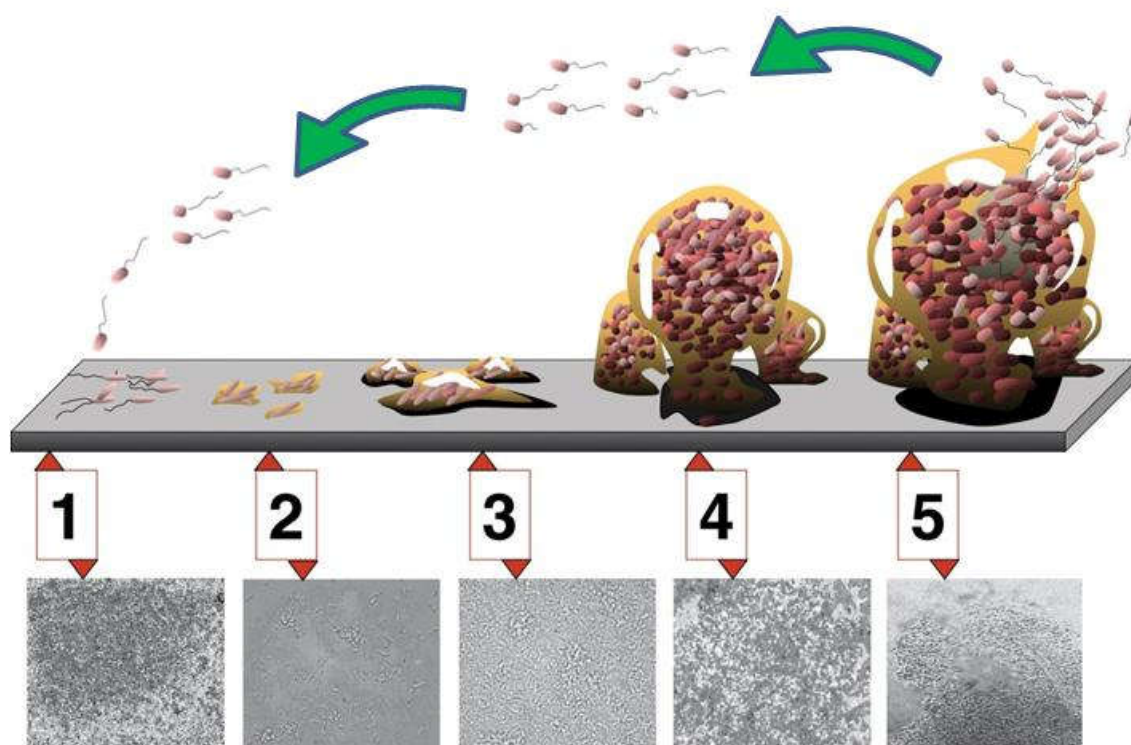


Figura 1.16 Etapas de formación de un “biofilm” bacteriano. 1) Unión inicial; 2) unión irreversible; 3) crecimiento; 4) maduración; y 5) dispersión. Cada etapa del desarrollo en el diagrama se empareja con una microfotografía del desarrollo de un “biofilm” de *Pseudomonas aeruginosa*, seleccionada como ejemplo representativo. Adaptada de la referencia 185.

La incidencia de infecciones asociadas a la implantación de biomateriales se ha reducido gracias a las técnicas quirúrgicas asépticas y al correcto tratamiento profiláctico perioperatorio con antibióticos sistémicos. Aun así, debido al creciente número de intervenciones que se practican anualmente unidas a los importantes impactos sociales, clínicos y económicos que producen, la prevención de infecciones es un tema de total actualidad. Cada día se promueve más el desarrollo de nuevas estrategias para evitar al máximo la aparición de estos procesos infecciosos.^{167,170,186,187}

La nanotecnología representa una herramienta poderosa e innovadora en este campo. Concretamente, en relación con el ámbito de esta Tesis se han desarrollado numerosos materiales tipo SBA-15 como sistemas de administración local de fármacos.^{47,186,188-191} Además una distribución de poros bien ordenada y la capacidad de funcionalizar fácilmente la superficie del SBA-15 han demostrado ser la piedra angular que gobierna las cinéticas de adsorción y liberación de estos materiales. A lo largo de los últimos años se han diseñado materiales tipo SBA-15 capaces de incorporar una gran

variedad de antibióticos: cefalexina,¹⁹² vancomicina,¹⁹³ rifampicina,¹⁹³ amoxicilina,¹⁹⁴ gentamicina¹⁹⁵ o eritromicina¹⁹⁶ entre otros, que se liberan de una manera controlada.

Como se describe en el capítulo 2 uno de los retos de esta Tesis ha consistido en implementar las características del SBA-15 de modo que sea capaz, no sólo de actuar como sistema de liberación local de antibióticos, sino también de prevenir la infección bacteriana evitando la formación del “biofilm”.

1.7.2. Tumores sólidos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer produjo la muerte de 8,2 millones de personas en el año 2012, y se prevé que pueda alcanzar la cifra de 13 millones de muertes por cáncer en 2030.¹⁹⁷ Estas cifras indican que el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y por lo tanto una de las patologías que requiere mayor dedicación y esfuerzo científico-sanitario.

Como dijo el Dr. Kent Hunter del Center for Cancer Research (Centro de Investigación Contra el Cáncer) en Bethesda (EEUU) *“El problema con el cáncer es que en realidad son nuestras propias células las que han perdido la capacidad de controlar su crecimiento. Por lo que el cuerpo tiene gran dificultad para distinguir las células cancerosas de las células normales. Por ello es muy difícil diseñar fármacos que destruyan las células cancerosas sin dañar el resto de las células en el cuerpo”*. Y añade *“Algunos tumores tienen la capacidad de cambiar constantemente, están cambiando su biología a medida que crecen. Por tanto las células que son resistentes acaban por volver a crecer el tumor”*.

En su conjunto, las observaciones de los cánceres humanos y modelos animales argumentan que la transformación de células sanas a tumorales tiene lugar a través de un proceso formalmente análogo a la evolución darwiniana, en la que una sucesión de cambios genéticos, cada uno de los cuales confiere uno u otro tipo de ventaja para el crecimiento, conduce a la conversión progresiva de células humanas normales en células cancerosas.¹⁹⁸ Tras estudiar un gran catálogo de genotipos de células cancerosas Hanahan y Weinberg propusieron que existe una manifestación de seis alteraciones que comparten la mayoría y tal vez todos los tipos de tumores humanos y que son esenciales en la fisiología celular que dicta colectivamente el crecimiento maligno (**Figura 1.17**): *i*) autosuficiencia en las señales de crecimiento; *ii*) insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento; *iii*) evasión de la muerte celular programada (apoptosis); *iv*) potencial de replicación ilimitado; *v*) angiogénesis sostenida; y *vi*) invasión tisular y metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos aporta nuevas capacidades adquiridas durante el desarrollo del tumor que representa la ruptura exitosa de un mecanismo de defensa contra el cáncer cableado en células y tejidos. Esta multiplicidad de defensas puede explicar por

qué el cáncer es relativamente raro durante una vida humana promedio y va haciéndose más probable durante la vejez.

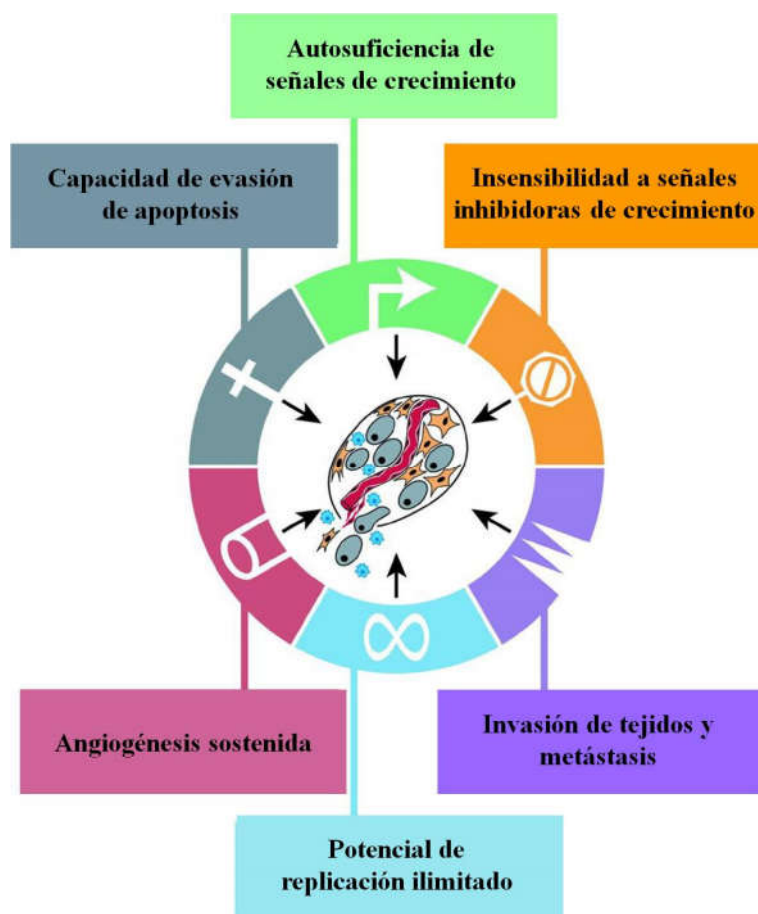


Figura 1.17 Diagrama de las seis alteraciones esenciales de una célula tumoral propuestas por Hanahan y Weinberg. Adaptada de la referencia 198.

Tradicionalmente los tratamientos más comunes contra el cáncer se han limitado a la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Los dos últimos implican una gran cantidad de efectos secundarios (cansancio, náuseas, pérdida de pelo, etc.) causados por una distribución tisular no específica de los agentes anticancerígenos.^{199–201} Es más, esta dificultad a la hora de dirigir el tratamiento a una zona concreta obliga al uso de dosis mayores de los agentes quimioterapéuticos y a la exposición repetida de los pacientes a los mismos para intentar lograr que concentraciones eficaces del fármaco lleguen al sitio del tumor. Esto provoca una toxicidad inmanejable, y el desarrollo de resistencia adquirida a múltiples fármacos.^{202,203} Se hace por tanto necesaria la búsqueda de tratamientos más eficaces y más respetuosos con el paciente mediante la reducción de la concentración del fármaco y la frecuencia de dosificación, ofreciendo una administración más fácil y mejorando la seguridad. Una de las soluciones más prometedoras y que goza de mayor acogida en el área de la nanomedicina es el uso de nanotransportadores capaces de dirigir selectivamente el agente antitumoral al tejido diana.^{204–207}

En el **Capítulo 3** se presenta un artículo de revisión que recoge los últimos avances de las MSNs en este campo, así como los distintos nanodispositivos para terapia antitumoral desarrollados en la presente Tesis Doctoral.

“El progreso se logra con ensayos y fracasos, los fracasos son generalmente cien veces más numerosos que los aciertos, sin embargo, generalmente se quedan sin publicar.”

William Ramsay

**Materiales mesoestructurados tipo
SBA-15 para el tratamiento local de la
infección bacteriana ósea**

2

2.1 Superficies zwitteriónicas

Como se ha descrito en la sección 1.7.1, el primer paso en la patogénesis de las infecciones es la adhesión bacteriana a la superficie del biomaterial. Obviamente, no hay posibilidad de que ocurra una colonización si las bacterias no pueden adherirse a una superficie sólida. La adhesión bacteriana depende de unos factores inespecíficos de índole fisicoquímica, eléctrica, etc., y de otros factores específicos de carácter adhesina-receptor, fimbrias, etc. No obstante, el primer paso para que se produzca la adhesión consiste en que la bacteria se aproxime a la superficie del material. No existe ninguna interacción entre la superficie sólida y el microorganismo hasta una distancia de 50 nm. Cuando la bacteria se encuentra a una distancia de 2 nm podemos predecir que la adhesión será irreversible, sin embargo a una distancia de 10 nm la situación es crítica ya que la bacteria dependiendo de su tamaño y otros factores puede adherirse reversible o irreversiblemente. A distancias mayores, la adhesión puede considerarse reversible.²⁰⁸⁻²¹⁰

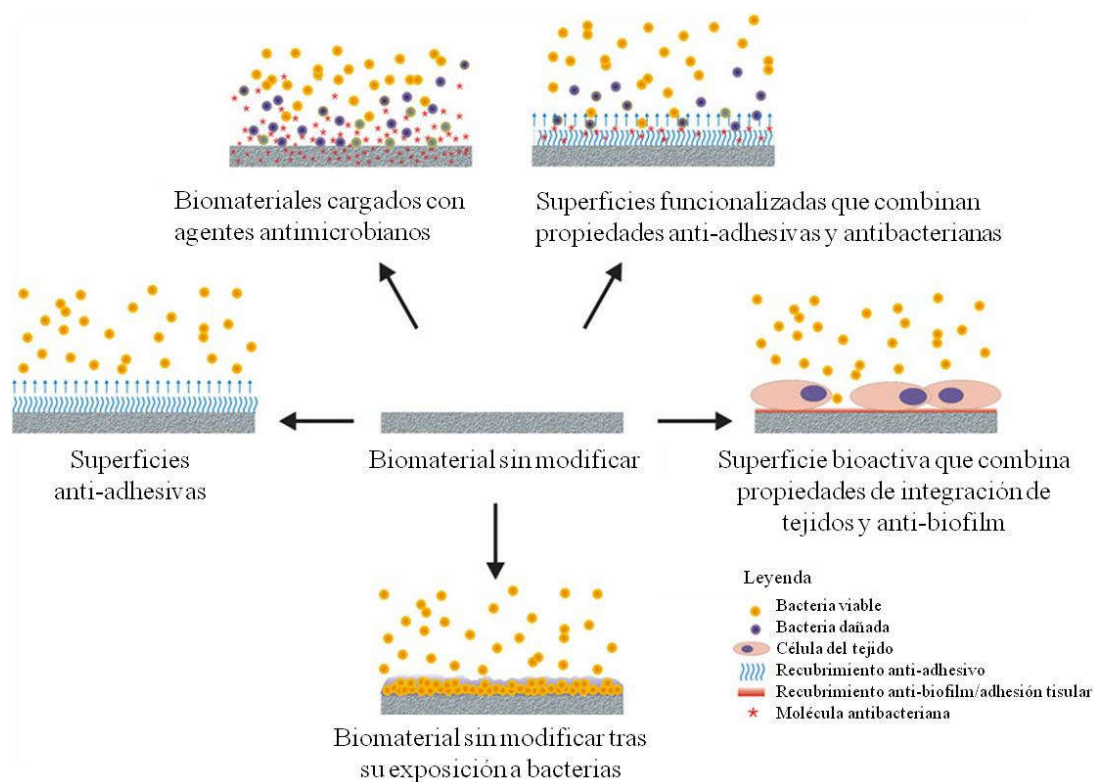


Figura 2.1 Diferentes estrategias para obtener biomateriales con superficies resistentes a la infección. Adaptada de la referencia 170.

El interés científico encaminado a desarrollar biomateriales que sean menos susceptibles o incluso resistentes a las infecciones bacterianas ha incrementado notablemente durante los últimos años. Tales biomateriales incluyen, entre otros, materiales con superficies capaces de inhibir la adhesión bacteriana y biomateriales capaces de liberar localmente concentraciones activas de agentes antimicrobianos,

incluyendo aquí agentes bactericidas, bacteriostáticos y/o combinaciones de ambos, para erradicar infecciones pre-existentes o prevenirlas (**Figura 2.1**).^{167,170,186,211–213}

Dentro de los mecanismos empleados para la obtención de superficies antibacterianas la zwitterionización ha emergido como una herramienta poderosa.^{214,215} Los materiales zwitteriónicos son aquellos que presentan el mismo número de grupos cargados tanto positiva como negativamente en su superficie preservando así la neutralidad eléctrica.²¹⁶ Se considera que la capacidad antiadherente de los materiales zwitteriónicos está estrechamente relacionada con una capa de hidratación que se forma próxima a la superficie.²¹⁷ Cuando los materiales zwitteriónicos entran en contacto con el agua, las moléculas de agua crean una película de hidratación sobre la superficie que permanece fuertemente unida por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Se ha demostrado que su presencia dificulta la aproximación de las bacterias a la superficie del biomaterial y por tanto disminuye la probabilidad de su unión irreversible y la formación del “biofilm”. Los materiales con más capacidad de solvatación iónica presentaran mayor poder antiadherente (**Figura 2.2**).

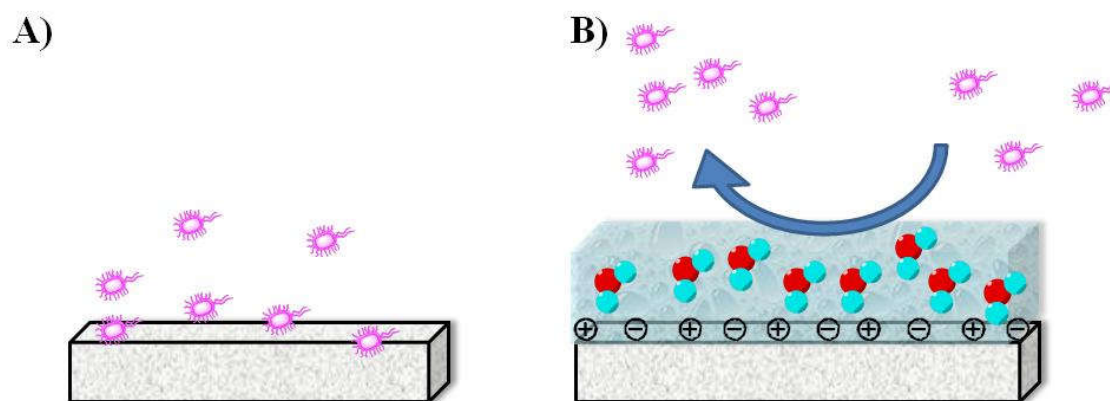


Figura 2.2 A) Adhesión bacteriana a la superficie de un biomaterial sin tratar. B) Efecto antiadherente de la capa de hidratación de una superficie zwitteriónica.

Hasta ahora se han desarrollado diferentes estrategias para diseñar y preparar nanomateriales zwitteriónicos, destacando la zwitterionización de determinadas biocerámicas.^{218,219} Estas se basan principalmente en funcionalizar la superficie del material mediante el uso de polímeros zwitteriónicos y de entidades zwitteriónicas de bajo peso molecular.

Funcionalización con polímeros zwitteriónicos. Los polímeros zwitteriónicos, poseen grupos cargados positiva y negativamente dentro de la misma cadena de polímero. Estos polímeros con carga global neutra han sido ampliamente utilizados para diseñar superficies antiadherentes capaces de resistir la adsorción no específica de proteínas, la adhesión bacteriana y la formación del “biofilm”. A modo de ejemplo en la **Figura 2.3A** se muestran diversos recubrimientos de biocerámicas con polímeros zwitteriónicos.

Funcionalización con entidades zwitteriónicas de bajo peso molecular. Esta estrategia ofrece una ventaja en comparación con aquellas que involucran polímeros zwitteriónicos, ya que por lo general implica métodos de síntesis más sencillos. A continuación se resumen las metodologías más habituales para la funcionalización de las biocerámicas con aminoácidos, derivados de sulfobetaina (SB), o alcoxisilanos (**Figura 2.3B**).

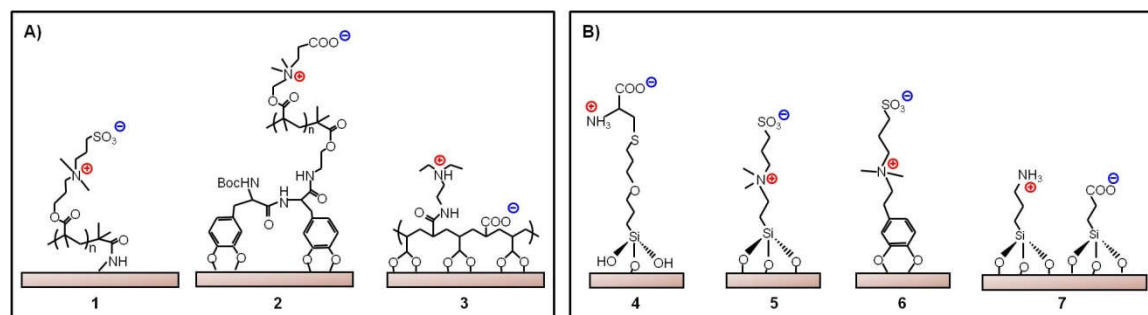


Figura 2.3 Estrategias químicas para la obtención de biocerámicas zwitteriónicas. (A) *Funcionalización con polímeros zwitteriónicos*: **1** Polysulfobetaina metacrilato,²²⁰ **2** Carboxibetaina metacrilato, a través de grupos de unión 3,4-dihidroxifenil-L-alanina-DOPA,²²¹ **3** 3-dietilamino propilamina unida a ácido poliacrílico.²²² (B) *Funcionalización con entidades de bajo peso molecular*: **4** Derivados de cisteína,²²³ **5** Derivados de siloxanos de sulfobetaina,²²⁴ **6** Ligandos sulfonato de dopamina,^{225,226} **7** 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTES) y la sal sódica del carboxietil silanotriol (CES).^{227,228} Adaptada de la referencia 218.

2.2 Nueva biocerámica zwitteriónica con acción antibacteriana dual

Se ha descrito que la funcionalización de la superficie de diferentes biocerámicas para dotarlas de propiedades zwitteriónicas es una estrategia muy interesante para la inhibición de la adhesión bacteriana.²²⁷⁻²²⁹ En base a esta idea, en este trabajo se ha diseñado un SBA-15 funcionalizado mediante la ruta de co-condensación con (N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoxisilano) (DAMO) que incorpora grupos amina primarios y secundarios. Hasta el momento sólo se había logrado obtener un material de sílice mesoporosa que presentaba carácter zwitteriónico a un pH ligeramente ácido en torno a 5,5.²²⁸ Para poder evaluar el carácter antiadherente de dicho material, se llevaron a cabo estudios *in vitro* de adhesión bacteriana con *Eschericcia coli* simulando unas condiciones de infección severa, donde el pH no es el fisiológico sino que se encuentra acidificado por la acción bacteriana.²²⁷ También se realizaron con éxito estudios de biocompatibilidad *in vitro* a pH 7,4 simulando las condiciones fisiológicas una vez que el pH hubiese sido reestablecido. En este artículo titulado “**A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability**”, se presenta por vez primera un derivado de SBA-15 zwitterión a pH 7,4. El carácter zwitteriónico de este material

proviene de los pares iónicos $-\text{NH}_3^{\oplus}/\text{SiO}^{\ominus}$ y $>\text{NH}_2^{\oplus}/-\text{SiO}^{\ominus}$ que se encuentran en la superficie del material como se muestra en la **Figura 2.4**.

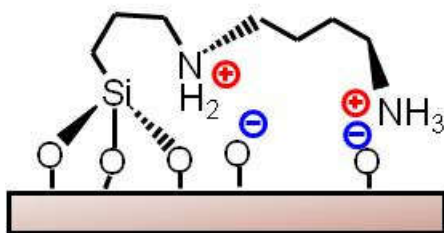


Figura 2.4 Esquema de los pares iónicos del SBA-15 funcionalizado con DAMO.

Siempre que se sintetiza un compuesto es imprescindible comprobar que el producto obtenido es el que se persigue, por ello el material resultante ha sido profundamente caracterizado por diversas técnicas. La presencia de los pares iónicos en la superficie del material se ha evidenciado por FTIR y NMR de $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP/MAS en estado sólido. Y estudios de STEM-EDS han demostrado que su distribución es homogénea en toda la superficie. Mediciones del potencial Z (ζ) indican, como se ha dicho anteriormente, que la naturaleza zwitteriónica de este material se conserva a pH fisiológico de 7,4. Finalmente se ha observado que exhibe propiedades mesoestructurales y texturales comparables a las del SBA-15 de sílice pura, según se ha confirmado por XRD, HRTEM y porosimetría de adsorción de N_2 .

Un valor añadido de estos materiales SBA-15 zwitteriónicos es la posibilidad de utilizar los canales micro y mesoporosos para albergar fármacos. En este estudio se ha pretendido aprovechar esta peculiaridad para cargar en los poros un antibiótico de amplio espectro, en este caso la cefalexina, para posteriormente liberarlo de forma controlada y sostenida en el tiempo. Este hecho ha permitido plantear la prevención de la infección mediante una doble vertiente: capacidad antiadherente y tratamiento antimicrobiano.

Se han llevado a cabo ensayos *in vitro* utilizando *S. aureus*, seleccionada por su presencia en numerosos procesos infecciosos.^{157,170,230} Los resultados indican que este nuevo material es capaz de inhibir el 99,9 % de la adhesión bacteriana en comparación con el SBA-15 de sílice pura (**Figura 2.5**). Por otra parte, ensayos de liberación de cefalexina realizados *in vial* indican que la muestra zwitteriónica es capaz de liberar las moléculas de antibiótico durante períodos de tiempo largos, de hasta dos semanas. Asimismo se ha comprobado mediante ensayos de difusión en agar que el fármaco preserva su actividad antimicrobiana tras ser confinado en el interior de los mesoporos. Esta capacidad antibacteriana dual, es decir, antiadherente y bactericida, abre expectativas prometedoras para el tratamiento local de infecciones óseas.

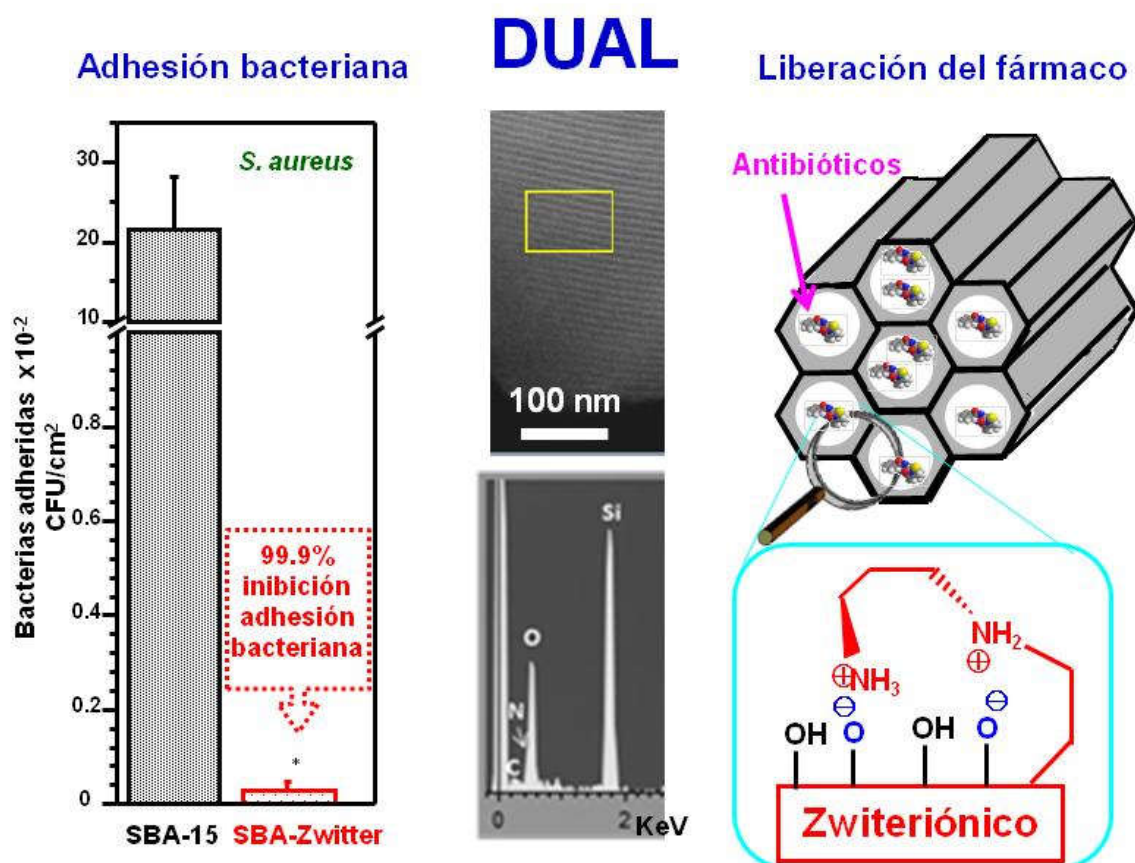


Figura 2.5 Resumen esquemático de la capacidad antibacteriana dual del material desarrollado en el siguiente artículo.



Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2,
5639

A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability†

Montserrat Colilla,^{*abc} Marina Martínez-Carmona,^{abc} Sandra Sánchez-Salcedo,^{abc}
M. Luisa Ruiz-González,^{cd} José M. González-Calbet^{cd} and María Vallet-Regí^{*abc}

DOI: 10.1039/c4tb00690a

2.3 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución: una herramienta clave para entender la liberación de fármacos desde matrices mesoporosas

Con el fin de desarrollar otros materiales zwitteriónicos que permitiesen cargar moléculas o antibióticos de distinta naturaleza fisicoquímica se llevó a cabo la bifuncionalización de SBA-15 por co-condensación utilizando N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoxisilano (DAMO) (**Figura 2.6A1**) y dietilfosfatoetiltriectoxisilano (DPT) (**Figura 2.6A2**).

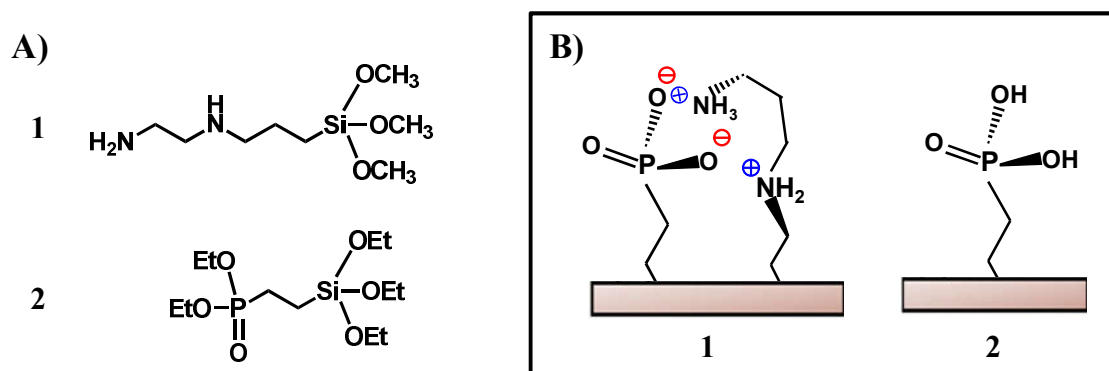


Figura 2.6 A) Fórmulas químicas de: 1 DAMO y 2 DPT. B) Esquema de los materiales funcionalizados con 1) DAMO y DPT y 2) sólo con DPT tras ser tratados con HCl concentrado.

Con el fin de dotar al material resultante de carácter zwitteriónico ha sido necesario hidrolizar los grupos etilfosfonato del DPT a grupos ácido etilfosfónico. Para ello se ha llevado a cabo un tratamiento post-síntesis previamente descrito en la bibliografía²³¹ que conlleva el empleo de HCl 12M en condiciones de reflujo durante 24 horas. Las técnicas convencionales de caracterización apuntan a la obtención del SBA-15 zwitteriónico deseado (**Figura 2.6.B1**). No obstante, gracias a la técnica de HRTEM se ha podido comprobar que este tratamiento tan agresivo provoca una pérdida importante de la mesoestructura del material final.

Con la intención de evaluar las consecuencias en el comportamiento del material como sistema de liberación controlada de fármacos derivadas de la pérdida parcial del orden mesoestructural evidenciado por HRTEM, se ha simplificado el sistema, utilizando para ello un SBA-15 monofuncionalizado con DPT (**Figura 2.6.B2**). Los resultados derivados de la caracterización por FTIR, XRF y $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP-MAS NMR, como cabía esperar, han demostrado la correcta hidrólisis de los grupos etilfosfonato a ácido fosfónico tras el tratamiento con HCl. Los resultados de XRD y porosimetría de adsorción de N_2 apuntan en ambas muestras, antes y después del tratamiento, a estructuras tipo SBA-15 bien ordenadas.

Sin embargo, un estudio profundo realizado por HRTEM ha revelado que el tratamiento con ácido provoca una pérdida notable del orden mesoestructural, y que sólo quedan pequeños dominios cristalinos. En estudios posteriores se ha observado que este daño estructural no influye en las operaciones de carga, pero que afecta gravemente a la liberación de las moléculas confinadas en los mesoporos, como se ha concluido a partir de experimentos de liberación *in vial* utilizando cefalexina como fármaco modelo. Así, mientras que la muestra sin tratar muestra una liberación del fármaco controlada por difusión sostenida durante más de 2 semanas, en la muestra tratada el 100 % del fármaco cargado se libera después de tan sólo 10 horas. Esta gran diferencia de comportamiento no puede explicarse sobre la base de las interacciones matriz/fármaco, cuya naturaleza y extensión es bastante similar en las condiciones de liberación para ambas muestras. Por lo tanto, puede ser entendido sólo sobre la base de los daños mesoestructurales.

En este artículo “**High resolution transmission electron microscopy: A key tool to understand drug release from mesoporous matrices**” se demuestra por tanto que la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución es una herramienta esencial para entender la cinética de liberación de fármacos a partir de materiales de sílice mesoestructurada.

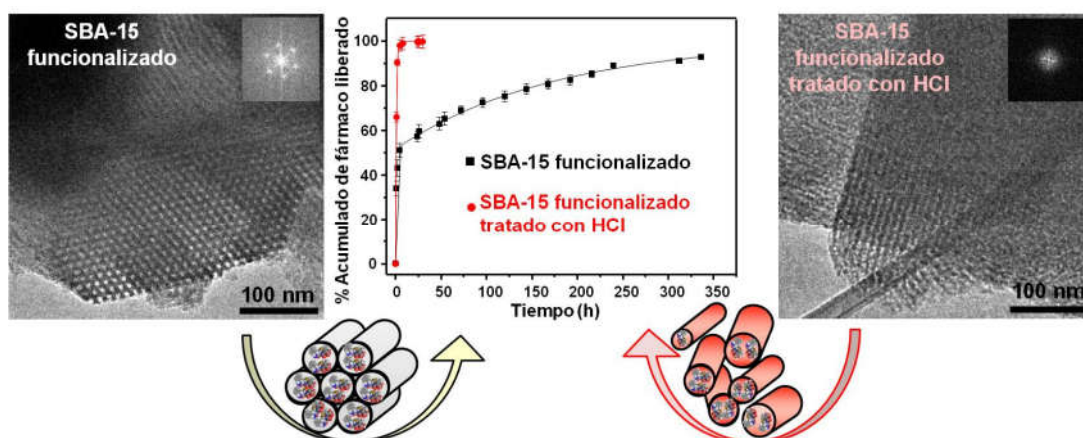


Figura 2.7 Resumen esquemático del efecto del tratamiento con HCl sobre la mesoestructura y la cinética de liberación del SBA-15 funcionalizado.



Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micromeso



High resolution transmission electron microscopy: A key tool to understand drug release from mesoporous matrices



Marina Martínez-Carmona ^{a,b,d}, Montserrat Colilla ^{a,b,d,*}, M. Luisa Ruiz-González ^{c,d}, José M. González-Calbet ^{c,d}, María Vallet-Regí ^{a,b,d,*}

doi:10.1016/j.micromeso.2016.01.019

“La ciencia rivaliza con la mitología en milagros.”

Emerson

**Nanopartículas de sílice mesoporosa
tipo MCM-41 para terapia antitumoral**

3

3.1 Nanomateriales mesoporosos inteligentes para terapia antitumoral

Como se ha visto anteriormente, las nanopartículas de tipo MCM-41 son fácilmente sintetizables y presentan una serie de propiedades que las hacen únicas y que incluyen: gran área superficial y volumen de poro que proporcionan alta capacidad de carga, gran capacidad de control en el tamaño, la morfología y el diámetro de poro, biocompatibilidad, biodistribución, y fácil biodegradación y excreción. Presentan también numerosos grupos silanol que permiten decorar su superficie con moléculas tales como agentes de vectorización, polímeros hidrofílicos, nanocompuertas que responden a estímulos, etc. proporcionando a las nanopartículas propiedades multifuncionales y convirtiéndolas en sistemas inteligentes de vectorización y liberación controlada. Todas estas cualidades convierten a las MSNs, como hemos dicho anteriormente, en una excelente opción en los campos de administración de fármacos vía sistémica, diagnóstico e imágenes médicas.^{45,232-235}

Sin embargo, de entre todas estas aplicaciones, hay una en la que sin duda las MSNs destacan de forma indiscutible, y es en la administración de fármacos para tratamientos antitumorales.²³⁶⁻²³⁸ Esto se debe a la capacidad de las MSNs para dirigirse y acumularse selectivamente en el tejido tumoral y liberar su carga de una manera controlada una vez en la diana. Por eso el uso de nanopartículas es una alternativa prometedora ya que permiten cargar, transportar, proteger y liberar compuestos terapéuticos específicamente en el tejido enfermo. Las MSNs permiten regímenes de tratamientos eficaces y más respetuosos con el paciente mediante la reducción de la concentración del fármaco y la frecuencia de dosificación, ofreciendo una administración más ventajosa, mejorando la seguridad y disminuyendo los efectos secundarios.^{205,239,240}

En el apartado 1.7.2 de esta Tesis Doctoral se ha explicado que las células cancerosas presentan un comportamiento anormal que resulta en un crecimiento excesivo y rápido asociado a una alta demanda de nutrientes y suministro de oxígeno. Como consecuencia, algunos tumores adquieren la capacidad de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los capilares que los rodean, este proceso se denomina angiogénesis. Esta particularidad tan dañina para el organismo, puede ser sin embargo explotada en contra de las células tumorales mediante la vectorización pasiva, la activa, o una combinación de ambas.^{154,241-243} La angiogénesis es un proceso muy rápido y sin control en el que los nuevos vasos son irregulares, exhibiendo un epitelio discontinuo que presenta fenestraciones que pueden alcanzar rangos entre 200-2000 nm. Cuando los componentes sanguíneos llegan a los vasos tumorales, se extravasan a través de las fenestraciones hasta los intersticios del tumor. De esta misma forma las nanopartículas debido a su pequeño tamaño extravasan y se acumulan en los tumores, es lo que se conoce como **vectorización pasiva**. Además, a diferencia de los tejidos normales, en los tumores sólidos el drenaje linfático es deficiente. Por lo tanto, mientras que las moléculas con un tamaño inferior a 4 nm pueden difundir de nuevo al torrente sanguíneo, la difusión de las MSNs se ve impedida por su radio hidrodinámico lo que favorece su acumulación en los intersticios del tumor. Este fenómeno se denomina efecto

de "permeabilidad y retención aumentada (EPR)" y fue descubierto por Matsumura y Maeda en 1986, cuando se dieron cuenta de que las macromoléculas superiores a 50 kDa podían distribuirse preferentemente en el intersticio del tumor y permanecer allí por un período de tiempo prolongado.²⁴⁴

Otra consecuencia del crecimiento descontrolado es que en los tejidos tumorales las células sobreexpresan en superficie receptores de ciertos nutrientes para poder cubrir el aumento de sus necesidades. Generalmente, los tumores sólidos están compuestos por una mezcla heterogénea de células cancerosas y células sanas. El desarrollo de nanovehículos capaces de discriminar entre ellas se convierte en un hecho esencial. La **vectorización activa** se basa en "decorar" la periferia de los nanotransportadores con ligandos cuyos receptores están sobreexpresados en las células cancerosas o en los vasos sanguíneos que irrigan el tejido tumoral, pero muy pobremente presentes en las células sanas.

En las MSNs inteligentes, el fármaco está confinado dentro de los mesoporos y su salida está impedida mediante el uso de agentes de bloqueo o nanocompuertas que evitan la salida prematura de la carga. La liberación del fármaco tiene lugar una vez que el sistema ha sido expuesto a un estímulo dado, lo que provoca la eliminación de los agentes de bloqueo o la apertura de las compuertas, y desencadena la liberación de la carga atrapada. Estos estímulos pueden ser de dos tipos, internos (pH, enzimas, potencial redox, etc.) que responden a variaciones químicas que tienen lugar en el interior del organismo, o externos (luz, campo magnético, temperatura, ultrasonidos, etc.) en cuyo caso es necesario un dispositivo auxiliar para desencadenar la liberación del fármaco.

En la **Figura 3.1** se esquematiza el proceso mediante el cual las MSNs intervienen en el tratamiento de tumores sólidos. En un primer paso quedan retenidas en la zona tumoral por vectorización pasiva, posteriormente se internalizan preferentemente en las células tumorales por vectorización activa y finalmente proceden a la liberación del fármaco de forma controlada como respuesta a la aplicación de un estímulo.

En el siguiente artículo de revisión titulado "**Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy**", se explica más detalladamente en qué consisten la vectorización selectiva y los nanosistemas estímulo respuesta basados en MSNs. En él se recoge también una colección de las MSNs más relevantes publicadas hasta el momento para el tratamiento de tumores sólidos, agrupados en función del tipo de agente de vectorización que poseen y del estímulo al que responden. Supone por tanto un reflejo actualizado del estado del arte en este área.

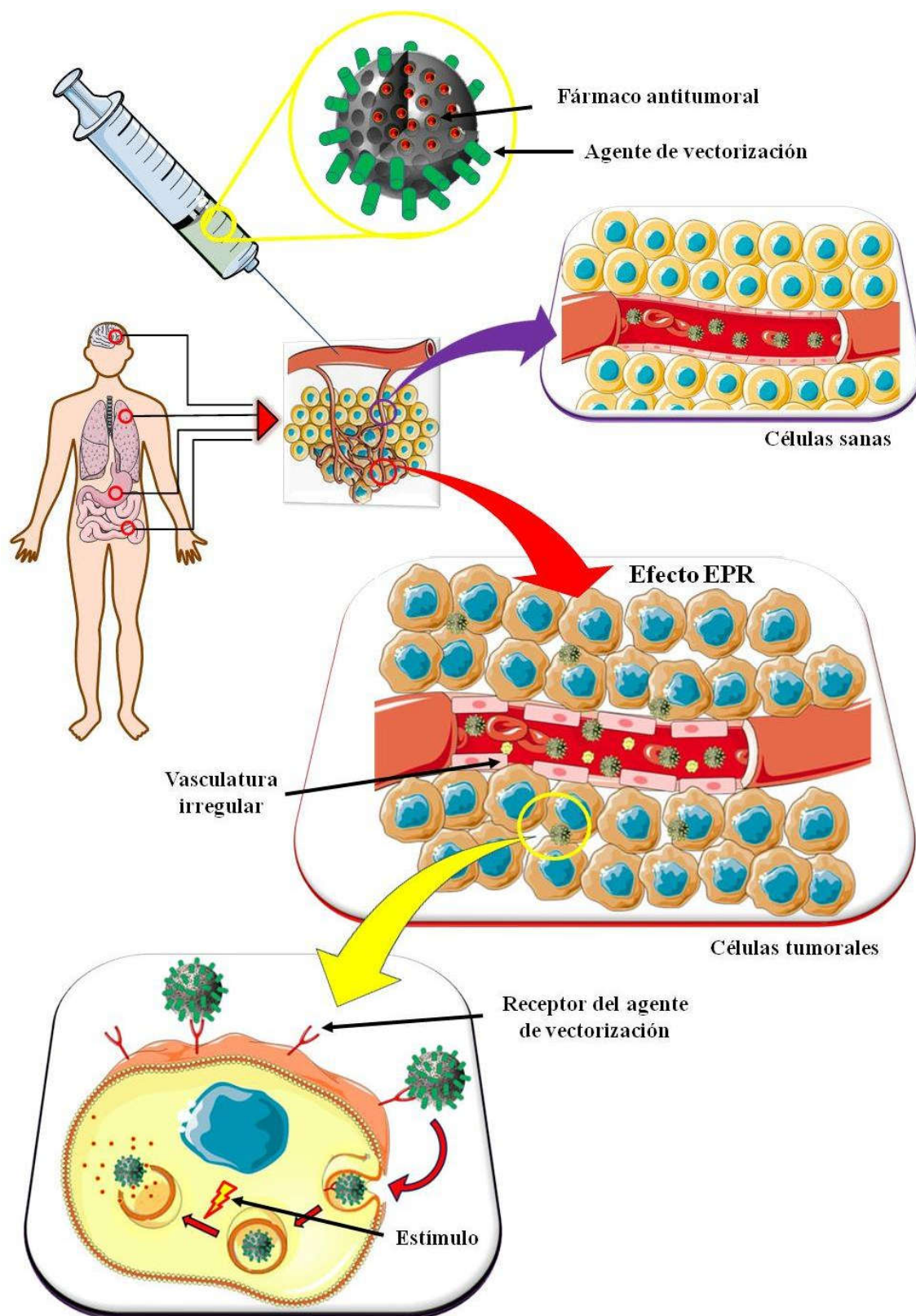


Figura 3.1. Esquema del funcionamiento de las MSNs inteligentes para el tratamiento de tumores sólidos.

Review

Smart Mesoporous Nanomaterials for Antitumor Therapy

Marina Martínez-Carmona^{1,2,3}, **Montserrat Colilla**^{1,2,3,*} and **Maria Vallet-Regí**^{1,2,3,*}

3.2 Nanopartículas de sílice mesoporosa con una cubierta proteica que responde a la luz para terapia antitumoral altamente citotóxica

En el presente trabajo titulado “**Mesoporous silica nanoparticles grafted with a light-responsive protein shell for highly cytotoxic antitumoral therapy**”, se ha diseñado y desarrollado un novedoso nanodispositivo fotosensible para la administración de fármacos basado en MSNs recubiertas con una capa proteica escindible mediante irradiación con luz UV.

Este sistema presenta varias ventajas comparado con otros ya existentes, siendo una de ellas el estímulo empleado, ya que dentro de los distintos estímulos externos (campo magnético, campo eléctrico, luz, ultrasonidos, etc.) que pueden emplearse para diseñar nanopartículas estímulo-respuesta, la luz es uno de los más interesantes. Esto se debe a varios motivos, como al hecho de que presenta baja toxicidad, y a que su aplicación pueda ser controlada espacial y temporalmente mediante una selección precisa de la zona y el tiempo de exposición.^{245,246} Por otra parte, la luz puede ser aplicada localmente en las áreas tumorales internas utilizando sondas ópticas. Desde que Fujiwara y col.²⁴⁷ describieron las primeras MSNs sensibles a la luz el desarrollo de este tipo de sistemas ha evolucionado notablemente.^{248–250}

En nuestro caso la molécula sensible a la luz es un nitro-derivado bencénico que en presencia de radiación UV se rompe dando lugar a un grupo cetona y a una amina primaria (**Figura 3.2**).

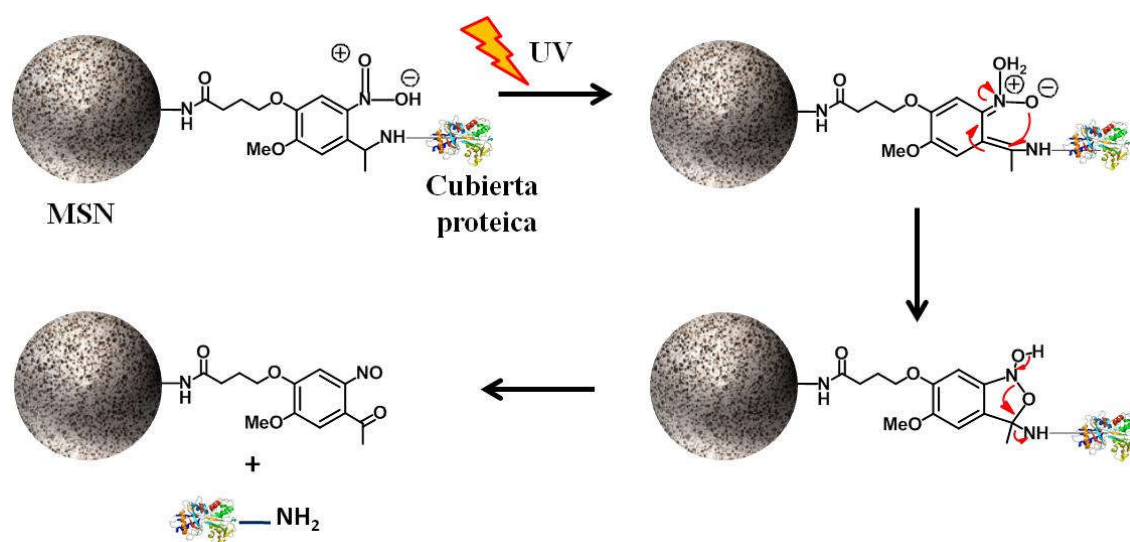


Figura 3.2 Esquema del mecanismo de rotura de la molécula fotosensible por acción de la radiación UV.

Otra ventaja de este sistema es que la cubierta proteica (transferrina, biotina, avidina y estreptavidina) que bloquea los poros es totalmente biocompatible con los sistemas biológicos, biodegradable, no tóxica y no inmunogénica. Por el contrario otros

dispositivos empleados en el tratamiento de tumores sólidos utilizan como unidades de bloqueo de los poros elementos (nanopartículas metálicas, dendrímeros, polímeros catiónicos, etc.) que pueden ser dañinos en sí mismos.^{251,252}

Por otra parte, con el fin de evitar el uso de sistemas redundantes, el recubrimiento proteico tiene una doble funcionalidad actuando a la vez como tapa y como agente de vectorización para células tumorales. La transferrina (Tf) biotinizada actúa como agente de “targeting” ya que las células tumorales sobreexpresan en su superficie receptores para esta proteína transportadora de hierro (**Figura 3.3**).

Por último, cabe destacar que la unión de la Tf al dispositivo fotosensible tiene lugar vía biotina-estreptavidina. Esta es una de las interacciones no covalentes más fuertes conocidas en el campo de la biología ($K_d = 4 \times 10^{-14}$ M). Se sabe que la unión tiene lugar muy rápidamente y que se mantiene estable en grandes intervalos de pH y temperatura. Esta unión aporta gran versatilidad al sistema ya que permite usar no sólo Tf sino cualquier agente de vectorización o molécula terapéutica que nos interese biotinizándola previamente. Además, a muy bajas concentraciones este nanodispositivo ha demostrado tener una elevada capacidad citotóxica *in vitro* frente a varias líneas tumorales que sobreexpresan receptores de Tf. Por tanto estos resultados avalan las potenciales aplicaciones clínicas antitumorales de este nanosistema.

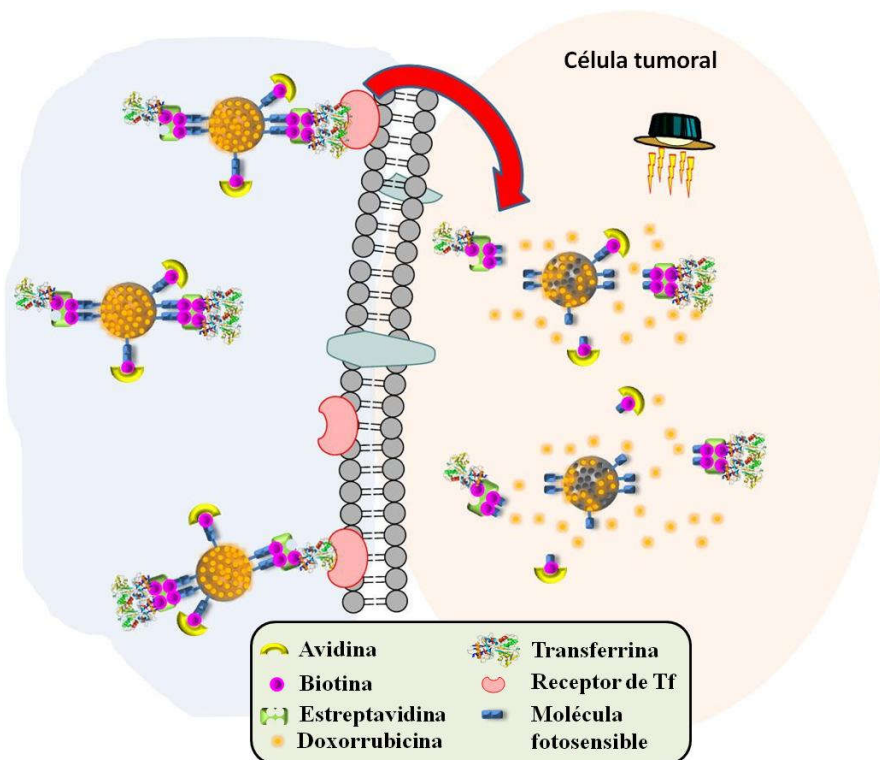


Figura 3.3 Resumen esquemático del funcionamiento del nanosistema fotosensible desarrollado en este trabajo.



Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2015,
3, 5746

Mesoporous silica nanoparticles grafted with a light-responsive protein shell for highly cytotoxic antitumoral therapy†

Marina Martínez-Carmona,^a Alejandro Baeza,*^a Miguel A. Rodríguez-Milla,^b
Javier García-Castro^b and María Vallet-Regí*^a

DOI: 10.1039/c5tb00304k

3.3 Liberación selectiva de topotecan en células cancerosas mediante la vectorización de nanopartículas de sílice mesoporosa sensibles al pH

En este artículo de investigación titulado “**Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles**”, se presenta un nanodispositivo capaz de dirigirse selectivamente a las células cancerosas y una vez internalizado liberar el citotóxico topotecan (TOP) de forma activa como respuesta al pH ácido de los compartimentos intracelulares (endo/lisosomas) de las mismas.

Al igual que entre los estímulos externos la luz era uno de los más ampliamente explotados, dentro de los estímulos internos el pH es también muy relevante.²⁵³ Los estímulos internos tienen la ventaja de no ser invasivos, ya que no requieren mediación externa para desencadenar la liberación del fármaco. Sin embargo, el control sobre la liberación del fármaco es menor en comparación con los nanosistemas que operan bajo estímulos externos. En algunos casos la falta de control es crucial, tanto que dificulta el buen funcionamiento del sistema. Por ejemplo, en sistemas de administración sensibles a enzimas o potenciales redox la concentración de dichas enzimas o especies reductoras en el interior celular es inferior a la mínima concentración necesaria para desencadenar una respuesta eficaz en el dispositivo.¹⁵⁴ Por lo que nanosistemas potencialmente funcionales *in vitro*, en los que es posible controlar la concentración de la molécula desencadenante, no lo son al pasar a ensayos *in vivo* donde dichas concentraciones se ven muy disminuidas. En el caso del pH, no existe este hándicap puesto que los valores de pH en medios fisiológicos, en distintos orgánulos o en el entorno tumoral han sido ampliamente descritos.^{254,255} De este modo, el reto se “limita” a diseñar un dispositivo que responda al pH deseado.

En el presente trabajo el elemento sensible al pH consiste en un recubrimiento de gelatina parcialmente entrecruzada con glutaraldehído. La gelatina es una mezcla de péptidos y proteínas producida por la hidrólisis parcial del colágeno extraído de la piel, los huesos y los tejidos conectivos de animales tales como pollos, cerdos, caballos y peces. Durante la hidrólisis, los enlaces moleculares naturales entre cadenas de colágeno individuales se rompen. La gelatina se utiliza comúnmente para aplicaciones farmacéuticas y médicas debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad en ambientes fisiológicos (**Figura 3.4**).

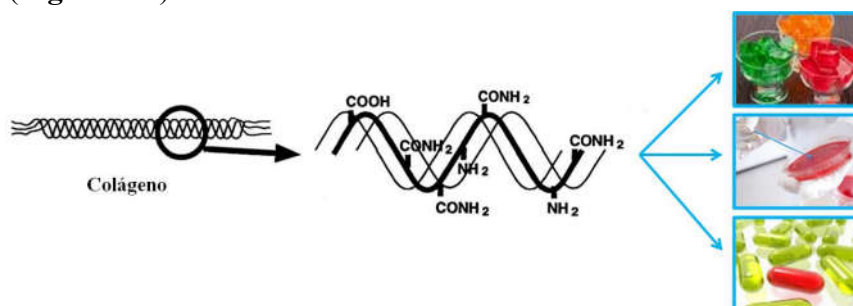


Figura 3.4. Esquema de obtención de la gelatina a partir de colágeno e imágenes de algunas de sus aplicaciones cotidianas.

El recubrimiento de gelatina tiene un papel multifuncional en dichas MSNs: *i)* protege el TOP de la hidrólisis y evita su liberación prematura; *ii)* actúa como una tapa sensible al pH; y *iii)* proporciona múltiples puntos de anclaje para la unión de agentes de vectorización.

El TOP, un derivado de la camptotecina soluble en agua, es un potente agente antitumoral que está recibiendo una atención creciente para el tratamiento de varios tipos de cáncer.²⁵⁶ Sin embargo, una de las principales limitaciones en su uso clínico es su inactivación al pH fisiológico de 7,4.^{257,258} El sistema aquí desarrollado permite proteger y transportar el TOP hasta el interior de los compartimentos intracelulares (pH < 5,5) de las células cancerosas donde es liberado y lleva a cabo su acción antitumoral.

El agente de vectorización seleccionado en este caso ha sido el ácido fólico (FA) ya que es ampliamente conocido y se ha descrito en numerosas ocasiones en la bibliografía que su receptor (FA-R) se sobreexpresa con frecuencia en la superficie de distintas células de cáncer humano.²⁵⁹ Si bien es cierto que en este estudio el FA ha sido seleccionado como agente de vectorización, el uso de la gelatina que presenta numerosos grupos -COOH y -NH₂, aporta gran versatilidad permitiendo fácilmente el anclaje de cualquier otro agente de “targeting” o molécula terapéutica mediante un enlace amida.

Los estudios celulares demuestran que las MSNs cargadas con TOP, recubiertas con gelatina y decoradas con FA producen una muerte celular mucho mayor y más efectiva que cualquiera de los sistemas incompletos en las células que sobreexpresan FA-R (**Figura 3.5**).

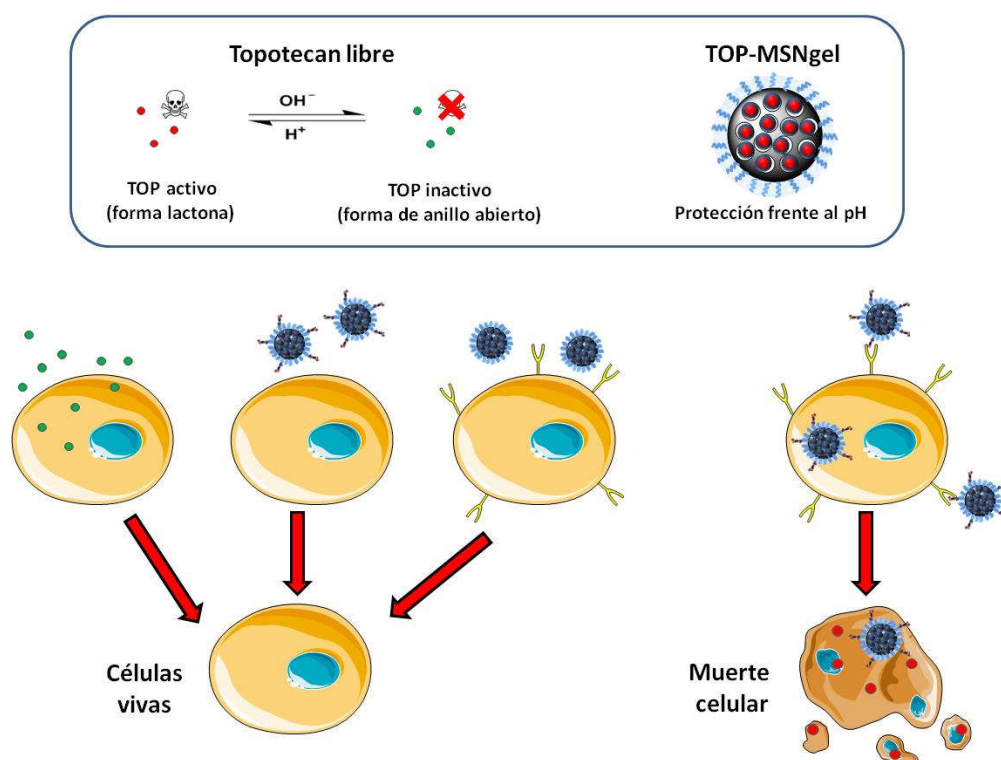


Figura 3.5. Resumen esquemático de la mayor selectividad y poder citotóxico del sistema desarrollado en células tumorales frente a células sanas.



Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 50923

Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles†

M. Martínez-Carmona,^{abc} D. Lozano,^a M. Colilla^{*abc} and M. Vallet-Regí^{*abc}

DOI: 10.1039/c6ra07763c

3.4 Efecto sinérgico antitumoral de nanopartículas de sílice mesoporosa sensibles al pH y vectorizadas con lectina

Por norma general, para tratar cualquier patología no existe una única terapia sino varias, y el ataque de dicha enfermedad desde varios frentes, de forma sucesiva o simultánea, suele ser beneficioso. Concretamente en el tratamiento del cáncer gran parte de los esfuerzos en la investigación oncológica están dirigidos hacia la búsqueda de combinaciones de fármacos que permitan una mayor supervivencia global y una mejora en la calidad de vida del paciente. Se ha demostrado que algunas combinaciones específicas de dos fármacos citotóxicos o de un fármaco con otra molécula concreta, producen efectos sinérgicos como resultado de una mayor capacidad citotóxica y una disminución de los efectos secundarios.^{260,261} Algunos estudios *in vitro* demuestran que la administración combinada de determinadas lectinas y la DOX, produce un fuerte efecto sinérgico en la apoptosis de ciertas células tumorales que no existe cuando los agentes son administrados de forma independiente.²⁶²

Las lectinas, proteínas vegetales bioactivas, están siendo cada vez más estudiadas en biomedicina, especialmente por su potencial aplicación en el tratamiento del cáncer.²⁶³⁻²⁶⁵ Las lectinas son un tipo muy variado de proteínas que contienen al menos un dominio no catalítico que emplean en el reconocimiento selectivo y la aglutinación reversible de células. Dicho dominio es capaz de reconocer y unirse de forma selectiva y reversible a glicoconjugados de la superficie celular, permitiendo la entrada de un segundo dominio tóxico en la célula.²⁶⁶ De entre todas las posibilidades, en este trabajo de investigación se ha seleccionado la Concanavalina A (ConA), una lectina ampliamente estudiada que ha demostrado poseer capacidad antitumoral contra varios tipos de células cancerosas.^{267,268} Hoy día aún existe controversia sobre el o los mecanismos por los que la ConA induce apoptosis en células tumorales.^{267,268} Sin embargo parece que hay cierto acuerdo en que la ConA activa la respuesta inmune que colabora en la erradicación del tumor.²⁶⁹

En los últimos años se ha estudiado la presencia de ácido siálico, un glicano unido a las glicoproteínas celulares, como marcador del cáncer.²⁷⁰ En 2010 Takai y col.²⁷¹ diseñaron una sonda fluorescente para la detección de células cancerosas basada en la interacción lectina-ácido siálico. En este trabajo de investigación titulado **“Synergistic antitumor effect of lecting-targeted pH-responsive mesoporous silica nanoparticles”** se ha pretendido aprovechar dicha interacción desde una perspectiva diferente. Para ello la superficie de las MSNs ha sido decorada con ConA con el fin de dirigirlas selectivamente hacia células tumorales, que sobreexpresen ácido siálico, frente a células sanas. Una vez internalizado el nanodispositivo la acidificación del pH en los endo/lisosomas provoca la liberación del citotóxico (DOX) cargado y la apoptosis de las células tumorales (**Figura 3.6**).

En este caso el elemento sensible al pH es 3,9-Bis(3-aminopropil)-2,4,8,10-tetraoxaspiro undecano (ATU) una molécula escindible a pH ligeramente ácido (< 5,5), y

la salida prematura de la DOX de los poros se evita mediante un recubrimiento polimérico de ácido poliacrílico (PAA).

Finalmente cabe de destacar, que la capacidad citotóxica de este nanosistema se ve intensificada por la acción conjunta de la DOX y la ConA en el mismo nanodispositivo. Además, la doble funcionalidad de la ConA, como agente de vectorización y como elemento citotóxico simplifica el sistema, evitando el uso de elementos redundantes.

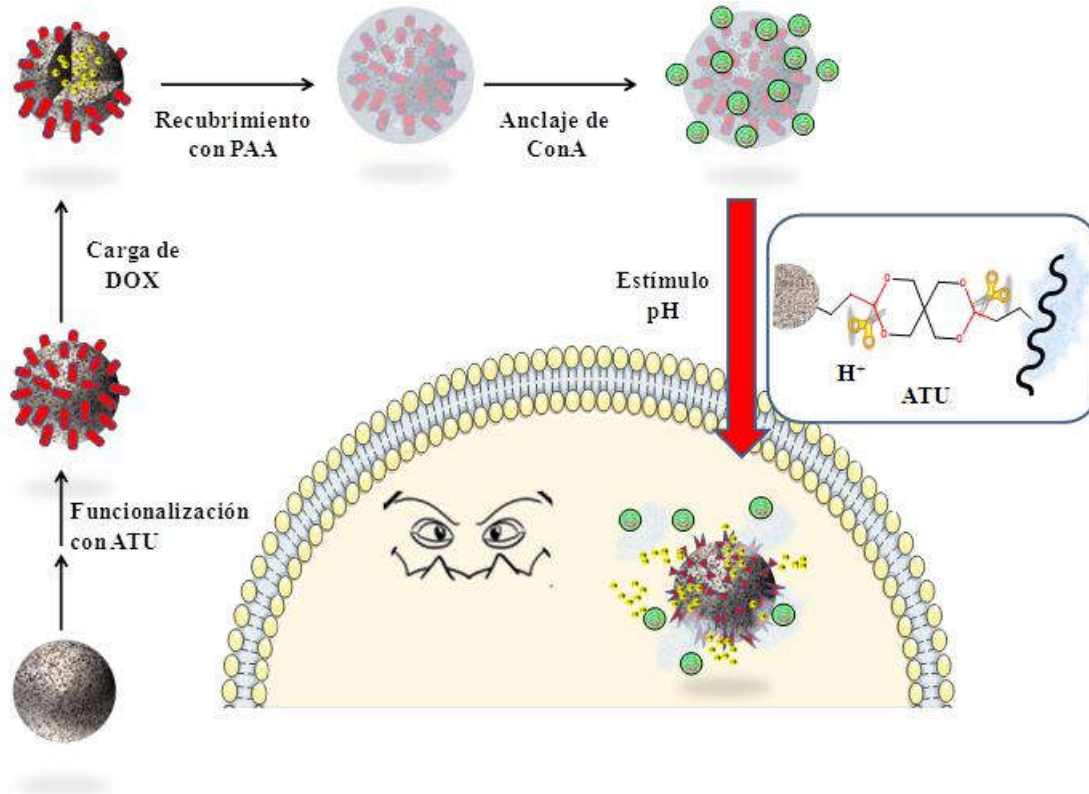


Figura 3.6 Resumen esquemático del funcionamiento del nanosistema pH sensible con acción sinérgica antitumoral desarrollado en este trabajo.

Synergistic antitumor effect of lectin-targeted pH-responsive mesoporous silica nanoparticles

Introduction

Nowadays one of the most important challenges in cancer therapy is the design of nanocarriers able to selectively transport cytotoxic drugs to tumour cells and release their cargo once the target has been reached. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are excellent candidates to develop targeted stimuli-responsive drug delivery devices.^{154,272-275} It has been demonstrated that some specific combinations of two cytotoxic drugs or a cytotoxic drug with another molecule underlying synergistic effects result in the enhancement of tumor cell killing capability and the minimization of side effects.^{260,261} Some *in vitro* studies demonstrated that the combined administration of a lectin and the antitumor drug doxorubicin (DOX) produces a strong synergistic apoptotic effect in certain cancer cells that does not occur when the agents are independently administrated.

Lectins are bioactive plant proteins that are receiving growing interest in biomedicine, especially for their potential in cancer treatment.²⁶³⁻²⁶⁵ Lectins are a highly diverse class of proteins that contain at least one non-catalytic domain for selective recognition and reversible cell agglutination. The recognition domain is capable of selectively recognizing and reversibly binding to cell-surface glycoconjugates and thereby permits entry into the cell of the toxic domains.²⁶⁶ Among lectins, Concanavalin A (ConA) should be highlighted since its antitumor capacity against various types of cancer cell lines has been reported.^{267,268} Mechanisms by which ConA induces cancer cell death still remains rudimentarily understood. Shi *et al.* reported that ConA induced apoptotic cell death affecting the level of DNA transcription,²⁶⁸ while Lhei *et al.* suggested that after binding to the glycoproteins on the cell membrane ConA is preferentially addressed to the mitochondria and there an autophagy is triggered, which leads to cell death.²⁶⁷ Nonetheless there seems to be a consensus that ConA can also activate the immune response therefore participating in the tumor eradication.²⁶⁹

In recent years, sialic acids, a type of glycans attached to glycoproteins on the cell, have been studied as disease-associated carbohydrate derivatives, because their expression provides many opportunities for the appraisal of the cell processes.^{270,276} Takai's group designed lectin-tagged fluorescent polymeric nanoparticles as potential bioimaging probes for detecting diseased cells by the union lectin-sialic acids. Through cellular experiments, they successfully detected sialic acid overexpression on cancerous cells with high specificity.²⁷¹

Herein, we wanted to use the lectin-sialic acid interaction from a different perspective. Therefore the surface of the nanoparticles has been 'decorated' with ConA and the targeting effect on tumor cells overexpressing sialic acid versus healthy ones have been studied. We propose a pH-responsive mesoporous silica/polymer hybrid nanosystem entrapping DOX in the mesopores and incorporating ConA in its outermost surface. The premature DOX release is prevented by a PAA coating through a pH-linker (ATU)

breakable to slightly acidic pH (< 5.5). ConA permits avoiding the use of redundant systems by acting both as targeting and therapeutic agent. Improved synergistic antitumor therapy is expected through the combination of ConA and DOX in the same nanosystem.

Experimental section

Reagents

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) Inc.: Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) Type VI, lyophilized powder (ConA), tetraethylorthosilicate (TEOS, 98 %), n-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, ≥ 99 %); Poly(acrylic acid) partial sodium salt solution (PAA), sodium hydroxide (NaOH, ≥ 98 %), ammonium nitrate (NH₄NO₃, ≥ 98 %), sodium carbonate (Na₂CO₃, $\geq 99,5$ %); fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC, ≥ 98 %), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES, ≥ 98 %), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 99 %), N-hydroxysuccinimide (NHS, 98 %), phosphate-buffered saline (PBS, 10x), hydrochloric acid (HCl, 37 %), tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride ([Ru(bipy)₃]Cl₂), and doxorubicin hydrochloride (European Pharmacopoeia) (DOX). 3-(triethoxysilyl)propylsuccinic anhydride (SATES) was purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany) and 3,9-Bis(3-aminopropyl)-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] undecane (ATU) was purchased from TCY (Tokyo, Japan). All other chemicals were purchased from Panreac Química SLU (Castellar del Valles, Barcelona, Spain) inc: absolute ethanol (EtOH), acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO), etc. All reagents were used as received without further purification. Ultrapure deionized water with resistivity of 18.2 MΩ was obtained using a Millipore Milli-Q plus system.

Characterization Techniques

Powder X-Ray Diffraction (XRD) experiments were performed in a Philips X'Pert diffractometer equipped with Cu K α radiation (wavelength 1.5406 Å) (Philips Electronics NV, Eindhoven, Netherlands). XRD patterns were collected in the 2 θ range between 0.6° and 8° with a step size of 0.02° and counting time of 5 s per step. Thermogravimetric (TG) measurements were performed in a Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA (California, USA), with 5 °C/min heating ramps, from room temperature to 600 °C. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was carried out in a Nicolet (Thermo Fisher Scientific) Nexus equipped with a Goldengate attenuated total reflectance device (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI USA). Surface morphology was analysed by Scanning Electron Microscopy (SEM) on a JEOL JSM-6335F (Tokyo, Japan) (ICTS Electron Microscopy Centre, UCM). The samples underwent Au metallization previous to observation. Mesostructural order and nanoparticles functionalization were studied by High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) with a JEOL JEM 3000F instrument operated at 300 kV, equipped with a CCD camera (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Sample preparation was performed by dispersing in distilled water and subsequent

deposition onto carbon-coated copper grids. A solution of 1 % of PTA (pH 7.0) was employed as staining agent in order to visualize the organic coating around MSNs.

The hydrodynamic size of nanoparticles by dynamic light scattering (DLS) and zeta (ζ)-potential were measured in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, United Kingdom) equipped with a 633 nm “red” laser. The textural properties of the materials were determined by N₂ adsorption porosimetry by using a Micromeritics ASAP 2020 (Micromeritics Co., Norcross, USA). To perform the N₂ measurements, the samples were previously degassed under vacuum for 24 h at 40 °C temperature. The surface area (S_{BET}) was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method and the pore volume (V_{p}) was estimated from the amount of N₂ adsorbed at a relative pressure around 0.99. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was calculated from the desorption branch of the isotherm by means of the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. The mesopore size (D_{p}) was determined from the maximum of the pore size distribution curve.

Synthesis of mesoporous silica nanoparticles (MSN)

Bare MSNs, denoted as MSN, were synthesized by the modified Stöber method using TEOS as silica source in the presence of CTAB as structure directing agent. Briefly, 1 g of CTAB, 480 mL of H₂O and 3.5 mL of NaOH (2 M) were added to a 1L round-bottom flask. The mixture was heated to 80 °C and magnetically stirred at 600 rpm. When the reaction mixture was stabilized at 80 °C, 5 mL of TEOS were added dropwise at 0.33 mL/min rate. The white suspension obtained was stirred during further 2h at 80 °C. The reaction mixture was centrifuged and washed three times with water and ethanol. Finally the product was dried under vacuum at 40 °C.

Synthesis of fluorescent MSN

For cellular internalization studies fluorescein labeled MSN were synthesized. FITC (1 mg) and APTES (2.2 μL) were dissolved in the minimum volume of EtOH and the mixture was stirred at room temperature for 2 h under N₂ atmosphere. The resulting solution was named Solution 1.

Fluorescent MSN were synthesized following the same procedure used for MSN but instead of adding 5 mL of TEOS, a mixture of 5 mL of TEOS and Solution 1 was used.

Functionalization with SATES (MSN_{COOH})

500 mg of MSN were placed in a three-neck round bottom flask and dried at 80 °C under vacuum for 24 h. Then, 125 mL of dry toluene were added and the flask was placed in an ultrasonic bath for better suspension of particles. After that 300 μL of SATES were added, keeping the reaction under nitrogen atmosphere at 90 °C for 24 h. After that 40 mL

of slightly acidified water were added in order to hydrolyze the succinic groups. MSN_{COOH} were collected by centrifugation, washed three times with ethanol and dried under vacuum at 40 °C.

Functionalization with ATU (MSN_{ATU})

300 mg of MSN_{SATES} were added to a solution of 480 mg EDC and 180 mg of NHS. After 30 min of stirring 2 g of ATU were added and the mixture was left to react overnight. The product was filtered, washed with water and dried under vacuum at 40 °C.

Finally, the surfactant was removed by ionic exchange using a solution of ammonium nitrate (10 mg/mL) in 400 mL of ethanol (95 %) at 65 °C overnight under magnetic stirring. MSN_{ATU} were collected by centrifugation, washed successively with water and ethanol and dried under vacuum at 40 °C.

Coating optimization study

Coating degree of the nanoparticles was studied by increasing the amount of PAA added to a suspension of 10 mg of nanoparticles in 1 mL of PBS from 0.36 to 36 $\mu\text{L/mL}$. As shown in **Figure 3.7**, the most effective and uniform coating was achieved for the lowest polymer concentration.

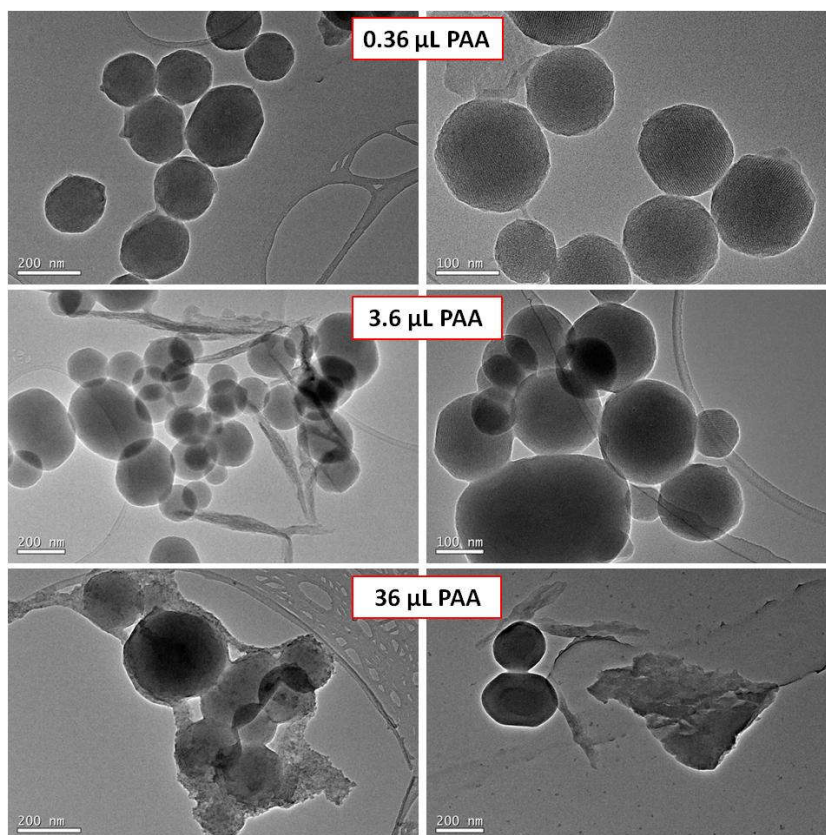


Figure 3.7 TEM images of the polymeric coated MSNs obtained by modifying the PAA amount.

[Ru(bipy)₃]Cl₂/DOX loading and capping (MSN_{PAA})

40 mg of MSN_{ATU} were placed in a vial and dried at 80 °C under vacuum overnight. Then, 6 mL of [Ru(bipy)₃]Cl₂ or DOX aqueous solution (10 or 3 mg/mL respectively) were added and the suspension was stirred at room temperature for 24 h. After that, 2.2 µL of PAA were added and stirred for 10 min before adding 96 mg of EDC and 36 mg of NHS and finally allowed to react overnight at room temperature. Then, samples were filtered and washed twice with PBS pH = 7.4 in order to remove the [Ru(bipy)₃]Cl₂ or DOX adsorbed on the external surface of the nanoparticles. Finally, the products were dried under vacuum at 25 °C.

Functionalization with ConA (MSN_{ConA})

16 mg of MSN_{PAA} were placed in a vial and suspended in 2 mL of PBS pH = 7.4. After that, 30 mg of EDC were added and the mixture was stirred at room temperature for 40 min. Then 14 mg of NHS were added and the reaction was stirred for further 10 min before adding 30 mg of ConA and finally allowed to react overnight at room temperature. Then, samples were filtered and washed twice with PBS pH = 7.4 and dried under vacuum at 25 °C.

Cell cultures

Cell culture tests were performed using the well-characterized mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 (subclone 4, CRL-2593; ATCC, Mannassas, VA) and HOS cells derived from a human osteosarcoma (CRL-1543; ATCC, Mannassas, VA). The tested nanoparticles were placed into each well of 6- or 24-well plates (Corning, CULTEK, Madrid, Spain) after cell seeding. MC3T3-E1 and HOS cells were then plated at a density of 20,000 cells/cm² in 1 mL of α -minimum essential medium (MEM, Sigma Chemical Company) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Chemical Company), respectively, containing 10 % of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1 % penicillin–streptomycin (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂, and incubated for different times. Some wells contained no nanoparticles as controls.

Cell viability

Cell growth was analyzed using the CellTiter 96® AQueous Assay (Promega, Madison, WI, USA), a colorimetric method for determining the number of living cells in culture. Briefly, both type of cells were cultured as described above without (control) or with the tested materials and/or different concentrations of ConA for several times. At each time, 40 µL of CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophe-nyl)-2H-tetrazoliumsalt (MTS) and an electron coupling reagent (phenazine ethosulfate) that allows its

combination with MTS to form a stable solution was added to each well and incubated for 4h. The absorbance at 490 nm was then measured in a Unicam UV-500 UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).

Flow cytometry studies

MC3T3-E1 and HOS cells were cultured in each well of a 6-well plate. After 24h, the cells were incubated at different times in the absence or presence of the tested nanoparticles (100 µg/mL). After 2 h, cells were washed twice with PBS and incubated at 37 °C with trypsin-EDTA solution for cell detachment. The reaction was stopped with culture medium after 5 min and cells were centrifuged at 1,000 rpm for 10 min and resuspended in fresh medium. Then, the surface fluorescence of the cells was quenched with trypan blue (0.4 %) to confirm the presence of an intracellular, and therefore internalised, fluorescent signal. Flow cytometric measurements were performed at an excitation wavelength of 488 nm, green fluorescence was measured at 530 nm (FL1). The trigger was set for the green fluorescence channel (FL1). The conditions for the data acquisition and analysis were established using negative and positive controls with the CellQuest Program of Becton-Dickinson and these conditions were maintained during all the experiments. Each experiment was carried out three times and single representative experiments are displayed. For statistical significance, at least 10,000 cells were analysed in each sample in a FACScan machine (Becton, Dickinson and Company, USA) and the mean of the fluorescence emitted by these single cells was used.

Sialic acid levels

The contents of the resulting free N-acetylneuraminic acid were measured using a sialic acid (NANA) fluorometric assay kit (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, followed by detection and analyses UV-visible. This kit utilizes an enzyme coupled reaction in which free sialic acid is oxidized resulting in development of Oxi-Red probe to give absorbance (OD = 570 nm).

Results and discussion

Characterization of the nanosystems

The overall scheme of the synthetic process for the formation of the synergistic pH-responsive nanoparticles can be observed in **Figure 3.8**.

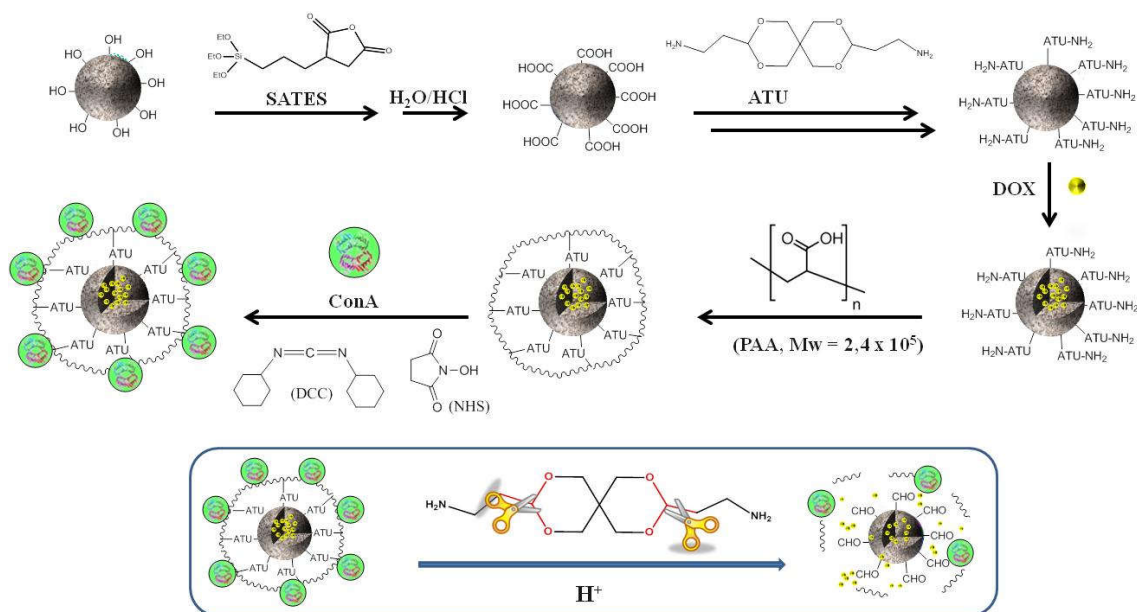


Figure 3.8 Schematic illustration of the synthetic process for the formation of the synergistic pH-responsive nanoparticles and their behavior in acidic environments.

Initially spherical MSN were synthesized according to a modified Stöber Method. The average particle size was tuned to 130-170 nm and confirmed by SEM (**Figure 3.9**).

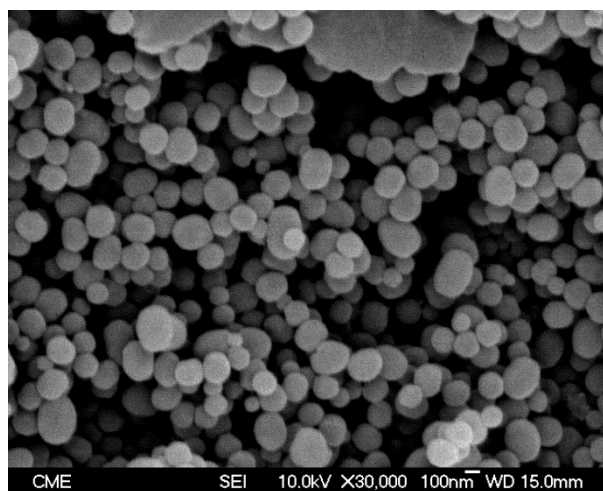


Figure 3.9. SEM images of MSN.

MSN were successively functionalized with SATES, ATU, PAA and ConA and the physico-chemical, structural and textural properties of the final nanosystem as well as intermediate products were studied by different techniques.

TGA measurements allowed determining the functionalization degree of the different nanoparticles from the organic matter content (% OM) (**Table 3.1**). The amount

of polymer and ConA grafted to MSN were *ca.* 7 % and 10 %, respectively, which accounts for the suitability of the functionalization methods here reported.

Sample name	% OM	% Functionalization
MSN	4.5	-
MSN _{SATES}	21.9	17.4
MSN _{ATU}	28.8	6.9
MSN _{PAA}	36.2	7.4
MSN _{ConA}	46.5	10.3

Table 3.1 Functionalization degree of the different nanoparticles measured by TGA.

ζ -potential measurements in water of the different nanoparticles showed notable variations in the surface charge (**Figure 3.10**). This is consistent with the different chemical nature of the molecules incorporated in each step of the synthesis. The values change from -20.0 mV for MSN to -39.2 mV for MSN_{COOH} because of the incorporation of -COOH groups of SATES onto the surface of the MSN. For MSN_{ATU} the ζ -potential increased to -15.0 mV what is also consistent with the incorporation of amino groups from ATU. The coating process with an acid polymer (PAA) entailed again a decrease in the ζ -potential of the so called MSN_{PAA} until -54.4 mV (MSN_{PAA}). Finally anchoring ConA by amide linkages with the acid groups of the polymer resulted in a ζ -potential value of -34.2 mV for the entire system MSN_{ConA}.

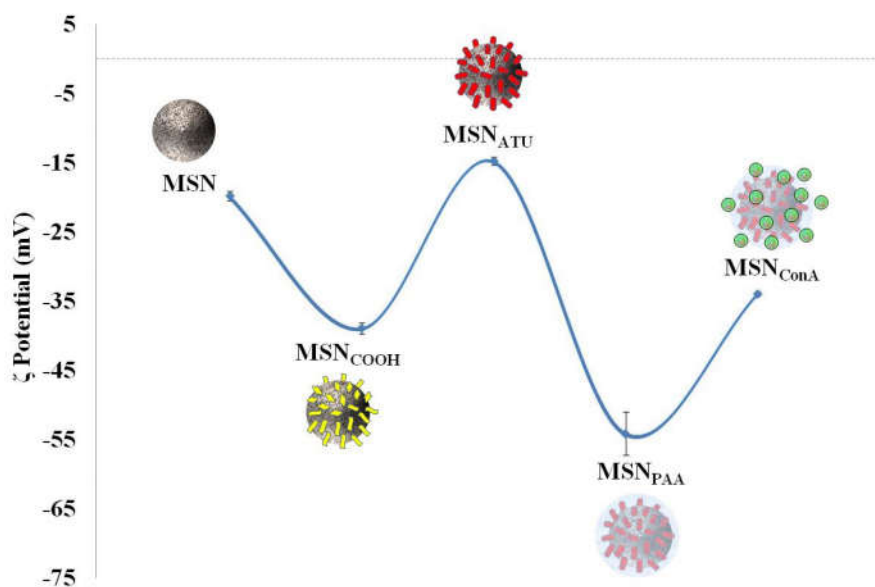


Figure 3.10 Evolution of the ζ -potential measurements.

As expected, the textural properties of nanoparticles (mainly surface area, pore volume and pore diameter) experience a significant decrease with increasing surface 'decoration'. N₂ adsorption-desorption isotherms are of type IV corresponding to mesoporous materials (**Figure 3.11**). The appropriate treatment of the experimental data

evidences some changes in the textural parameters of MSN_{ATU} and an abrupt decrease in those of MSN_{PAA} . The surface area (S_{BET}) decrease from 1210 m^2/g for MSN to 607 m^2/g and 22 m^2/g for MSN_{ATU} and MSN_{PAA} , respectively. The initial pore volume (V_P) of MSN decreases from 1.41 cm^3/g , to 0.78 cm^3/g in MSN_{ATU} and 0.11 cm^3/g in MSN_{PAA} respectively. Pore diameter (D_P) experience a dramatically decrease dropping from 2.4 nm for MSN to a value that could not be determined in the case of MSN_{PAA} ; however, the size almost does not vary in MSN_{ATU} as the surfactant is removed after anchoring ATU in the nanoparticles. All these findings may account not only for the external polymeric covering of MSN but also for the partial occupation of the mesoporous cavities, in agreement with XRD results.

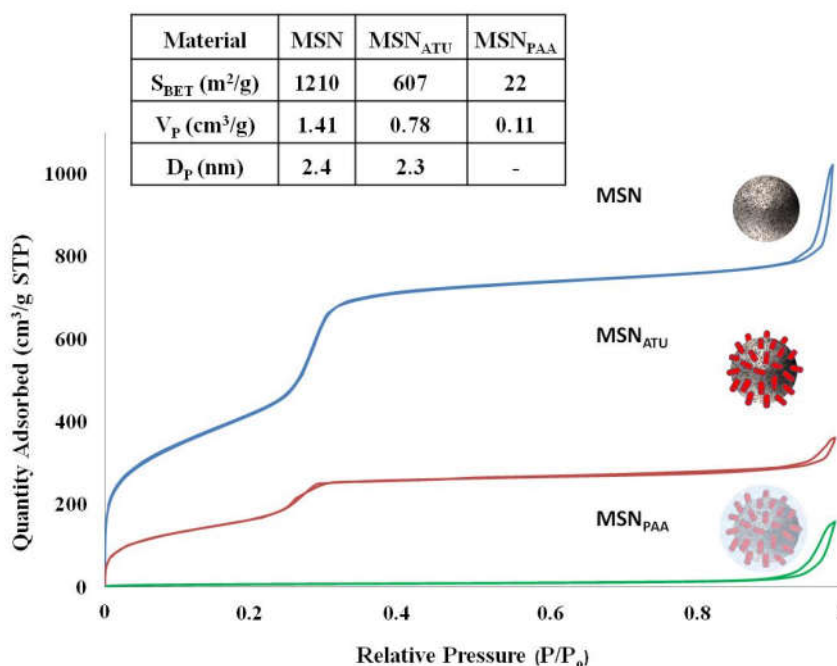


Figure 3.11 Textural properties and isotherm linear plot of the nanoparticles synthesized in this work.

FTIR spectra evidence the successful functionalization stages of MSN, since vibration bands corresponding to the grafted chemical groups are observed (**Figure 3.12**). Thus the FTIR spectrum of MSN_{SATES} shows an absorption band at 1715 cm^{-1} , owing to the C=O stretching vibration in carboxyl group.²⁷⁷ A slight displacement of C=O stretching vibration (1698 cm^{-1}) and an additional absorption band located at 1636 cm^{-1} characteristic of both primary and secondary amide, provided evidence of the satisfactory grafting of ATU.²⁷⁸ The polymerization is evidenced by the presence of a band at 1546 cm^{-1} characteristic of the asymmetric C-O stretching mode of pure PAA.²⁷⁹ The incorporation of ConA onto the surface does not involve the addition of any new functional group but the variation in the proportion of those already present, that is the reason because new bands do not appear in the spectrum but the relative intensity of the signals is modified showing that reaction takes place.

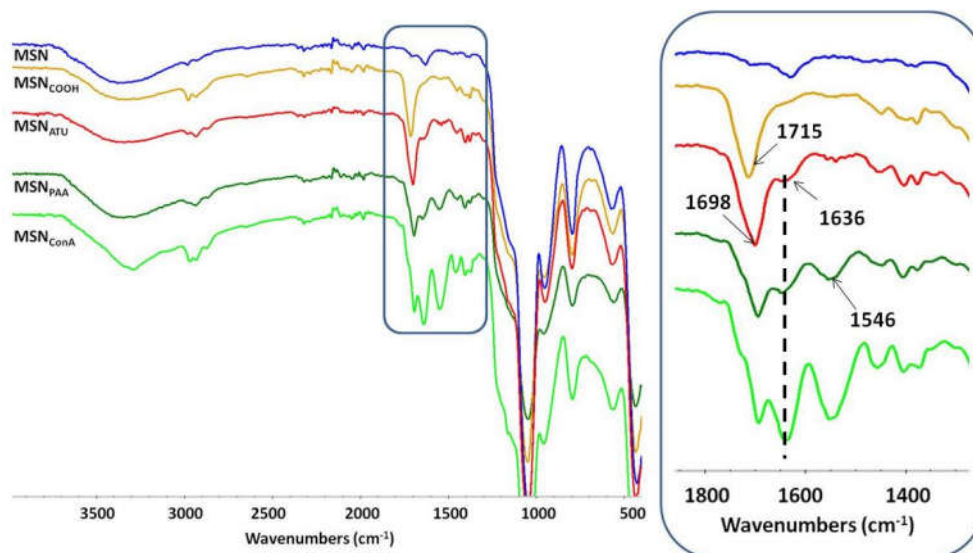


Figure 3.12 FTIR spectra of the nanomaterials synthesized in this work.

The functionalization sequence was followed by $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP-MAS solid state NMR spectroscopy (**Figure 3.13**). Compared with pure silica, MSN_{COOH} showed additional resonance signals at about 15, 19, 62 and 180 ppm, which can be assigned to characteristic carbon peaks of 1,2-bidentate carboxyl groups.²⁷⁷ The appearance of two signals at 80 and 110 demonstrate the presence of dioxane²⁸⁰ and the presence of a well-defined signal at 175 ppm indicates that ATU was covalently attached to MSN_{COOH} by an amide bond. When the polymer is attached onto the surface the two distinct peaks of pure PAA, are observed: one appears at around 40 ppm and another at 181 ppm.²⁸¹ The former is the methine and methylene carbons, and the latter is the carboxyl carbon.

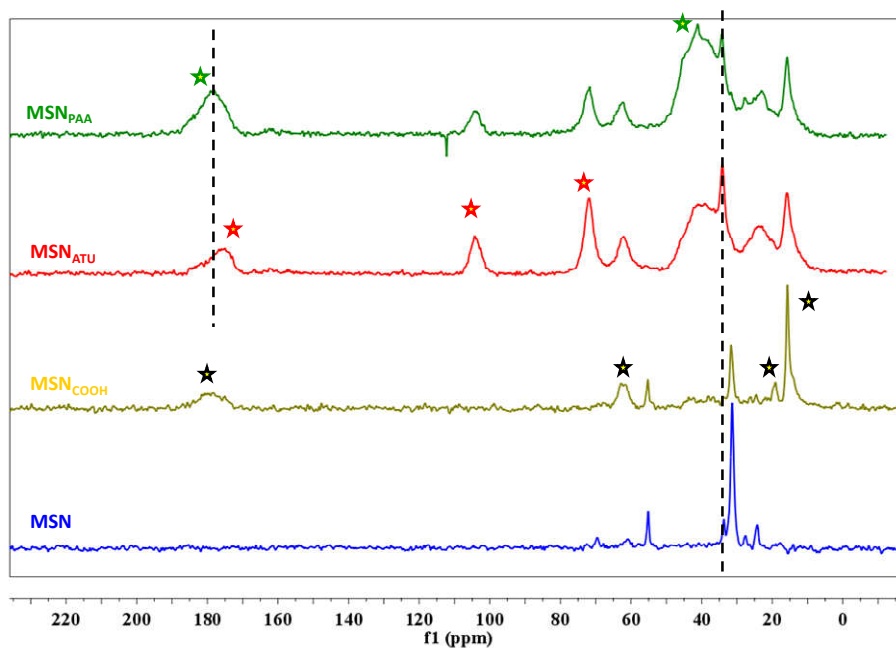


Figure 3.13. $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP-MAS solid state NMR spectra of the nanomaterials synthesized in this work.

XRD patterns at small angles of all nanoparticles exhibit three main signals that can be indexed as 10 , 21 and 20 , besides MSN exhibit an extra one 21 . These reflections are typical of a 2D hexagonal $p6mm$ space group MCM-41 type structure. A certain loss of the long-range order is observed after functionalization of pure silica nanoparticles as showed in **Figure 3.14**.

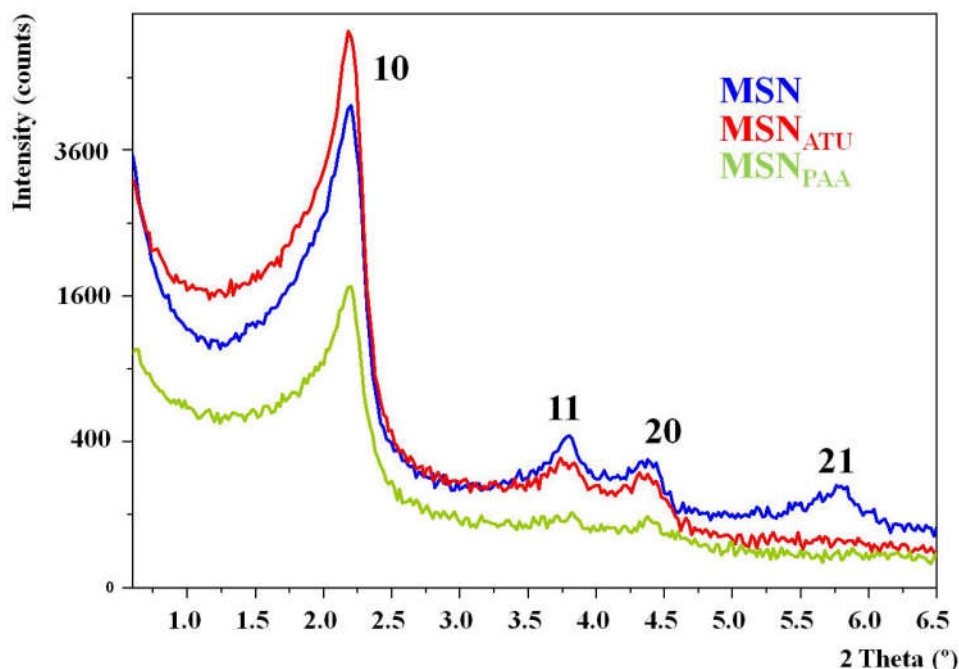


Figure 3.14 Small-angle XRD pattern of the nanomaterials synthesized in this work.

TEM images of samples confirm a honeycomb mesoporous arrangement typical of MCM-41 (**Figure 3.15**). Those allow to appreciate a transition in the features of nanoparticles surface from smooth (MSN) to rough (MSN_{PAA}), what evidence the polymeric grafting, and finally small globular aggregates can be observed (MSN_{ConA}) due to the lectin incorporation.

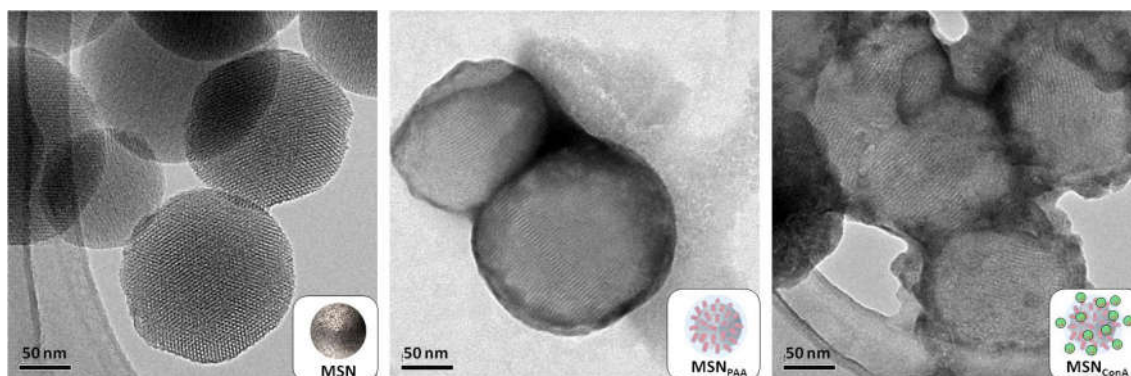


Figure 3.15. TEM images of MSN, MSN_{PAA} and MSN_{ConA} . Samples were stained using 1 % PTA.

“In vial” pH-responsive $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ release performance

The drug delivery behaviour of MSN_{PAA} was tested ‘in vial’ at two pH values, pH 7.3 mimicking extracellular conditions and those of endosomes or lysosomes ($pH \leq 5.5$). The amount of $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ released, chosen as model molecule, was monitored by fluorescence excitation spectroscopy. As shown in **Figure 3.16** at acidic pH’s, the hydrolysis of the acetal group removes PAA cap and allows escape of the entrapped molecules in a pH-dependent controlled release being 3-fold higher in acidic media than in neutral pH. Release profiles can be adjusted to first-order kinetic model by introducing an empirical non-ideality factor (δ) to give the following equation:

$$Y = A (1 - e^{-kt})^\delta$$

With Y being the percentage of $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ released at time t , A the maximum amount of $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ released (in percentage), and k , the release rate constant. In this approach, the values for δ are comprised between 1 for materials that obeys first-order kinetics, and 0, for materials that release the loaded drug in the very initial time of test. The parameters of the kinetic fitting shown in **Figure 3.16** indicate that $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ release is faster at pH 5.2 than at pH 7.3, due to the hydrolysis of the acetal group in the acidic media and the lost of the PAA cover. Under acidic conditions the δ value is very close to 1, pointing to a near first order kinetics; on the contrary at the physiological pH such value is *ca.* 0.6, indicating an initial burst release of the entrapped molecules. Nonetheless at pH 5.2 the total molecule release is almost 3 fold higher than that at pH 7.3, which is associated to a k value twice greater in acidic conditions.

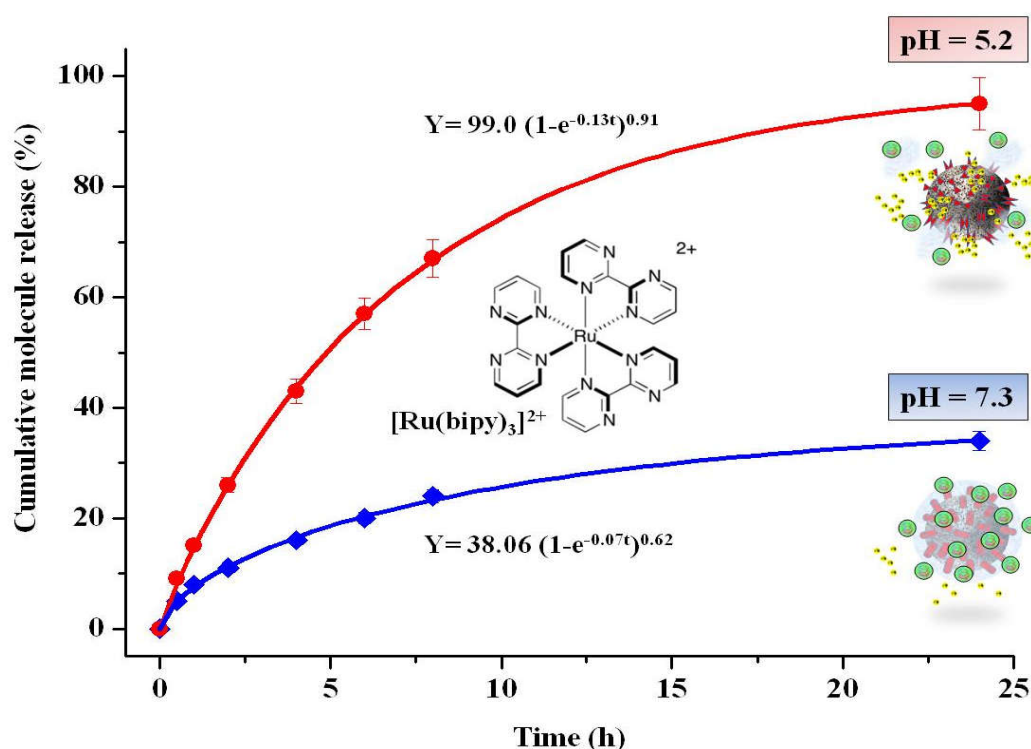


Figure 3.16 *In vial* cumulative $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ release (in percentage) vs time from MSN_{ConA} .

In vitro behaviour of the nanosystems

A pH responsive drug delivery hybrid nanosystem decorated with a tumour target molecule has been developed. The ability of this nanosystem to selectively and efficiently kill tumour cells *in vitro* was studied as well as the synergistic combination of ConA and DOX incorporated into the nanodevice.

As we previously commented, some *in vitro* studies demonstrated that the combined administration of a lectin and DOX produces a strong synergistic effect in apoptosis in certain cancer cells that does not occur when the agents are independently administrated. We cultured the different nanosystems in presence of two types of cells populations: MC3T3-E1 and HOS cells. HOS is a human osteosarcoma cell line and MC3T3-E1 is a preosteoblastic cell line derived from mice calvaria.

Firstly, a study to check whether the pure ConA had cytotoxic effect against cell lines was performed. **Figure 3.17** shows that the cytotoxic effect of ConA in HOS cells is very high and exhibits a linear dependence on the concentration, while in MC3T3-E1 the toxicity is substantially smaller and does not follow any concentration pattern.

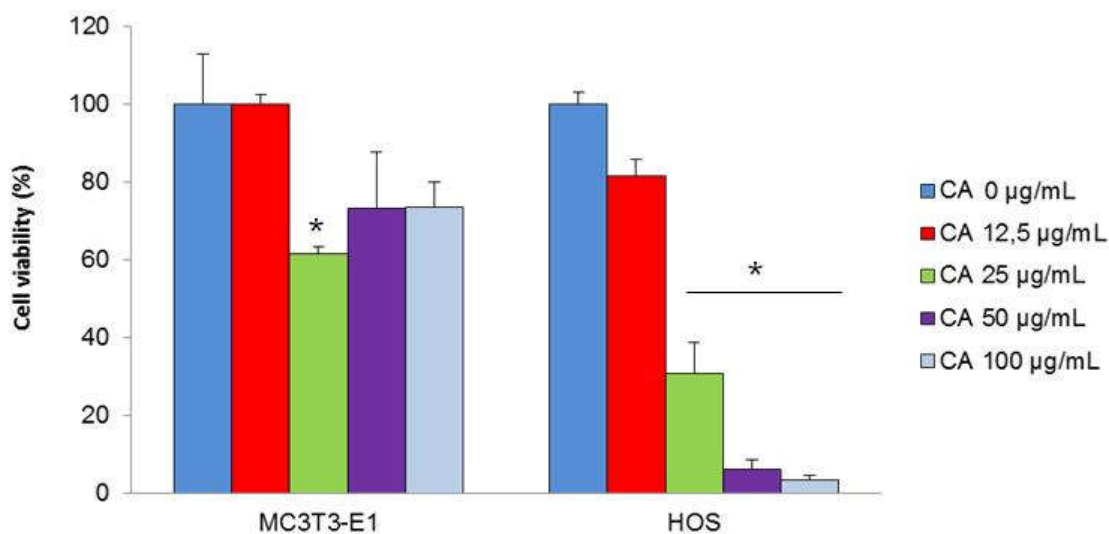


Figure 3.17 Cell viability of HOS and MC3T3-E1 depending of the concentration of ConA added to the culture medium.

Administration of free DOX was also studied showing high toxicity but unspecific, i.e. unable to distinguish between tumor and healthy cells.

Then, the *in vitro* cytotoxicity of the nanosystems containing different DOX/ConA combinations were determined (by a MTS assay) by the exposition of MC3T3-E1 and HOS cells at different times: (24, 48 and 72h) and different nanoparticles concentrations. Cell viability study of the MSN_{PAA} in absence of DOX and ConA in the same range of concentrations and times was studied and results demonstrate that nanoparticles do not present themselves cytotoxicity. To simplify **Figure 3.18** these values have not been

represented. Comparing the toxicity of DOX loaded MSN_{ConA} and MSN_{PAA} , denoted as DPC and DP respectively, it is observed that DPC causes increased cell death than DP, and that this increase is much more significant in HOS cells than in MC3T3-E1, even for short times and very low concentrations (2.5 $\mu\text{g/mL}$).

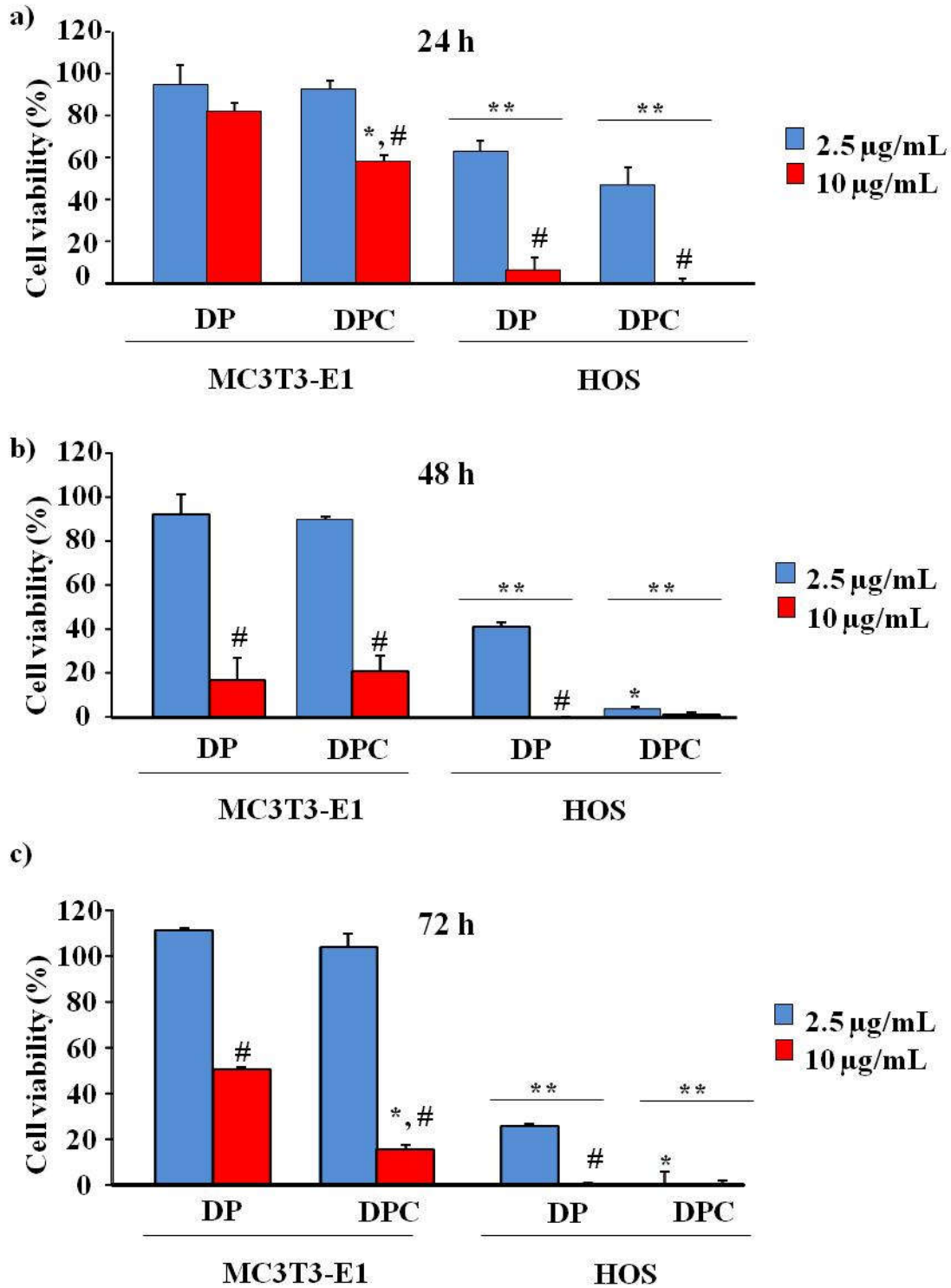


Figure 3.18 Cell viability of HOS and MC3T3-E1 with different concentrations of DP (DOX loaded MSN_{PAA}) and DPC (DOX loaded MSN_{ConA}).

To confirm the dramatic decreased of cell viability in presence of DPC, we studied the cellular uptake and internalization of the nanosystems by flow cytometry in MC3T3-E1 and HOS cells. For this purpose fluorescent MSN_{PAA} (FP) and MSN_{ConA} (FPC) were prepared. After 2 hours of culture, the internalization and fluorescence intensity of FPC significantly increased compared with FP and this effect was always higher in HOS cells than in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. These results are in concordance with the increased death induced by DPC in HOS cells (**Figure 3.19**).

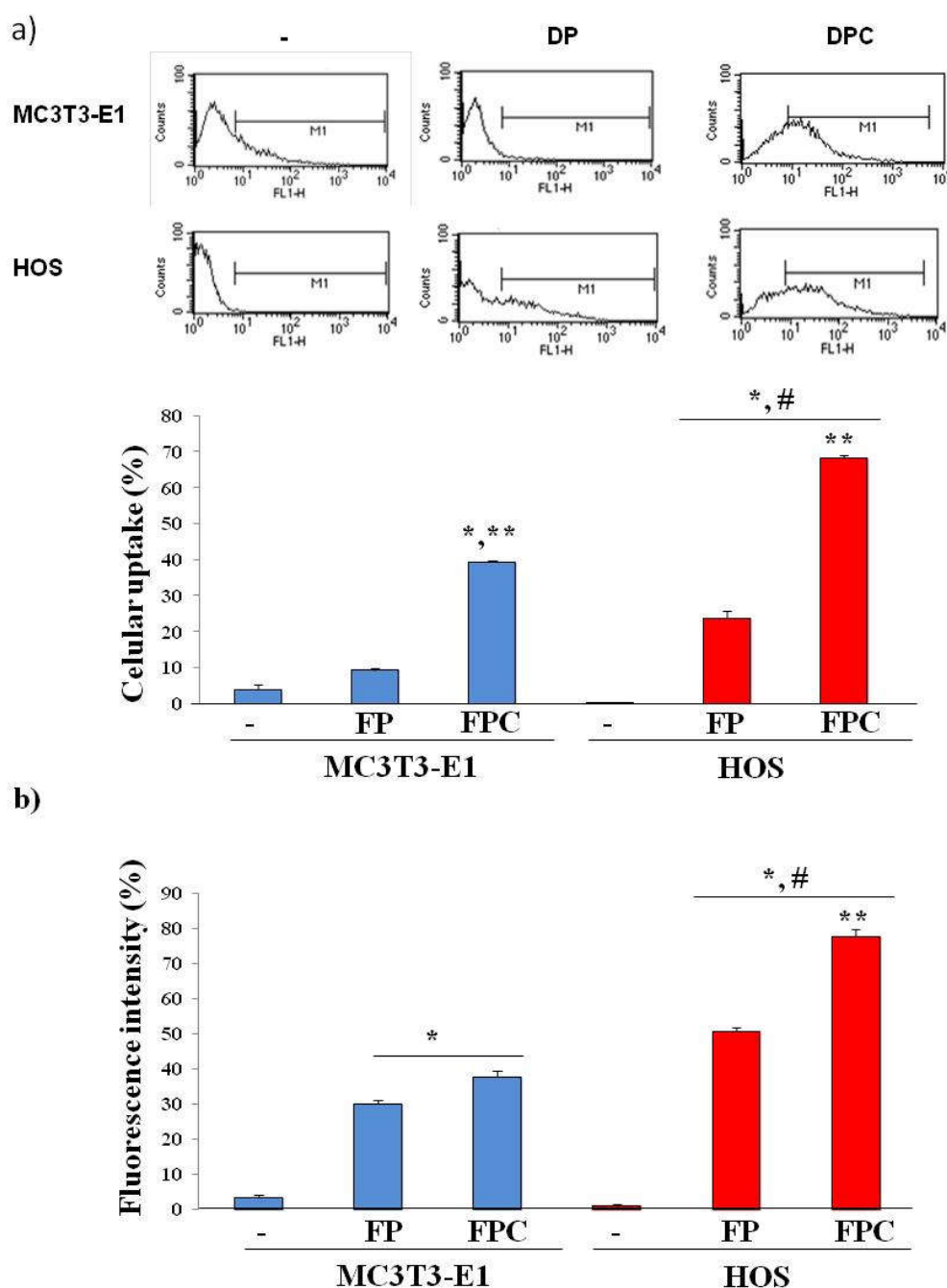


Figure 3.19 a) Internalization and b) fluorescence intensity of FPC and FP in MC3T3-E1 and HOS cells.

As we previously remarked, sialic acids overexpression has been identified in different tumoral cells¹⁴, including osteosarcoma human cells¹⁵. To confirm the possible overexpression of sialic acid in HOS cells compared with MC3T3-E1 cells, and their interaction with ConA, we measured the N-acetylneuraminic acid levels. This acid is the most common member of sialic acid derivatives and is found widely distributed in animal tissues. We found that N-acetylneuraminic acid levels in HOS cells were significantly higher compared with the levels found in MC3T3-E1 cells: 600 ± 1 nmol/ μ g protein in HOS cells vs 100 ± 2 nmol/ μ g protein in MC3T3-E1 cells.

In view of these results we suggest that the presence of ConA in the surface of the nanoparticles allows the binding with sialic acid and improves the selective toxicity of our system, increasing the internalization in HOS cells where the sialic acid levels were increased.

Conclusions

In conclusion, an innovative nanosystem with targeted-antitumor synergistic capability has been developed. MSNs have been employed as nanocarriers and coated with a PAA shell through a pH-cleavable linker to prevent the premature DOX release until internalization and location in the endo/lysosomes ($\text{pH} < 5.5$) take place. ConA was used as targeting agent due to its affinity towards sialic acids, which are overexpressed in the membrane of several tumor cells but not in healthy ones. *In vitro* assays using HOS human osteosarcoma *versus* MC3TT3-E1 mouse osteoblastic cell lines demonstrated that the combined action of DOX and ConA potentiates the antitumor effect compared to the individual administration of each element. This selective antitumor synergistic effect is observed at small nanoparticles concentrations as low as 2.5 μ g/mL. In this system ConA plays a dual role, acting both as targeting ligand and antitumor agent, which simplifies the system and avoids the use of redundant elements. This nanodevice can be envisioned as a new alternative for the treatment of bone cancer. However, the potential and versatility of the system sheds promising expectations in the management of different types of cancer.

“Un experto es una persona que mediante su propia dolorosa experiencia ha descubierto todos los errores que se pueden cometer en un campo muy estrecho.”

“An expert is a person who has found out by his own painful experience all the mistakes that one can make in a very narrow field.”

Niels Bohr

Conclusiones / Conclusions

Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral se han subdividido en dos grandes apartados dependiendo de la aplicación biomédica de los nanomateriales de sílice mesoestructurada:

I. Materiales mesoestructurados tipo SBA-15 para el tratamiento local de la infección bacteriana ósea

1. Se ha diseñado y sintetizado un nuevo material biocerámico tipo SBA-15 capaz de disminuir la adhesión bacteriana relativa desde un 100 % a valores inferiores a 0,1 %, como se deriva de los ensayos *in vitro* realizados con *S. aureus*.
 - a. Es la primera vez que se presenta un material biocerámico mesoporoso con capacidad de inhibición bacteriana al pH fisiológico de 7,4. Este logro ha sido posible gracias a que la superficie del SBA-15 ha sido provista de pares de iones híbridos zwitterión ($-\text{NH}_3^+/\text{SiO}^-$ y $>\text{NH}_2^+/\text{SiO}^-$) utilizando el método de funcionalización por co-condensación. Asimismo se ha demostrado que se consigue una gran capacidad antiadherente debida a la presencia de cantidades muy pequeñas de agente funcionalizante.
 - b. Un valor añadido del sistema es la posibilidad de utilizar los mesoporos del material para albergar antibióticos y poder liberarlos de forma sostenida durante períodos de tiempo prolongados (más de 15 días). Esto permitiría desempeñar un doble papel contra la infección; la naturaleza zwitteriónica inhibiría la adhesión bacteriana en la superficie del implante, que es la primera etapa de la infección; mientras que la liberación de antibióticos contribuiría a erradicar la proliferación de bacterias en los alrededores de la zona del implante.
 - c. Todos los resultados experimentales pueden ser mejor entendidos gracias a las avanzadas técnicas de caracterización que existen actualmente. Así, el uso de STEM-EDS ha permitido la detección de cantidades ínfimas de elementos ligeros, tales como el nitrógeno, tan imprescindible para explicar el comportamiento zwitteriónico del material sintetizado.
2. La profunda caracterización de los materiales mesoporosos por HRTEM es indispensable para comprender su comportamiento como sistemas de administración de fármacos. Esta herramienta resulta de vital importancia para estudiar muestras mesoporosas funcionalizadas que han sido sometidas a tratamientos sintéticos agresivos para obtener ciertos grupos orgánicos. Este hecho se ha demostrado sintetizando un material mesoporoso tipo SBA-15 funcionalizado con grupos etilfosfonato y posteriormente tratándolo con HCl concentrado para obtener entidades etilfosfónico. Aunque la caracterización de rutina mediante XRD y porosimetría de

adsorción de N₂ apunta a estructuras bien ordenadas, los estudios por HRTEM revelan daños mesoestructurales importantes en la muestra tratada con ácido. Esta alteración gobierna los perfiles de liberación de moléculas desde dichas matrices, originando una liberación masiva donde el 100 % de la molécula cargada se libera en tan sólo 10 horas. Este comportamiento difiere completamente del de la muestra sin tratar, donde, a pesar de presentar interacciones matriz-fármaco comparables en las condiciones de liberación, muestra una liberación sostenida durante más de 2 semanas.

II. Nanopartículas de sílice mesoporosa tipo MCM-41 para terapia antitumoral

3. Se ha desarrollado un nuevo nanosistema (MSN-Tf) capaz de transportar especies citotóxicas selectivamente al interior de las células cancerosas y liberarlas en respuesta a un estímulo externo, la irradiación con luz UV. En este nanodispositivo, una corteza proteica anclada a la superficie de las MSNs a través de un ligando fotosensible actúa al mismo tiempo como ligando de vectorización y como agente de bloqueo de los poros.
 - a. El uso de proteínas garantiza la biocompatibilidad del nanodispositivo minimizando los problemas de toxicidad. Este transportador puede ser internalizado selectivamente por las células tumorales gracias a la presencia de la transferrina (Tf) y una vez allí y después de la aplicación de luz UV, se liberan cantidades suficientes de especie citotóxica para iniciar la cascada apoptótica en las células tumorales.
 - b. El dispositivo a muy baja concentración ha demostrado una elevada capacidad citotóxica *in vitro* frente a varias líneas tumorales que sobreexpresan receptores de Tf. La alta capacidad citotóxica, la posibilidad de controlar la liberación del fármaco y la naturaleza versátil de los puentes estreptavidina/biotina que permiten la introducción de otros agentes de “targeting” convierten a este material en un candidato muy interesante para el tratamiento de enfermedades malignas expuestas, accesibles por irradiación de la luz.
4. Se ha desarrollado un nuevo dispositivo (MSN-FA) capaz de liberar el fármaco cargado sólo tras ser internalizado selectivamente por las células tumorales y responder al pH como estímulo interno. Este nanosistema posee un revestimiento de gelatina multifuncional capaz de prevenir la salida del topotecan (TOP) y de aportar puntos de anclaje para agentes de vectorización hacia células cancerosas.
 - a. El TOP es un fármaco antitumoral muy efectivo pero que se hidroliza a pH 7,4. La cubierta de gelatina es capaz de proteger el citotóxico hasta que es liberado en el

entorno ácido endo/lisosomal de las células tumorales. Este hecho podría suponer un avance significativo en la aplicación clínica de este fármaco.

- b. Además, el revestimiento de biopolímero gobierna la cinética liberación del TOP. Un completo trabajo de caracterización ha sido necesario para comprender cómo actúa la gelatina, ya que se barajaban distintas hipótesis, y entender su papel es fundamental para comprender el funcionamiento del nanodispositivo.
 - c. La gelatina, a su vez cumple una tercera función ya que proporciona múltiples puntos de anclaje para la unión de ligandos de “targeting” que promuevan la selectividad hacia las células cancerosas. En este caso se ha empleado ácido fólico (FA) como agente de vectorización para dotar al sistema de selectividad por células que sobreexpresen marcadores de superficie con afinidad hacia dichos ligandos. Además la gelatina permite la unión de cualquier otro tipo de ligando, anticuerpo o molécula de vectorización abriendo ampliamente el abanico de aplicaciones del dispositivo.
 - d. Los ensayos *in vitro* han demostrado que estos nanosistemas se dirigen selectivamente a las células tumorales LNCap frente a las células sanas MC3T3-E1 provocando su muerte, mientras que el TOP libre no afecta a la viabilidad de ninguna de las líneas celulares. Este novedoso nanodispositivo constituye un avance significativo hacia el desarrollo de una biblioteca de nanomedicamentos para terapia antitumoral.
5. Se ha diseñado también un segundo dispositivo sensible al pH (MSN_{ConA}). Este nanotransportador está recubierto de un polímero mediante una molécula escindible a pH ácido y muestra un gran poder citotóxico debido al efecto sinérgico de la combinación DOX-ConA incorporada en el mismo nanosistema.
- a. Las nanopartículas se “decoran” con ATU y se recubren con un polímero de ácido poliacrílico (PAA). ATU es un ligando que se rompe a pH por debajo de 5,4 permitiendo que se desprenda el polímero que actúa a modo de tapa bloqueando los poros y se produzca la consiguiente liberación del fármaco.
 - b. La administración conjunta de DOX y ConA potencia de forma muy significativa la capacidad citotóxica de cada uno de los elementos por separado, disminuyendo en más de un 20 % la viabilidad de las células tumorales utilizando concentraciones muy bajas de nanopartículas.
 - c. La ConA adquiere una doble función actuando a la vez como agente antitumoral y como ligando de “targeting” a las células tumorales HOS (que sobreexpresan ácido siálico) frente a las células sanas MC3T3-E1, simplificando así el sistema y evitando elementos redundantes.

- d. Este nanodispositivo ha sido diseñado como una nueva alternativa para el tratamiento de tumores óseos. Sin embargo, su potencial y su versatilidad arrojan expectativas prometedoras en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

The conclusions of this PhD Thesis have been subdivided into two principal sections depending on the biomedical application of the mesostructured silica nanomaterials:

I. SBA-15 type mesostructured materials for the local treatment of bacterial bone infection

1. A new SBA-15 type bioceramic capable of reducing bacterial adhesion from 100 % to values lower than 0.1 % has been designed and synthesized, as derived from the *in vitro* assays performed with *S. aureus*.
 - a. A mesoporous bioceramic with bacterial inhibition capability at physiological pH of 7.4 is presented for the first time. This achievement has been possible because the surface of SBA-15 has been provided of zwitterionic pairs ($-\text{NH}_3^+/\text{SiO}^-$ and $>\text{NH}_2^+/\text{SiO}^-$) by the co-condensation functionalization method. Besides it has also been observed that the presence of very small amounts of functionalizing agent provokes a great antifouling effect.
 - b. An added value of the system is the possibility of using the mesopores to confine antibiotics and release them steadily over long periods of time (over 15 days). This would play a dual role against infection; the zwitterionic nature would inhibit bacterial adhesion to the implant surface, which is the first stage of infection; while the antibiotic release would help to eradicate bacterial present in the implant surroundings.
 - c. Experimental results can be better understood due to advanced characterization techniques available nowadays. Thus, the use of STEM-EDS has allowed the detection of minimal amounts of light elements, such as nitrogen, necessary to explain the behavior of the zwitterionic material.
2. The deep characterization of mesoporous materials by HRTEM is essential to understand their performance as drug delivery systems. This tool is vital to study functionalized mesoporous samples that have been submitted to aggressive synthetic treatments to attain certain organic moieties. This has been demonstrated by synthesizing a SBA-15 type mesoporous material functionalized with ethylphosphonate groups and then treating it with concentrated HCl to obtain ethylphosphonic entities. Although routine characterization by XRD and N_2 adsorption porosimetry points to well-ordered structures, HRTEM studies reveal important mesostructural damages in the sample treated with acid. This alteration governs the release profiles of molecules from the matrices, resulting in a burst release where 100 % of the loaded molecule is released after 10 hours of assay. This behavior completely

differs from that of the untreated sample, which, despite of displaying comparable matrix-drug interactions under the release conditions, shows a sustained release for more than 2 weeks.

II. MCM-41 type mesoporous silica nanoparticles for antitumor therapy

3. A new nanosystem (MSN-Tf) able to selectively transport cytotoxic species to cancer cells and release them in response to an external stimulus, the irradiation with UV light, has been developed. In this nanodevice, a protein shell anchored to the MSNs surface through a photolinker acts both as targeting and capping agent.
 - a. The use of proteins ensures the biocompatibility of the nanodevice minimizing toxicity. This nanocarrier can be selectively internalized by tumor cells due to the presence of transferrin (Tf), and once there and after UV light application, sufficient amounts of cytotoxic species are released to initiate the apoptotic cascade in tumor cells.
 - b. Very low concentrations of the nanosystem have shown a high cytotoxic capacity *in vitro* against several tumor lines overexpressing Tf receptor. The high cytotoxic capacity, the ability to control drug release and the versatility of the streptavidin/biotin interactions that allow the introduction of other targeting agents, make this nanodevice a very interesting candidate for the treatment of exposed malignancies accessible to light irradiation.
4. A new device (MSN-FA) able to release the drug loaded into the pores only after being selectively internalized by tumor cells and responde to the pH as internal stimulus has been developed. This nanosystem has a multifunctional gelatin coating able to prevent topotecan (TOP) release and to provide anchor points for targeting agents to cancer cells.
 - a. TOP is a very effective antitumor drug which hydrolyzes at pH 7.4. The gelatin shell is capable of protecting the cytotoxic until it is released in the acid endo/lysosomal environment of the tumor cells. This could be a breakthrough in the clinical application of this drug.
 - b. Furthermore, the biopolymer coating governs the TOP kinetic release. Different hypotheses about the gelatin behavior were postulated, then to elucidate the gelatin role, which is critical to understand how the nanodevice operates, a complete characterization has been necessary.

- c. Gelatin complies a third function providing multiple anchor points for "targeting" ligands that promote the selectivity towards cancer cells. In this case folic acid (FA) has been used as targeting to provide selectivity towards cells overexpressing surface markers with affinity for such ligands. Furthermore gelatin allows binding any other ligand, antibody or targeting molecules, which opens a wide range of possibilities for the application of this nanodevice.
 - d. *In vitro* tests have shown that this nanosystem selectively target tumor cells LNCaP against healthy ones MC3T3-E1 causing their death, while free TOP does not affect the viability of any of the cell lines. This novel nanosystem constitutes a significant step towards the development of a nanomedicine library for antitumor therapy.
5. A second pH sensitive device (MSN_{ConA}) has been also designed. This nanocarrier is covered by a polymer through an acidic cleavable molecule and presents a strong toxicity due to the synergistic effect of the DOX-ConA combination in the same nanosystem.
- a. Nanoparticles have been decorated with ATU and coated with a polyacrylic acid polymer (PAA). ATU is a ligand that breaks at pH below 5.4 allowing the leak of the blocking polymer and the subsequent drug release.
 - b. Co-administration of DOX and ConA significantly potentiates the cytotoxic capacity of each of the elements individually, decreasing tumor cell viability by more than 20 % by using very low nanoparticles concentrations.
 - c. ConA acquires a dual function acting both as antitumor agent and targeting ligand to the tumor cells (HOS, that overexpresses sialic acid) versus healthy cells (MC3T3-E1), thus simplifying the system and avoiding redundant elements.
 - d. This nanodevice can be envisioned as a new alternative for the treatment of bone cancer. However, the potential and versatility of the system sheds promising expectations in the management of different types of cancer.

**“Los hombres sólo son tan buenos como sus
desarrollos técnicos les permiten ser.”**

George Orwell

Técnicas de caracterización

A1

Técnica de caracterización	Información obtenida
Difracción de rayos X (XRD)	Periodicidad de la mesoestructura
Porosimetría de adsorción de N ₂	Determinación de las propiedades texturales
Espectrometría de masas MALDI-TOF	Determinación de estructuras orgánicas
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Morfología de las partículas
Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)	Visualización de la porosidad y estudio de los recubrimientos de los NSM
Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)	Identificación y cuantificación de la composición elemental de pequeñas áreas de muestra
Análisis químico elemental	Cuantificación del contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de una muestra
Análisis termogravimétrico y termodiferencial (TGA /DTA)	Cuantificación de materia orgánica e identificación de procesos endotérmicos y exotérmicos
Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF)	Determinación de la composición elemental de una muestra para elementos de elevada masa atómica
Potencial zeta (ζ)	Densidad de carga superficial, incorporación de especies orgánicas en la matriz de sílice y estabilidad coloidal de la muestra
Dispersión de luz dinámica (DLS)	Distribución de tamaños de las nanopartículas
Espectroscopías UV/visible y de fluorescencia	Cuantificación de especies en disolución
Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	Caracterización de los grupos funcionales de las especies incorporadas en la matriz de sílice
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR):	
¹ H y ¹³ C en líquido	Deducción de la estructura del esqueleto carbonado de las especies orgánicas antes de anclarlas a los NSM
¹³ C, ²⁹ Si y ³¹ P en sólido	Comprobación del anclaje de las especies orgánicas a la superficie de los NSM y estudio del entorno del C, Si y P de los materiales resultantes

Tabla AI.1 Técnicas de caracterización utilizadas para la determinación de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los materiales desarrollados en esta Tesis Doctoral.

AI.1 Difracción de rayos X (XRD)

La XRD es una técnica usada para estudiar estructuras periódicamente ordenadas a escala atómica. Las longitudes de onda de los rayos X son del mismo orden de magnitud que la distancia entre la red de planos atómicos en materiales cristalinos. Cuando los rayos X penetran en el material son dispersados por las nubes de electrones que hay alrededor de los átomos (**Figura AI.1A**). La periodicidad de los planos de la red da lugar a interferencias constructivas de los rayos X en ciertas direcciones originando un patrón de difracción. La intensidad de los rayos X dispersados se representa frente al ángulo 2θ . A partir de los picos trazados se puede calcular la distancia reticular usando la ley de Bragg:²⁸²

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta$$

Donde n es el orden de difracción, λ es la longitud de onda, d_{hkl} la distancia entre planos de la red y θ el ángulo de la radiación incidente.

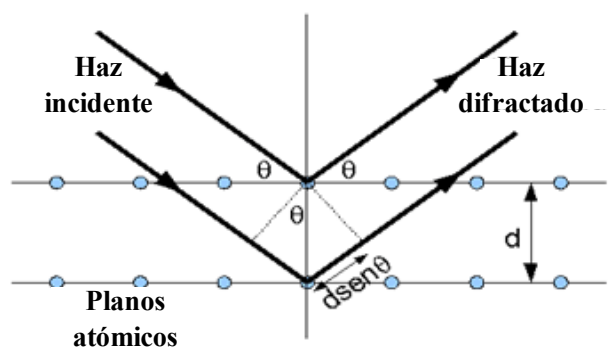


Figura AI.1 Ilustración esquemática de la difracción según la ley de Bragg.

En los materiales cristalinos, los planos de la red se nombran usando los índices de Miller. Estos índices se designan convencionalmente h , k , y l , y la separación de planos se conoce con el término de espaciado- d , d_{hkl} . Por tanto la posición que ocupa una señal en el diagrama de XRD está determinada por la distancia d_{hkl} . La relación entre d_{hkl} y los parámetros de red puede determinarse geoméricamente y depende del sistema cristalino (**Figura AI.2**).

Sistema cristalino	Expresión para d_{hkl}
Cúbico	$1/d^2 = (h^2 + k^2 + l^2)/a^2$
Tetragonal	$1/d^2 = (h^2 + k^2)/a^2 + l^2/c^2$
Ortorrómbico	$1/d^2 = h^2/a^2 + k^2/b^2 + l^2/c^2$
Hexagonal	$1/d^2 = 4(h^2 + hk + k^2)/3a^2 + l^2/c^2$
Monoclínico	$1/d^2 = (1/\text{sen}^2\beta)(h^2/a^2 + k^2\text{sen}^2\beta/b^2 + l^2/c^2 - 2h\text{lc}\text{os}\beta/ac)$
Triclínico	Expresión compleja

Figura AI.2 Relación entre el sistema cristalino y la expresión para d_{hkl} .

Los NSM tienen paredes de sílice amorfa, es decir, no son cristalinos a escala atómica y por lo tanto los diagramas de XRD de estos materiales no muestran reflexiones a altos ángulos ($5,0^\circ$ a $80,0^\circ 2\theta$). Sin embargo esta técnica si es útil a bajos ángulos ($0,2^\circ$ a $10^\circ 2\theta$) para la caracterización de la estructura mesoporosa ordenada de los NSM, donde nos permite distinguir la topología de los poros y la distancia poro-poro promedio. Cada estructura mesoporosa presenta un ordenamiento poroso distintivo, dando lugar a diferentes perfiles de XRD. Tanto el SBA-15 como el MCM-41 presentan una estructura mesoporosa en forma de panal de abeja que debido al ordenamiento bidimensional hexagonal de sus canales (simetría $p6mm$), proporciona únicamente reflexiones $hk0$. Estos NSM presentan típicamente entre 3 y 5 reflexiones que pueden ser indexadas asumiendo una celda unidad hexagonal como: 10 , 11 , 20 , 21 y 30 . El número de picos que aparecen en un diagrama así como la anchura de los mismos son indicadores de la cristalinidad de una muestra. Si hay un número mayor de picos supone que variando el valor de θ sigue existiendo periodicidad entre planos. Por otra parte cuanto más estrecho es un pico significa que para un mismo valor de θ hay más planos paralelos en esa dirección. Por ejemplo, una muestra cristalina infinita no daría un pico sino una Delta de Dirac. En la **Figura AI.3** se observan bien definidos sólo cuatro y tres de estos posibles picos para el MCM-41 y el SBA-15, respectivamente.

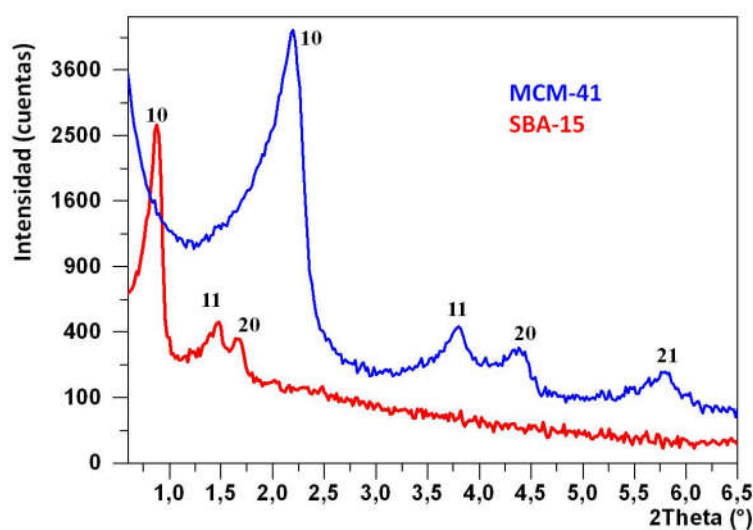


Figura AI.3. Diagrama de XRD del SBA-15 y del MCM-41.

Además esta técnica permite evaluar, el grado de ordenamiento estructural de estos materiales empaquetados en forma hexagonal, mediante la medida de la relación de intensidades de las señales de difracción 10 y 11 , siendo mayor el orden de la estructura analizada cuanto mayor sea la relación I_{11}/I_{10} .

Por otra parte, con estos análisis y haciendo uso de la ley de Bragg es posible estimar la distancia interplanar d_{10} , calculándose a partir de ella el valor de la celda unidad de la estructura porosa a_o por medio de la ecuación (i). Como se observa en la **Figura AI.4**, este valor representa la distancia entre los centros de dos poros contiguos en

esa dirección. Y si se combina a_0 con el parámetro D_p (diámetro de poro) obtenido por los análisis de adsorción de nitrógeno, se puede determinar el espesor de la pared (e , o “ t_{wall} ”) de la muestra (ecuación (ii)).

$$a_0 = \frac{2}{\sqrt{3}} d_{100} \quad \text{(i)} \quad e = a_0 - D_p \quad \text{(ii)}$$

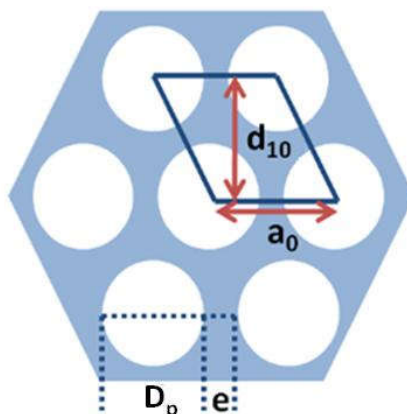


Figura AI.4 Ilustración esquemática de la estructura hexagonal de los materiales MCM-41 y SBA-15 con una separación d_{10} y un parámetro de celda unidad a_0 .

Para que se cumpla la ley de Bragg se debe cumplir que $n\lambda = cte$. Por tanto en un perfil de XRD cuanto más a la izquierda aparece una señal, es decir a menor ángulo, mayor es el valor de d_{hkl} y por tanto mayor es la distancia entre los planos porosos. En base a esto, en la **Figura AI.3** se comprueba como efectivamente la señal de la reflexión 10 para el SBA-15 de partida se encuentra a menor ángulo que la respectiva señal para el MCM-41 puro, indicando el mayor D_p del primer material.

Además de la información estructural, en ocasiones esta técnica también nos permite seguir los procesos de funcionalización de una forma indirecta. Al “decorar” los materiales se produce un bloqueo parcial de los poros que en algunos casos dificulta la visualización del orden mesoporoso mediante XRD pese a que la estructura hexagonal permanece intacta. Este estudio del bloqueo parcial o total de los poros como consecuencia de sucesivas funcionalizaciones ha sido de gran utilidad en los artículos de investigación sobre MSNs realizados en esta Tesis Doctoral.

Los perfiles de XRD para la caracterización estructural de los materiales se han obtenido utilizando un difractómetro Philips X'Pert Plus (Eindhoven, The Netherlands) con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda = 1,5406$ Å, 40 kV, 20 mA), en el rango de $0,6^\circ$ a $10,0^\circ$ (2θ) con un paso de $0,02^\circ$ (2θ) y un tiempo de análisis de 5 s.

AI.2 Porosimetría de adsorción de N₂

La adsorción es un fenómeno superficial por el que un líquido o un gas (adsorbato) se acumula en la superficie de un sólido (adsorbente). Dependiendo de la naturaleza de la interacción adsorbato-adsorbente, ésta puede ser clasificada como fisisorción (las especies adsorbidas mantienen su estructura y están unidas por fuerzas de Van der Waals) o quimisorción (las especies adsorbidas están unidas a la superficie formando un enlace químico). Las fuerzas de cohesión de los átomos del interior de un sólido se encuentran compensadas; sin embargo, en la superficie existe una resultante de las fuerzas no nula y dirigida hacia el interior que se denomina fuerza de cohesión superficial y que es responsable de la fisisorción en los sólidos.²⁸³

La fisisorción de gases es una técnica muy utilizada en la caracterización de materiales de sílice mesoporosa ya que informa acerca de las características texturales de la superficie externa e interna de los materiales. Usualmente se definen los siguientes parámetros:²⁸⁴

- a) Superficie específica (m²/g): extensión geométrica de la superficie de las paredes de los poros por gramo de sólido adsorbente.
- b) Volumen acumulado de poros, V_p (cm³/ g): volumen total de poros por gramo de adsorbente.
- c) Diámetro medio de poro, D_p (nm).
- d) Distribución del tamaño de poros: función de distribución $dV_p/dD_p = f(D_p)$.

Los valores para estos parámetros se obtienen, principalmente, de las medidas de adsorción y desorción de gases. Existe una gran variedad de adsorbatos que se utilizan en las experiencias de adsorción. Entre los más utilizados destacan el N₂, O₂, Ar, Kr, CO₂, algunos hidrocarburos, tales como el benceno y algunos alcanos y alcoholes de cadena corta. Sin embargo, la adsorción de N₂ a -196 °C es la que se utiliza más ampliamente debido a que cubre todo el rango de porosidad y a que el N₂ interacciona débilmente con la mayoría de sólidos. El resultado es una isoterma de adsorción-desorción que muestra la cantidad de gas adsorbido (por gramo de adsorbente) como una función de la presión relativa P/P_0 en el intervalo $0 < P/P_0 < 1$ (P = presión de vapor de equilibrio del adsorbato, P_0 = presión de vapor del adsorbato líquido puro), a una temperatura dada. La IUPAC (International Union of Pure and Applied Physics, en español Unión Internacional de Física Pura y Aplicada) reconoce seis tipos de isotermas de adsorción (**Figura AI.5A**).²⁸⁵

La isoterma tipo I se caracteriza porque la adsorción se produce a presiones relativas bajas y es la que muestran los sólidos microporosos. La isoterma tipo II es característica de sólidos macroporosos o no porosos con un mecanismo de llenado en multicapas. Se asume que en el punto B se ha completado la formación de la monocapa inicial. La isoterma tipo III ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja. La isoterma tipo IV es característica de sólidos mesoporosos siendo su rasgo distintivo la

presencia de un ciclo de histéresis asociado con el mecanismo de llenado y vaciado de los poros. La isoterma tipo V, al igual que la isoterma tipo III, es característica de interacciones adsorbato-adsorbente débiles, pero se diferencia de la anterior en que también presenta ciclo de histéresis. La isoterma tipo VI es poco frecuente, se la asocia con la adsorción capa por capa sobre superficies que son altamente homogéneas.

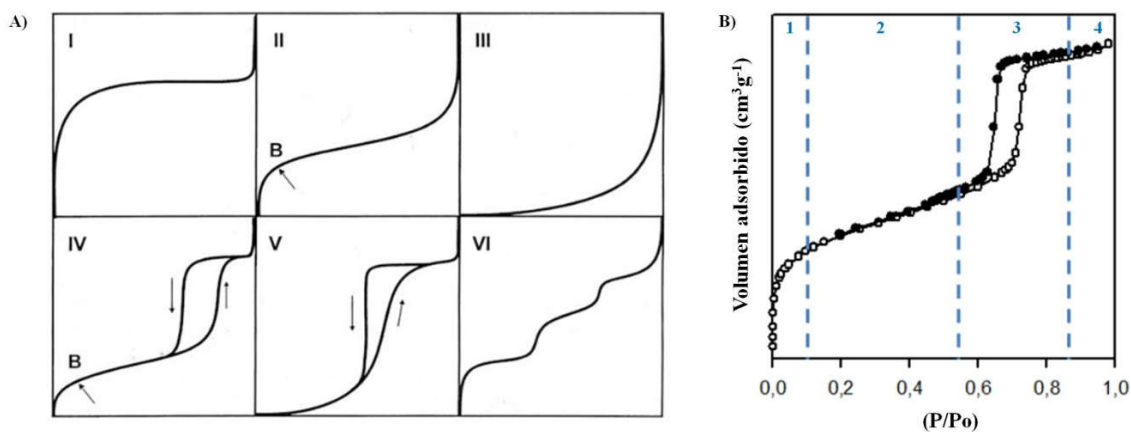


Figura A1.5 A) Tipos de isothermas de adsorción (fisisorción) según la IUPAC. B) Zonas características de la isoterma de adsorción de tipo IV correspondiente a un material SBA-15.

De entre todos los tipos de isothermas tanto el SBA-15 como el MCM-41 se encuentran dentro del tipo IV y por ello estudiaremos esta isoterma con más detenimiento. En la **Figura A1.5B** se distinguen claramente cuatro zonas:

1. Es la zona de bajas presiones relativas y en ella se produce el llenado de la microporosidad de la muestra. En esta zona tiene lugar la formación de la monocapa.
2. En esta zona la relación entre espesor y volumen adsorbido es lineal y se debe a la formación de multicapas de gas adsorbido sobre la monocapa inicial.
3. Esta zona experimenta un gran incremento del volumen adsorbido para un mínimo ensanchamiento del espesor de la multicapa, como consecuencia del fenómeno de condensación capilar dentro de los mesoporos. El valor de la presión relativa al que se produce el salto va a determinar el tamaño de poro medio. Asimismo, cuanto más nítido sea el escalón (región más estrecha y salto de mayor pendiente) más estrecha será la distribución de diámetros de poro.
4. Es la última zona y presenta una región lineal en cuanto a la relación espesor de multicapa-volumen adsorbido. Dicha región se atribuye a la adsorción en multicapa sobre la superficie externa del material, dando finalmente lugar a la condensación por llenado del espacio entre partículas.

En los mesoporos, además, y debido a la condensación capilar, el proceso de desorción se produce de forma diferente al de adsorción. Normalmente, la desorción se produce a presiones más bajas, dando lugar a una histéresis. Estos ciclos de histéresis aportan información sobre la forma y homogeneidad de los poros de la muestra y según la IUPAC se clasifican en cuatro tipos (**Figura A1.6**).²⁸⁵

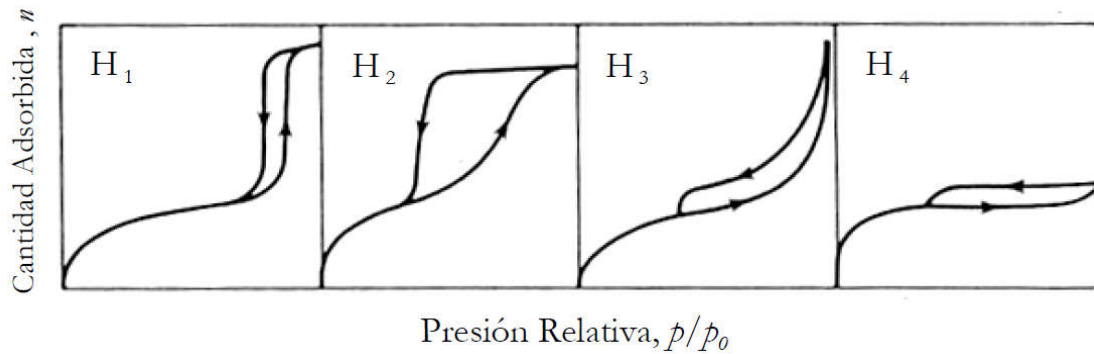


Figura AI.6 Tipos de ciclos de histéresis según la IUPAC. Adaptada de la referencia 285.

El H1 presenta un ciclo angosto, con sus ramas de adsorción y desorción paralelas entre sí. Es característica de capilares de forma tubular abiertos en ambos extremos (grupo al que pertenecen los materiales empleados en esta Tesis).²⁸⁶ En un mesoporo abierto, durante el proceso de adsorción debido a su geometría, la condensación tiende a ser nucleada por el film adsorbido sobre las paredes del poro y la forma del menisco será cilíndrica, es decir, el gas sufre una condensación retardada debido a que se encuentra en un estado metaestable asociado a la nucleación. En cambio en el proceso de desorción la interfaz líquido-vapor está ya presente, y la evaporación se produce sin nucleación, desde los extremos del cilindro, a través de dos meniscos hemisféricos en retroceso, por lo que el interior del poro se evaporará a una presión distinta (menor) a la presión de condensación y en consecuencia se formará el ciclo de histéresis (**Figura AI.7**).²⁸⁷

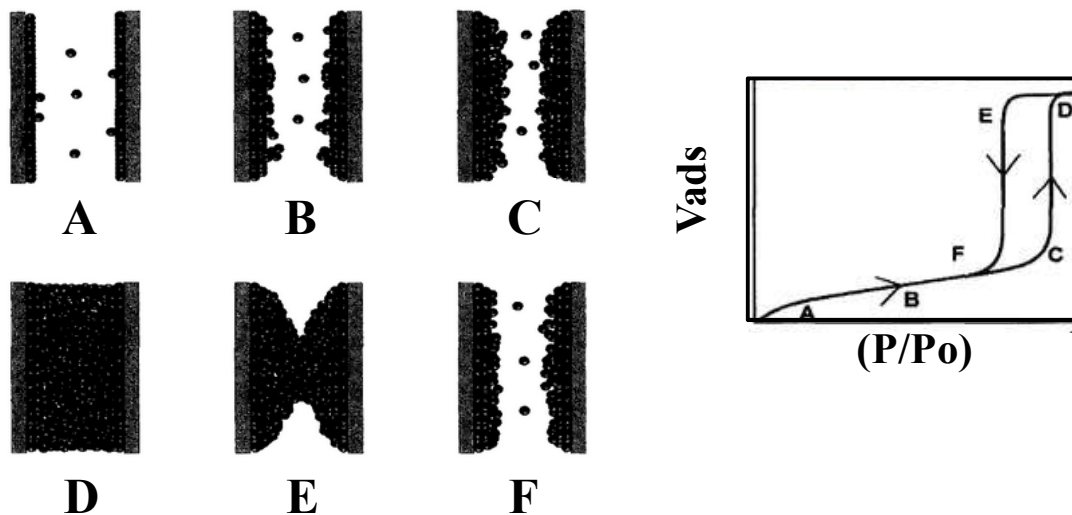


Figura AI.7 Diferentes etapas en el llenado-vaciado de un poro cilíndrico abierto en sus extremos. (A) Se ha completado la monocapa. (B) Comienza el llenado multicapa. Tras alcanzar un film de grosor crítico (C) se produce la condensación capilar en el centro del poro (transición entre las configuraciones C y D). (D) La presencia de una región plana de la isoterma es reflejo de un completo llenado de los poros. (E) La evaporación de los poros tiene lugar mediante retroceso de los meniscos a una presión inferior a la de condensación. (F) La presión a la que se cierra el ciclo de histéresis corresponde otra vez a una situación de adsorción multicapa que está en equilibrio con el vapor en el centro del poro y con la fase gaseosa del exterior. Adaptada de la referencia 288.

En contraste, la tipo H2 se caracteriza por un ciclo de histéresis ancho, lo que se traduce en un *plateau* pronunciado. Tal comportamiento es atribuido a los efectos de conectividad porosa, los cuales se consideran el resultado de la presencia de poros con bocas estrechas. La histéresis H3 no se estabiliza a presiones altas y se asocia a materiales formando agregados de partículas planas, con sus poros en forma de platos. La H4 se caracteriza por mostrar las ramas de adsorción-desorción paralelas y casi horizontales. Se asocia a poros estrechos en forma de rendija, con presencia de microporosidad.

Se han desarrollado numerosos métodos para el tratamiento de los datos derivados de las isothermas de adsorción de N₂, con el objetivo de estimar algunas de las propiedades relacionadas con la porosidad de los sólidos, tales como: la superficie específica, el volumen de poro, la distribución de diámetros de poro, etc.²⁸⁹ Entre ellos, el método (Brunauer-Emmett-Teller) BET²⁹⁰ para la obtención de la superficie específica y el método (Barret-Joyner-Halenda) BJH²⁹¹ para el volumen y distribución de tamaño de poros son los más ampliamente utilizados.

Las propiedades texturales de los materiales se han caracterizado mediante análisis de adsorción/desorción de N₂ a -196°C en un porosímetro Micromeritics ASAP 2020 (Micromeritics Co., Norcross, USA). Antes de cada medida, entre 100-150 mg de cada muestra en forma de polvo fueron desgasificadas durante 24 h a 60 °C con un vacío inferior a 10⁻⁸ bar. Las muestras funcionalizadas o cargadas con biomoléculas fueron desgasificadas durante 24 h a 37 °C para evitar la degradación de la materia orgánica por efecto de la temperatura. La superficie específica (S_{BET}) se ha determinado a partir de la ecuación BET en el rango de presiones relativas P/P_0 0,05 a 0,35. La distribución de tamaño de poro (*pore size distribution, PSD*) se ha calculado a partir del análisis de la rama de adsorción de las isothermas empleando el método BJH estándar. La posición del máximo de la distribución se ha tomado como el diámetro de poro promedio (D_p). El volumen total de poro (V_T) se ha calculado empleando el método de un solo punto a $P/P_0 = 0,99$. El volumen de microporo ($V_{\mu p}$) (poro con diámetros < 2 nm) se ha calculado empleando el método t (t -plot).

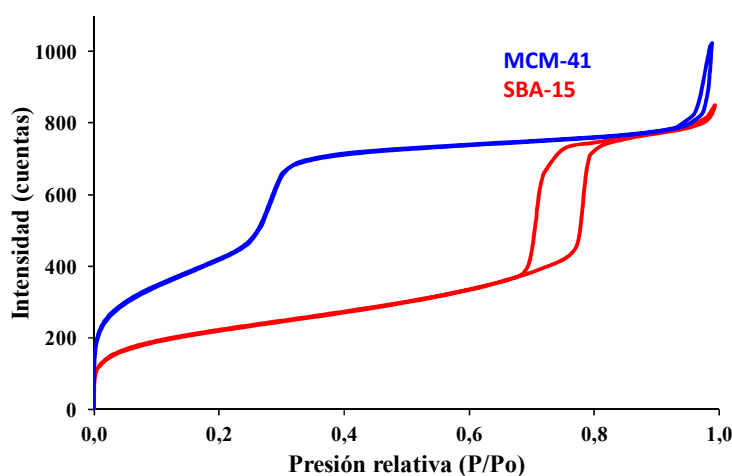


Figura AI.8 Isothermas de adsorción-desorción de materiales tipo MCM-41 y SBA-15.

En la **Figura AI.8** se presentan las isotermas de adsorción/desorción de N₂ de los materiales de sílice pura tanto del MCM-41 como del SBA-15. En la isoterma del SBA-15 el ciclo de histéresis tipo H1 característico de estos materiales está claramente definido, sin embargo no es posible apreciarlo en el caso de la muestra tipo MCM-41.

La presencia del ciclo de histéresis depende del adsorbato, del tamaño de poro, y de la temperatura a la que se realiza la medida.²⁹² Por ello para el análisis de ciclos de histéresis de mesoporosos de gran diámetro de poro, tipo SBA-15, basta con emplear N₂, pero cuando el ensayo se realiza sobre materiales de menor diámetro de poro, tipo MCM-41, es necesario emplear otros gases como Ar o CO₂ (gases con menor presión de saturación y mayor sensibilidad en la medida), pues el análisis con N₂ no da lugar a ciclo de histéresis por ruptura del menisco. En esta figura también podemos observar como la condensación del capilar se produce a valores inferiores para el MCM-41 debido a su menor diámetro de poro.

Cómo se ha visto la adsorción de N₂ aporta numerosa y valiosa información acerca de los materiales de sílice pura (V_p , D_p , V_{up} , S_{BET} , etc.) pero también permite conocer información relevante de los materiales ya tratados. Por norma general el anclaje de un grupo funcional conlleva la disminución del S_{BET} del material y la reducción del D_p por bloqueo parcial de los mismos. El estudio comparativo de las áreas superficiales, unido a los datos obtenidos por otras técnicas permite comprobar si la funcionalización se ha producido con éxito. Además cuando un material ha sido cargado correctamente, tanto el volumen de poro como el área superficial disponibles disminuyen.

AI.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por sí sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría. MALDI-TOF es una técnica de ionización suave. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*. MALDI-TOF permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como las proteínas, los péptidos, los azúcares y los lípidos) y moléculas orgánicas grandes (como los polímeros, los dendrímeros y otras macromoléculas) sin rotura durante el proceso como ocurre por métodos más convencionales. La macromolécula es primero implantada en una matriz sólida que a menudo consiste de un material orgánico y cuya composición dependerá de la muestra a analizar. Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la

desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa. Una vez obtenidos estos iones la determinación de la masa se realiza en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo de vuelo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector (**Figura AI.9**).²⁹³

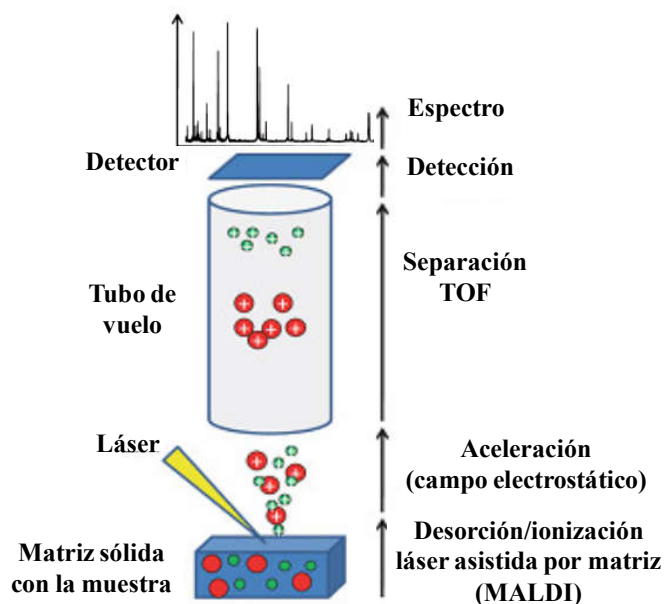


Figura AI.9 Representación esquemática de un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF. Adaptada de <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/maldi-tof-y-hemocultivos/>.

Las medidas han sido desarrolladas en un Voyager DE-STR Biospectrometry MALDI-TOF, y los resultados obtenidos han permitido corroborar determinadas estructuras orgánicas previamente a ser ancladas a la superficie de las MSNs.

AI.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En algunas ocasiones los microscopios ópticos no tienen suficiente resolución para representar los detalles que se quieren observar, como por ejemplo el estudio de la morfología y estructura mesoporosa de nuestros materiales de sílice. La distancia más pequeña entre dos objetos que puede resolverse viene descrita por el criterio de Rayleigh, donde d es la resolución, λ la longitud de onda, n el índice de refracción del medio y θ el ángulo de la luz recogida.²⁸⁹

$$d = 0,62 \frac{\lambda}{n \sin \theta}$$

El los microscopios electrónicos, el uso de un voltaje de aceleración de 200 keV dota a los electrones de una longitud de onda de ~ 1 pm permitiendo una resolución mucho más alta en comparación con los microscopios ópticos, donde la longitud de onda

es de ~ 100 nm. Tanto el microscopio electrónico de transmisión como el de barrido se pueden utilizar para análisis estructural y elemental pero el TEM logra una mayor resolución.

El microscopio de SEM tiene una resolución de ~ 2 nm y su funcionamiento se basa en una sonda de electrones que realiza un barrido sobre la superficie del material. Estos electrones interactúan con el material de tal forma que los electrones secundarios son emitidos desde la superficie de la muestra y grabados en una imagen. Las diferencias de altura de la muestra dan contraste en la imagen. Se utiliza para estudiar la morfología y la topografía de los materiales.

La SEM se ha realizado en un microscopio electrónico JEOL JSM-6335F (Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 10 kV. Este microscopio está instalado en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica, del CAI de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). El portamuestras es un goniómetro que permite desplazamientos en todas las direcciones. Las muestras, bien en forma de polvo o fragmentos de piezas, se pegan a un portamuestras de cobre mediante una cinta de grafito, metalizándose el conjunto con una capa muy fina de oro mediante la técnica de *sputtering* a vacío. El espesor de esta capa, que permite la observación de muestras no conductoras, asegura suficiente conductividad de las muestras evitando que su superficie se cargue con electrones (**Figura A1.10**).

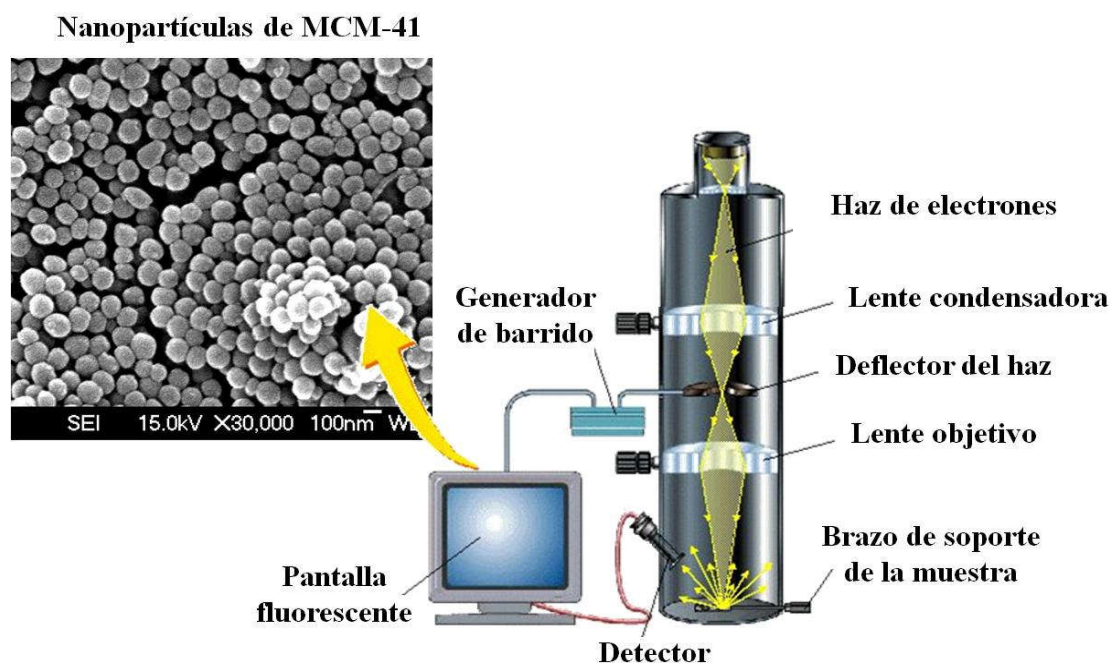


Figura A1.10 Representación esquemática de un microscopio electrónico de barrido y ejemplo de una micrografía de MCM-41 tomada con el mismo.

En este trabajo, la SEM se ha utilizado para estudiar la morfología de todos los NSM sintetizados.

AI.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En un microscopio electrónico de transmisión un haz de electrones se transmite a través de una delgada muestra y mientras que parte de los electrones son dispersados por la misma. Los electrones transmitidos se enfocan en una pantalla fluorescente o en una cámara CCD (charge-coupled device) mediante el uso de bobinas electromagnéticas para formar la imagen (**Figura AI.11**).²⁸⁹

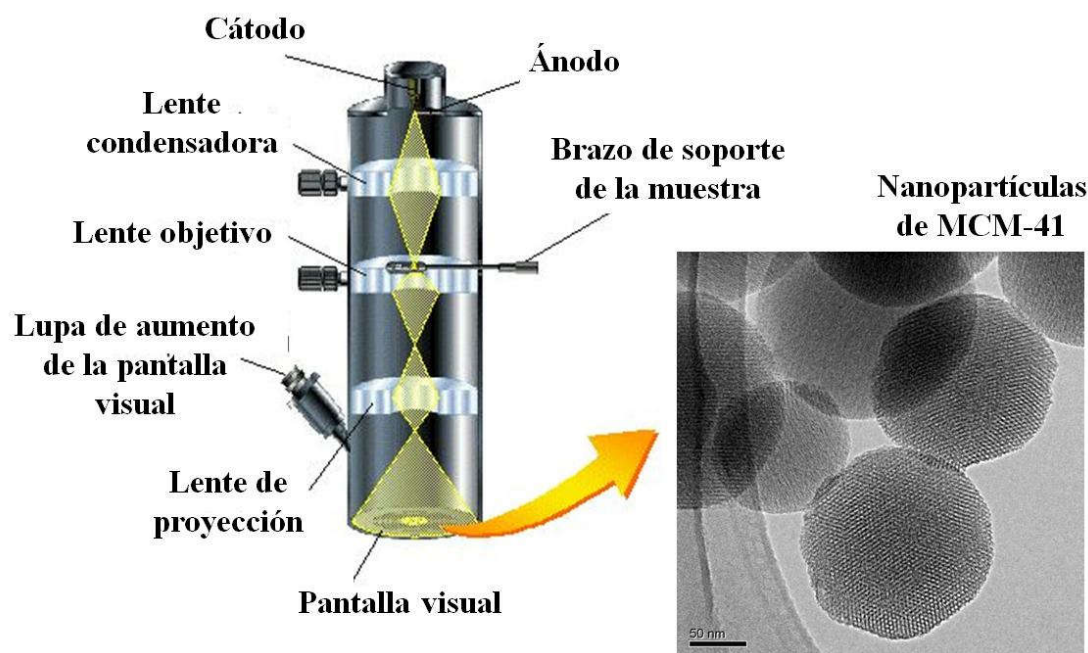


Figura AI.11 Representación esquemática de un microscopio electrónico de transmisión y ejemplo de una micrografía de MCM-41 tomada con el mismo.

El contraste de la imagen depende de las diferencias en el espesor de la muestra, en las regiones más gruesas de la muestra (en este caso las paredes de sílice) la cantidad de electrones dispersados o transmitidos es mayor comparada con la que se produce en regiones más delgadas. Además, es posible aumentar el contraste mediante el bloqueo de algunos de los haces difractados que se traducirá en una imagen donde las áreas que fuertemente difractan los electrones (aquí de nuevo, las paredes de sílice) aparecerán más oscuras en la micrografía. Con TEM es posible resolver los detalles de una muestra en el intervalo de 0,1 nm. Gracias a esta técnica ha sido posible visualizar la orientación y el tamaño de los poros, estudiar la homogeneidad y el grosor de los recubrimientos que realizamos sobre las nanopartículas de sílice e incluso detectar la destrucción parcial de la mesoestructura del SBA-15 tras un tratamiento agresivo con HCl. Además la transformada rápida de Fourier (FFT) de las micrografías de TEM nos permite conocer la

difracción patrón de la muestra. Estos datos son similares a la información obtenida por XRD pero se calcula a partir de una micrografía y no a partir de toda la muestra. Puede ser utilizado para estudiar, por ejemplo, las orientaciones del grano en materiales policristalinos o en nuestro caso las estructuras mesoporosas en la sílice.

Las imágenes de TEM se han obtenido de un microscopio JEOL 3000 FEG con una tensión de aceleración de 300 kV (Cs 0,6 mm, resolución 1,7 Å) y un portamuestras goniométrico de doble inclinación hasta un máximo de $\pm 45^\circ$. Este microscopio está instalado en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica del CAI de la UCM. Las imágenes se han registrado con una cámara CCD (Modelo MultiScan 794, Gatan, 1024 x 1024 píxeles, tamaño 24 μm x 24 μm) utilizando condiciones de baja dosis. El análisis y procesado de imágenes se han realizado a través del programa *Digital Micrograph* (Gatan).

AI.6 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

El análisis de EDS es un procedimiento estándar para identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra de un tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos. El material de muestra es bombardeado con electrones de un SEM o TEM y los rayos X producidos son medidos con un espectroscopio de rayos X.²⁹⁴ La radiación producida por este salto de electrones entre orbitales tiene una propiedad fundamental, y es que la energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. Esto se debe a que la diferencia de energía entre orbitales aumenta según lo hace el peso atómico, como consecuencia principalmente del aumento del nº de protones en el núcleo. De este modo es posible asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica, de tal forma que midiendo con un detector apropiado los fotones expulsados por la muestra podemos averiguar:

- a) Por la energía de cada fotón, cual es el elemento que lo está produciendo (análisis cualitativo).
- b) Por el número de fotones emitido de cada energía, la cantidad relativa de cada elemento (análisis cuantitativo).

Tal como se muestra en la **Figura AI.12**, esta técnica ha permitido la detección de cantidades ínfimas de elementos ligeros, tales como el nitrógeno y ha sido de gran ayuda a la hora de estudiar la funcionalización de algunas muestras y comprobar que la distribución de los grupos funcionales se ha llevado a cabo de forma homogénea a lo largo de todo el material.

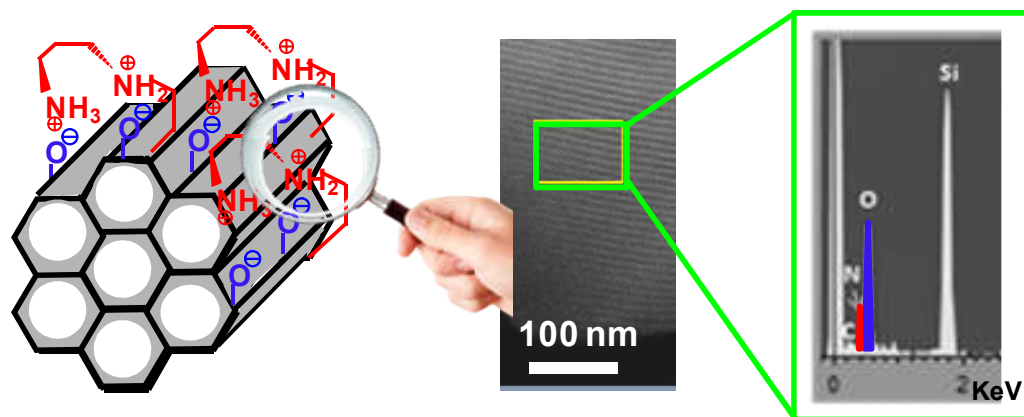


Figura AI.12 Representación esquemática de la identificación y cuantificación de la composición elemental del área de una muestra funcionalizada.

En la presente Tesis los análisis se han realizado en un microscopio de transmisión JEOL 3000 FEG el cual lleva acoplado un analizador de energía dispersiva de rayos X *Oxford Link* y una unidad STEM. Instalado en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica del CAI de la UCM.

AI.7 Análisis químico elemental

El análisis químico elemental o microanálisis es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas. El microanálisis se basa en la combustión de la muestra a analizar en un ambiente de oxígeno puro y a una temperatura aproximada de 1000 °C. Con esta combustión se consigue convertir las moléculas orgánicas de la muestra en gases simples (CO_2 , H_2O , N_2 , etc.). Una vez producidos, los gases se presurizan y se separan mediante una columna cromatográfica. Finalmente, se mide la cantidad de cada uno de ellos gracias a sus diferentes conductividades térmicas (**Figura AI.13**).

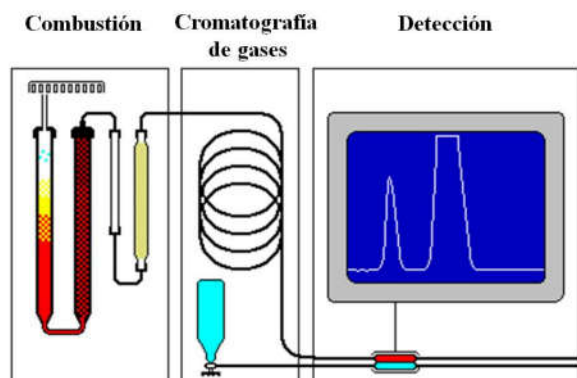


Figura AI.13 Representación esquemática del funcionamiento de un equipo de microanálisis. Adaptada de la referencia. Adaptada de © 1996 James P. H. Fouler.

Las medidas de análisis químico elemental se han realizado en un equipo LECO CHNS-932 y los resultados obtenidos han servido para determinar la cantidad de surfactante residual presente en los NSM así como el grado de funcionalización.

AI.8 Análisis termogravimétrico y termodiferencial (TGA/DTA)

El TGA da una medida cuantitativa de la ganancia o pérdida de peso de un material en función de la temperatura y se puede llevar a cabo en distintas atmósferas de trabajo.²⁹⁵ El DTA mide cambios de energía, es decir, si un proceso es endotérmico o exotérmico con respecto a una muestra de referencia. Esta técnica es útil para una amplia variedad de investigaciones químicas: calcinación, actividad catalítica, quimisorción, descomposición, desolvatación, hidrosopicidad, cinéticas, reacciones en estado sólido, adsorción-desorción, estabilidad térmica, etc. Diferentes atmósferas tales como aire, argón o helio se pueden utilizar dependiendo de la finalidad de la medición.

Los análisis de TGA/DTA se han realizado en crisoles de aluminio en un equipo Perkin-Elmer Diamond entre 30 y 600 °C en un flujo constante de aire de 100 mL/min con una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 600 °C. Esta temperatura se mantiene durante durante 1 h para asegurarnos una completa combustión. Este programa permite calcinar y cuantificar la materia orgánica (MO) que los NSM contienen anclada, cargada en los poros o fisisorbida en su superficie. La determinación de la MO se realiza entre 100 y 500 °C para descartar las pérdidas de masa por humedad y desestimar la exclusión de la condensación de los grupos silanol. Por tanto realizando el TGA de una muestra funcionalizada y comparándolo con el TGA de la misma muestra en un paso anterior de síntesis podemos calcular la cantidad de sustancia incorporada en función del incremento de MO observado. A modo de ejemplo en la **Figura AI.14** se muestra el TGA/DTA obtenido para una de las muestras sintetizadas durante el desarrollo de esta Tesis

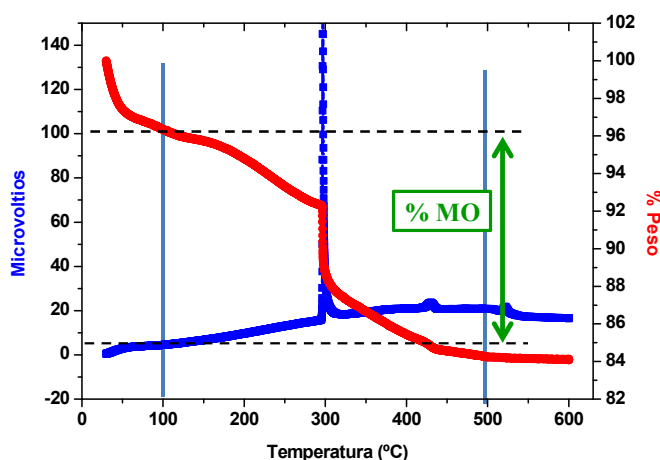


Figura AI.14 Ejemplo del análisis termogravimétrico de partículas funcionalizadas donde se muestra el porcentaje de la pérdida de masa correspondiente a materia orgánica.

AI.9 Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF)

La espectroscopía de XRF es una técnica analítica no destructiva utilizada para determinar la composición elemental de una muestra mediante la medición de la fluorescencia (secundaria) de rayos X emitida desde una muestra cuando es excitado por una fuente de rayos X primaria (**Figura AI.15**). Cada uno de los elementos presentes en una muestra produce un conjunto característico de rayos X fluorescentes ("una huella digital") que es único para ese elemento específico. Por esta razón la XRF es una técnica excelente para el análisis cualitativo y cuantitativo de la composición de los materiales.²⁹⁶

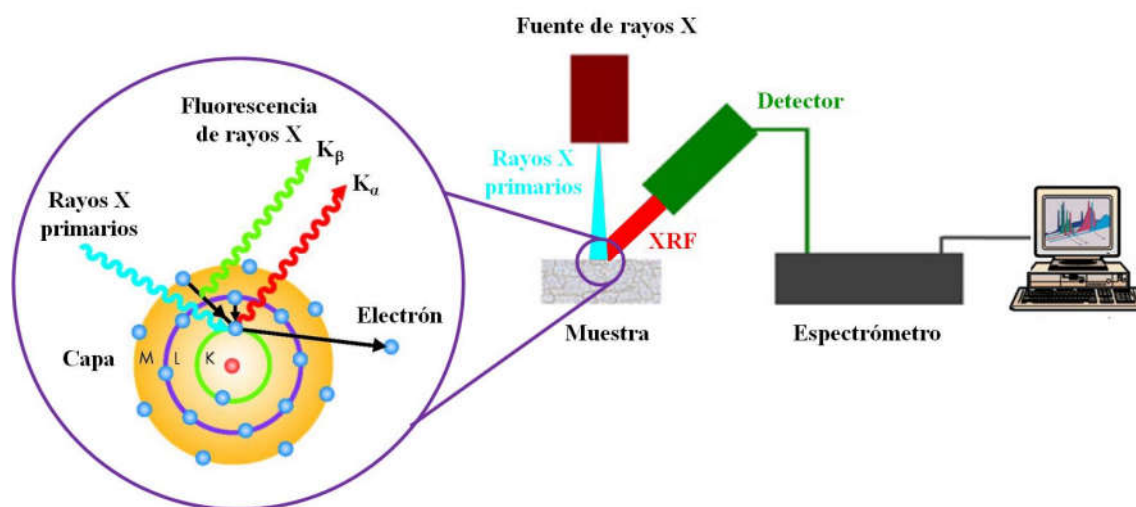


Figura AI.15 Representación esquemática del funcionamiento de la XRF.

Los análisis espectroscópicos de XRF se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Philips PANalytical Axios, que emplea como fuente de rayos X un cátodo de rodio, utilizándose la radiación de la línea Rh $k\alpha$ ($\lambda = 0,6139 \text{ \AA}$). Este equipo emplea dos cristales monocromadores, uno de LiF y otro de wolframio, que discriminan la señal de rayos X emitida por la muestra en función de su energía. El análisis se limita a los elementos cuyo número atómico, Z , sea mayor a 6 (a partir del boro). Las muestras se han comprimido en forma de discos de 13 mm de diámetro mediante una presión uniaxial de 0,5 MPa y se han depositado sobre ácido bórico. Para la medida se han empleado portamuestras de aluminio con máscaras de 10 nm de diámetro.

AI.10 Potencial zeta (ζ)

El potencial ζ es una propiedad física que presenta cualquier partícula en suspensión. Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de la estabilidad coloidal.²⁹⁷ En torno a una partícula en suspensión se forma lo

que se conoce como doble capa eléctrica. Se basa en que la presencia de una carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que la rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de contraiones, iones de carga opuesta a la de la partícula, cerca de la superficie. Por lo tanto existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. La capa de líquido que rodea la partícula existe como dos partes; una zona interior (capa Stern), donde los iones están fuertemente unidos y una zona exterior (difusa) en la que se asocian con menos firmeza. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro del límite de la misma se mueven también. Mientras que los iones más allá del límite permanecen inmóviles en la dispersión. El potencial en este límite (superficie de cizallamiento hidrodinámico) es el potencial ζ (Figura A1.16). La magnitud del potencial ζ da una idea de la potencial estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta negativo o positivo, entonces tenderán a repelerse entre sí y no habrá tendencia a que las partículas se unan. Sin embargo, si las partículas tienen valores bajos de potencial zeta entonces no habrá ninguna fuerza para evitar que las partículas se unan y floculen. La línea divisoria entre suspensiones estables e inestables generalmente se da en cualquiera de +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivos que 30 mV o más negativo de -30 mV se consideran normalmente estables. Sin embargo, si las partículas tienen una densidad diferente del dispersante suelen sedimentar.

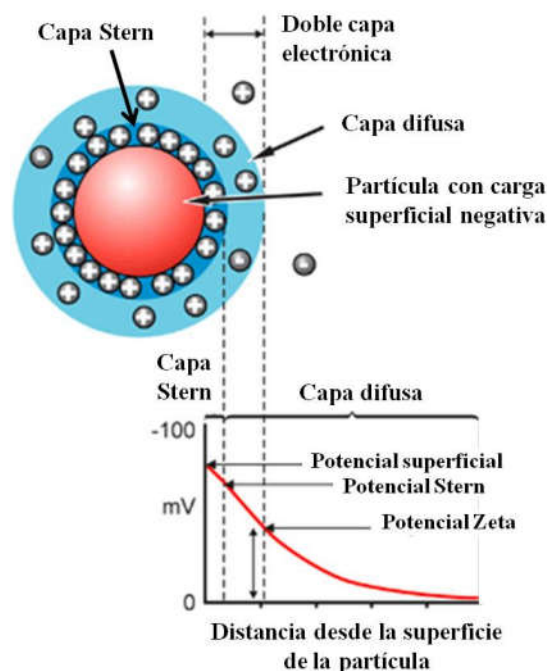


Figura A1.16 Representación esquemática del potencial ζ . Adaptada de www.malvern.co.uk.

En esta Tesis esta técnica se ha empleado para medir el de potencial ζ de los materiales en medio acuoso, bien en una medida única o bien en una curva de potencial en función del pH. El potencial ζ ha resultado muy útil también para corroborar la

funcionalización del material durante los distintos pasos de síntesis gracias a la variación en la carga superficial. Finalmente nos ha permitido estudiar la estabilidad coloidal de las nanopartículas de MCM-41.

Las medidas de potencial ζ se han realizado en un equipo Malvern Zetasizer Nano Series acoplado a un valorador automático MPT-2.

AI.11 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica, y con la última tecnología, inferiores a 1 nm. Las aplicaciones típicas de la dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto del tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein.²⁹⁸ Los equipos de DLS miden la fluctuación de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo (**Figura AI.17**) gracias a un componente del equipo, denominado correlador, que mide la similitud (correlación, de ahí su nombre) entre la intensidad de la luz dispersada a dos periodos de tiempo diferentes. Cuanto más rápido se mueva una partícula (gracias a su menor tamaño) las diferencias serán mayores ya que las interacciones constructivas y destructivas serán muy diferentes en cada punto, y por tanto la correlación disminuirá muy rápido con el tiempo. Al contrario, las partículas de mayor tamaño se moverán más despacio, y la correlación disminuirá muy lenta con el tiempo.

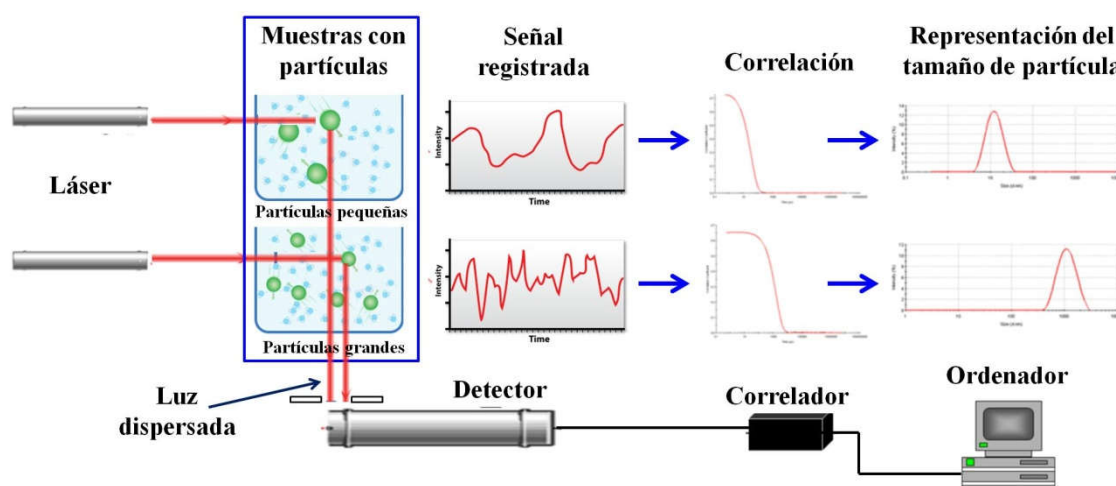


Figura AI.17 Configuración de los elementos de medida de un equipo de DLS, y forma de obtención del tamaño de la partícula a través de las medidas de la fluctuación de la luz dispersada a lo largo del tiempo.

Esta correlación sirve para calcular el coeficiente de difusión traslacional (D), que se relaciona con el tamaño (radio hidrodinámico, tamaño de la partícula incluida la capa de solvente cercana a su superficie, r) a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta r}$$

En dicha ecuación k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del líquido de la disolución. De esta forma el equipo es capaz de ofrecer medidas del tamaño y distribución de tamaño de las partículas.

Las medidas de DLS se han llevado a cabo en el mismo instrumento que las de potencial ζ . En nuestro caso este tipo de medidas se han realizado sólo para nanopartículas tipo MCM-41 porque las partículas de SBA-15 son excesivamente grandes y demasiado irregulares para ser medidas por esta técnica. Además puesto que la funcionalización y o el anclaje/adsorción de biomoléculas por norma general aumenta el radio hidrodinámico de las nanopartículas, este incremento ha sido útil a la hora de comprobar el correcto anclaje de moléculas en superficie.

AI.12 Espectroscopías UV/Visible y de fluorescencia

Para que una radiación electromagnética incidente interactúe con la materia es necesario que tenga una longitud de onda del mismo tamaño o menor que las dimensiones sobre aquello con lo que quiere incidir. Las técnicas de espectroscopía UV/visible y de fluorescencia se basan en el hecho de que cuando una radiación de la región UV/visible ($\approx 10\text{-}750$ nm) incide sobre una muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, mientras que el resto de la radiación es transmitida. La radiación UV/visible absorbida produce una transición entre niveles electrónicos de las moléculas de la muestra, dando lugar a que una sustancia que se encontraba en un nivel energético fundamental X alcance un estado excitado X^* . Las diferencias energéticas entre los distintos niveles están cuantizadas y son características de cada sustancia. Después el sistema puede volver a su estado fundamental por distintas vías que se muestran en el diagrama de Jablonski (**Figura AI.18**). A partir del estado fundamental que normalmente es un estado singlete, por absorción de una cantidad concreta de radiación se puede llegar a estados singlete más elevados. El retorno desde el estado singlete excitado hasta el fundamental puede hacerse mediante procesos radiantes (fluorescencia) o por desactivación no radiante (conversión interna). Existen otros procesos en los que tiene lugar una inversión de espín no radiante hasta un estado triplete (cruce entre sistemas), que oponiéndose a la prohibición de espín, puede volver al estado singlete fundamental mediante la emisión radiante de fosforescencia.²⁹³

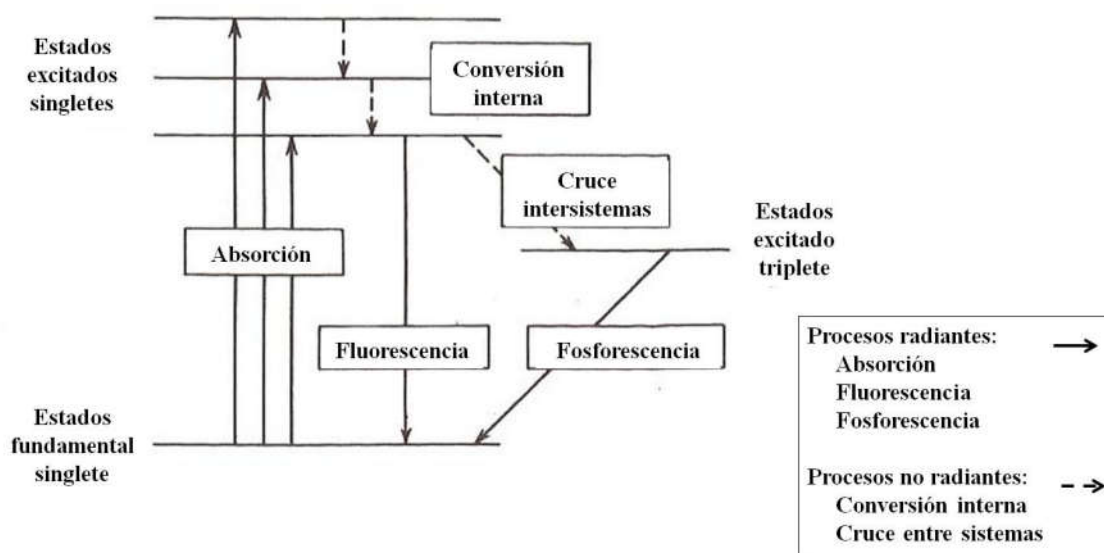


Figura AI.18 Diagrama de Jablonski.

Espectroscopía UV/visible:

La absorbancia se define como la relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra. Cuando una luz de una longitud de onda determinada, seleccionada por un filtro, incide sobre una muestra, parte de esa luz es absorbida. La luz no absorbida pasa a través de la muestra y es recogida por un detector colocado en el otro lado de la cubeta, frente a la fuente de luz (**Figura AI.19**). Como hemos visto, la longitud de onda que absorbe cada sustancia es característica, lo que nos proporciona un análisis cualitativo de un analito en la muestra. Además según la *Ley de Lambert-Beer* la cantidad de luz absorbida o transmitida es proporcional a la concentración de analito por lo que la absorbancia se puede emplear también para la cuantificación de la sustancia en cuestión.

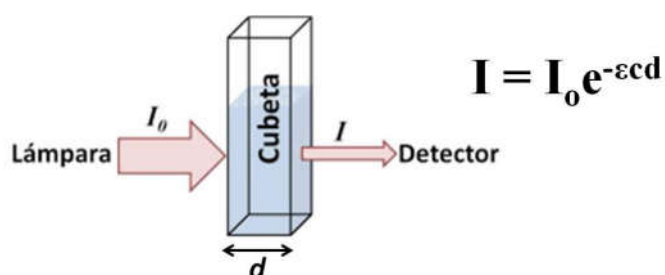


Figura AI.19 Esquema de la ley de Lambert-Beer. ϵ es el coeficiente de absorción molar del medio y c y d son la concentración y el espesor de la muestra respectivamente.

Esta técnica ha sido empleada principalmente para determinar la cantidad de fármaco o molécula modelo cargada en los NSM mediante la diferencia de intensidad en la disolución antes y después del proceso de carga. Asimismo ha sido empleada para

estudiar la liberación de dichas moléculas en diferentes medios. Para ello se ha realizado una recta patrón con concentraciones conocidas de la molécula a determinar.

Para todas estas medidas se ha empleado un espectrómetro UV-visible (Unicam UV 500) a la longitud de onda adecuada en cada caso.

Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética y al relajarse al estado basal liberan el exceso de energía en forma de luz. Las dos principales ventajas de los métodos de fluorescencia sobre los de absorción son: 1) Una sensibilidad entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor, y; 2) mayor intervalo de respuesta lineal. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican menos que los de absorción ya que no todos los sistemas químicos son capaces de fluorescer.

Un fluorímetro consta de una fuente de luz y de un sistema de selección de longitud de onda de excitación. Cuando la muestra es excitada con radiación de energía apropiada emite radiación en todas las direcciones del espacio. No obstante la luz emitida se detecta mejor en ángulo recto con respecto al haz de excitación ya que se evitan problemas de dispersión de la luz y también el haz de luz excitante que es de mucha mayor intensidad que el haz de luz emitida. La luz emitida es recogida seleccionando una longitud de onda apropiada y conducida a un detector donde queda registrada por sistemas similares a los de un espectrofotómetro de absorción (**Figura AI.20**).

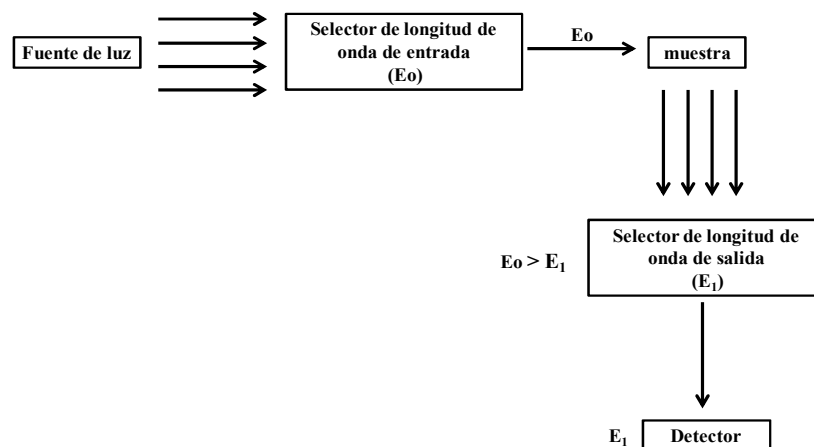


Figura AI.20 Esquema de un equipo de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia en disolución han sido realizadas con un equipo Biotek Spectrofluorimeter (Biotek Instruments GmbH, Germany). Esta técnica ha sido empleada, como en el caso de la espectroscopía de absorción, para cuantificar la carga y liberación de las moléculas confinadas en los NSM con ayuda de una recta patrón previamente preparada. Pero también ha sido útil en otras aplicaciones, como por ejemplo

para valorar el comportamiento a distintos valores de pH del recubrimiento de gelatina fluorescente en el nanosistema para la liberación de TOP.

AI.13 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La incidencia de un haz de luz infrarroja ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) sobre un material no provoca transiciones electrónicas, como sí produce la luz UV/visible, pero sí puede promover transiciones vibracionales moleculares, siempre y cuando la energía sea la necesaria. Esta energía está cuantizada y depende del tipo de átomos y del tipo de enlaces que los mantiene unidos. La absorción de luz infrarroja por parte de una molécula requiere que el enlace que va a vibrar sufra una variación en el momento dipolar para que vibre a una frecuencia más alta. La intensidad de la absorción de radiación infrarroja tiene relación directa con la magnitud del momento dipolar de manera que cuanto mayor es el momento dipolar más intensa es la absorción. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión (*stretching*, ν) y de flexión (*bending*, δ). Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En la **Figura AI.21** se representan los diferentes tipos de vibraciones moleculares.

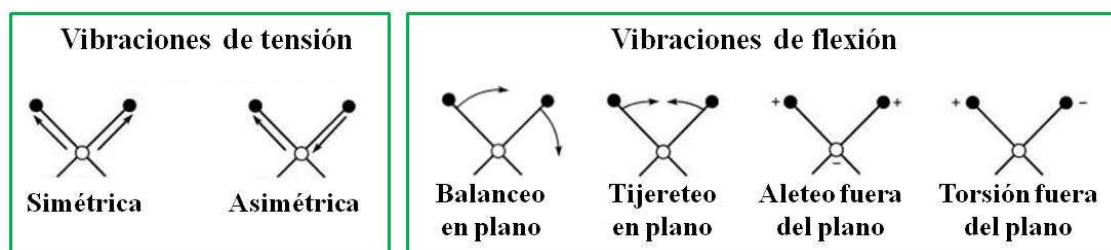


Figura AI.21 Esquema de los distintos tipos de vibraciones moleculares más característicos.

Mediante la exploración del intervalo de longitudes de onda del IR y el registro de la cantidad de luz transmitida para cada longitud de onda es posible determinar qué grupos funcionales están presentes en la superficie del material.²⁷⁸ Gracias a esta técnica se han podido detectar modificaciones en la superficie de los NSM con diversos grupos funcionales, anclados o adsorbidos en los materiales. También se ha utilizado para comprobar la correcta eliminación del surfactante y restos de reactivos.

Los espectros FTIR de las muestras en estado sólido se han registrado entre 4000 y 300 cm^{-1} en un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus 470 en modo de reflectancia total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR).

AI.14 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)

Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en átomos como ^1H , ^{13}C , ^{29}Si y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar (**Figura AI.22A**).

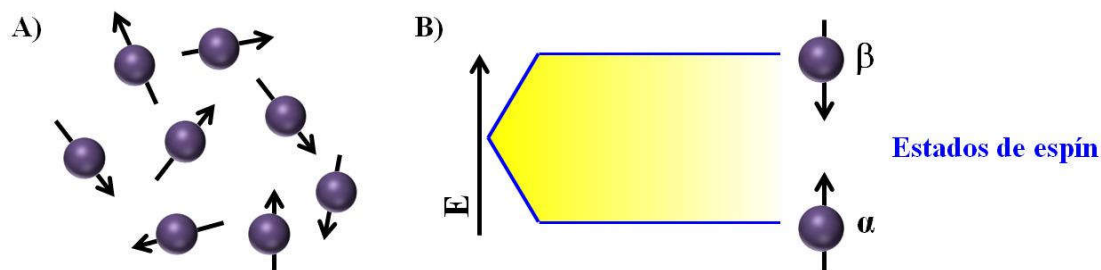


Figura AI.22 Esquema de la disposición de los espines nucleares de los átomos, A) de forma aleatoria en ausencia de campo magnético y B) orientados en presencia del campo magnético.

Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la **Figura AI.22B**, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . En este caso la radiación necesaria para provocar transiciones en el espín nuclear se encuentra en la región de las radiofrecuencias del espectro electromagnético. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de NMR detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de NMR. Hasta ahora hemos hablado de un núcleo aislado en un campo magnético pero en las moléculas no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones de otros átomos que actúan como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. Así no todos los átomos perciben el mismo campo magnético ni resuenan a la misma frecuencia. Puesto que se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes dependiendo de los grupos funcionales que tienen a su alrededor.

La base de la teoría es la misma independientemente del tipo de átomo que estemos estudiando, sin embargo la información que nosotros obtenemos a partir de ellos

es diferente. La resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C son complementarias y se utilizan para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno y de carbono respectivamente.

En esta Tesis Doctoral los espectros de NMR de ^1H y ^{13}C en disolución han sido realizados en un equipo Bruker AV 250 MHz y nos han permitido corroborar la obtención las especies deseadas tras cada etapa de síntesis.

Se han registrado también espectros de ^{13}C , ^{29}Si y ^{31}P en estado sólido. Los experimentos de NMR de ^{13}C , ^{29}Si y ^{31}P de las muestras en polvo, se han realizado girando la muestra alrededor del ángulo mágico ($54^\circ 44'$) en un espectrómetro Bruker 200 a 75,45 MHz para el ^{13}C y en un Bruker AV-400-WB a 79,49 y 161,97 MHz para ^{29}Si y ^{31}P , respectivamente. Para todos los núcleos y de forma imprescindible para el ^{13}C , se ha aplicado la técnica de polarización de núcleos de mayor abundancia (como puede ser el ^1H) al núcleo de estudio. En este caso, la técnica recibe el nombre de NMR de ángulo mágico de spin con polarización cruzada, CP-MAS NMR. Tetrametilsilano (TMS) y 85 % de H_3PO_4 han sido utilizados como estándar para las medidas ^{29}Si y ^{31}P , respectivamente

Los espectros de ^{13}C y ^{31}P se han obtenido con una secuencia de polarización cruzada (CP-MAS) utilizando un tiempo de contacto de 1 ms y una velocidad de giro de 12 kHz para el ^{13}C y de 6 kHz para el ^{31}P . El período de tiempo entre las sucesivas acumulaciones ha sido de 3 y 4 s para las medidas de ^{13}C y ^{31}P , respectivamente. En el caso del ^{29}Si se ha utilizado una secuencia de pulso sencillo con un período de tiempo entre acumulaciones de 5 s.

Las medidas de ^{13}C han constituido un método inequívoco de comprobar el anclaje de la molécula deseada a la superficie de los NSM.

Las medidas de NMR de ^{29}Si realizadas en esta Tesis han proporcionado numerosa información sobre el grado de condensación del material, así como sobre la relación sílice/organosílice presente en la muestra en el caso de sistemas híbridos. En los NSM puros sin funcionalizar podemos observar las señales de tipo Q^n , donde Q se refiere a las especies siloxano $[\text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OH})_{4-n}]$, siendo $n = 2-4$ el número de átomos de oxígeno puente que rodean al átomo de silicio central. Las unidades estructurales Q^4 representan tetraedros SiO_4 interconectados que forman parte de las paredes de sílice. Las unidades Q^3 están asociadas con grupos Si-OH aislados tanto libres como unidos por enlace de hidrógeno. Las unidades Q^2 corresponden a grupos silanol germinales. La aparición de las señales de tipo T^m ($m = 1-3$) en materiales mixtos confirma la existencia de enlaces covalentes entre la superficie de sílice y los grupos orgánicos. Si bien su desplazamiento depende de la naturaleza del grupo orgánico al que va conectado el silicio la posición relativa entre los mismos es similar. En la **Figura AI.23** se representan las señales de Si más frecuentes para NSM y la conectividad asociada a cada una de ellas.

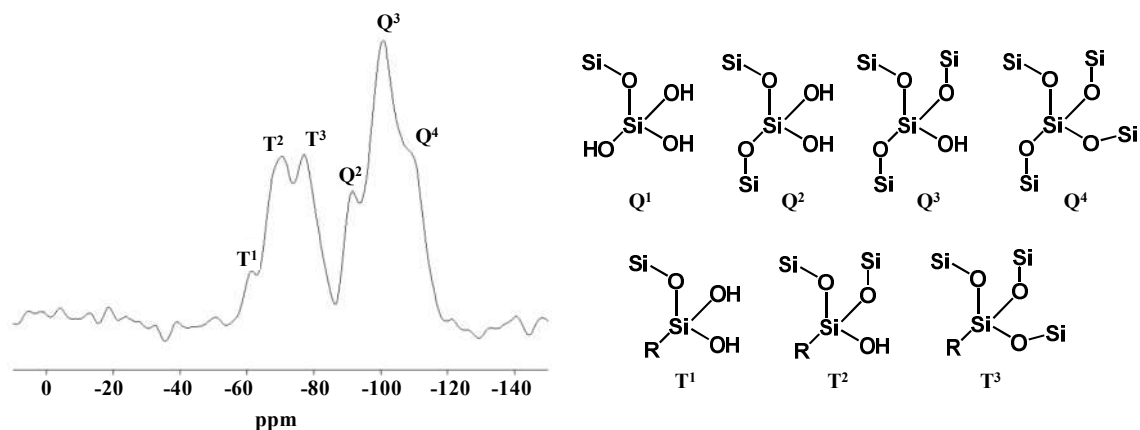


Figura AI.23 Esquema de la naturaleza y la ubicación aproximada de los entornos T^m y Q^n de un espectro de NMR de ^{29}Si de NSM.

La técnica de ^{29}Si MAS NMR en estado sólido puede emplearse para estimar de manera cuantitativa los grupos Si-OH en la superficie de los NSM. Para obtener dicha información se deconvoluciona la región espectral Q de los espectros experimentales en bandas gaussianas individuales Q^4 , Q^3 , Q^2 , en este proceso es preciso controlar el tiempo de contacto durante el que se transfiere polarización del núcleo ^1H al núcleo ^{29}Si y llevar a cabo todos los espectros en las mismas condiciones. La cantidad de grupos silanol por mol de sílice se ha calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$[\text{SiOH}] = \frac{(2 \times \%Q^2) + \%Q^3}{\sum(\%Q^i \times \text{EMW}_Q)}$$

donde [SiOH] es la concentración de grupos silanol expresada en mol/g y $\%Q^i$ representa la población relativa de especies Q^i (Q^4 , Q^3 , Q^2). El peso molecular efectivo de cada especie (EMW_Q) se define como la suma del peso molecular de los átomos que contribuyen a cada especie, contando con que en los enlaces siloxano (Si-O-Si), los átomos de oxígeno que conectan especies se cuentan como medio.

“Las células tienen la palabra.”

Garcru

**Técnicas de evaluación de la
respuesta bacteriana y celular**

A2

Técnica de evaluación	Información obtenida
Citometría de flujo (FC)	Internalización de nanopartículas en células y viabilidad celular
Microscopía confocal (CM)	Internalización de nanopartículas en células y visualización de la adhesión bacteriana
Ensayos con el kit de MTS	Viabilidad celular
Determinación del número de unidades formadoras de colonias (CFUs)	Cuantificación de la adhesión bacteriana
Difusión en agar según Kirby Bauer	Capacidad antibiótica

Tabla AII.1 Técnicas utilizadas para la evaluación de la respuesta bacteriana y celular de los materiales desarrollados en la presente Tesis Doctoral.

AII.1. Cultivos microbiológicos

Para el desarrollo de esta Tesis se ha sintetizado un material derivado del SBA-15 con propiedades zwitteriónicas y antibióticas. Con el fin de comprobar la capacidad antiadherente y antibiótica de dicho material se han realizado cultivos bacterianos con *S. aureus*. Este tipo de bacterias requieren un nivel de bioseguridad 2 (grupo de riesgo 2: riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo) que hace referencia a aquellos agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. El trabajo en el laboratorio se llevó a cabo siguiendo las precauciones necesarias para este tipo de bioseguridad según se refleja en el Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud.²⁹⁹

AII.2. Ensayos in vitro de adhesión bacteriana

Brevemente, las bacterias se dejaron crecer hasta una fase logarítmica media en caldo de cultivo Todd Hewith (THB) a 37° C bajo agitación orbital a 100 rpm hasta que la densidad óptica medida a 600 nm alcanzó un valor de 1,0 en un espectrofotómetro UV-Vis (UV-530, Bonsai technologies). A continuación, las bacterias del cultivo se

recogieron por centrifugación (centrífuga Labofuge 400, Thermo Scientific) a 1500 rpm durante 10 min a 22° C. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) estéril y se resuspendió en 10 mL de PBS. El número de bacterias se confirmó retrospectivamente mediante el cultivo de diluciones en serie del inoculado de partida en placas Petri de agar (TSA). La dilución seleccionada fue aquella que permitió el conteo directo de las unidades formadoras de colonias (CFUs). El término CFUs es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua. CFU es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. Una dilución de bacterias en agua peptonada se coloca en la placa de TSA y se cultiva hasta la aparición de las colonias (**Figura AII.1**).



Figura AII.1 Imagen de la aparición de UFC en las placas de TSA.

Para llevar a cabo los experimentos de adhesión en los diferentes materiales, estos fueron conformados en piezas en forma de disco de 6 mm de diámetro y 1 mm de altura mediante la compactación de fracciones de 20 mg de polvo seco utilizando 2,75 MPa de presión uniaxial. Previamente a la realización de los ensayos de adhesión, las muestras se esterilizaron por irradiación UV durante 7 min en cada cara de la pieza. Los diferentes discos se sumergieron en 1 mL de suspensión bacteriana con la concentración de células por mL optimizada anteriormente y se incubaron a 37° C bajo agitación orbital a 100 rpm durante 90 min. Posteriormente, las muestras se enjuagaron asépticamente tres veces con PBS estéril para eliminar cualquier bacteria libre. Finalmente se llevaron a cabo dos experimentos: *i) Cuantificación* de las bacterias adheridas; *ii) Visualización* de las bacterias adheridas.

- i)* Con el fin de cuantificar la adhesión bacteriana, cada disco se colocó en un vial Eppendorf conteniendo 1 mL de PBS seguido de 30 min de sonicación en un baño de ultrasonidos de baja potencia (Selecta). Este proceso de sonicación se repitió tres veces, asumiendo que el 99,9 % de las bacterias adheridas fueron despegadas.^{300,301} A continuación, 100 µL de cada sobrenadante resultante de la sonicación se cultivó en placas de TSA, seguido de incubación a 37 °C durante

toda la noche. La determinación del número de CFUs resultó de la suma global de los tres procesos de sonicación. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Con el fin de expresar la adhesión bacteriana como CFUs por unidad de superficie, fue necesario conocer la porosidad accesible a las bacterias. Para ello, la porosidad de los discos se midió mediante porosimetría de intrusión de mercurio en un dispositivo Micromeritics Autopore IV 300 (Micromeritics Instrument Corporation). Esta técnica, utilizando el software AutoPore IV, permitió definir los diferentes intervalos de diámetro de poro y el área superficial para cada uno. El número de CFUs por cm^2 se calculó por normalización del conteo de CFUs en función del área superficial de las piezas conformadas como discos en el intervalo 1-600 μm .

- ii) Para *visualizar* las bacterias adheridas a las diferentes superficies, las muestras fueron teñidas utilizando un kit de viabilidad bacteriana y conteo (Live/Dead® BacLight™). Este kit utiliza una mezcla de dos ácidos nucleicos de tinción, un tinte verde SYTO 9 y otro rojo-fluorescente, el yoduro de propidio (PI). Siguiendo el protocolo suministrado en el kit, una mezcla de SYTO 9 (bacterias vivas/verde) y PI (bacterias muertas/rojo) se añadieron a los discos de muestra sumergidos en PBS fresco y se mantuvieron en contacto durante 15 min en la oscuridad. Después de ese tiempo las muestras se lavaron con PBS e inmediatamente fueron observadas en un microscopio confocal como se describirá en la **sección AII.6**.

AII.3. Método de difusión en agar según Kirby Bauer

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de agente antimicrobiano, es colocado sobre una superficie de agar inoculada con un microorganismo. Tal y como se muestra en la **Figura AII.2** el antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición puede medirse y se relaciona con la capacidad antimicrobiana de dicha sustancia. Esta metodología se encuentra estandarizada para el estudio de números microorganismos entre los que se encuentran las bacterias *S. aureus*.

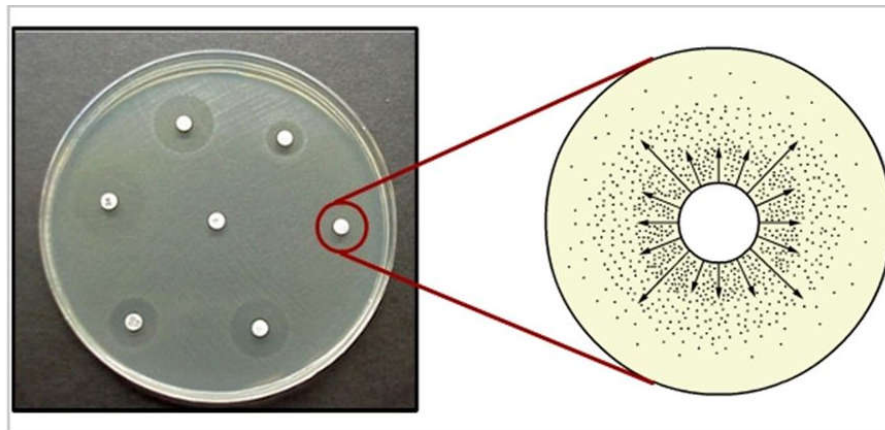


Figura AII.2 Imagen de un test de Kirby Bauer y esquema de la formación de la zona de inhibición bacteriana.

AII.4. Cultivos celulares

El cultivo de determinadas líneas celulares en presencia de los sistemas basados en MSNs desarrollados en esta Tesis Doctoral ha resultado indispensable para evaluar su comportamiento *in vitro*, destacando su biocompatibilidad, capacidad de vectorización e internalización celular, comportamiento estímulo respuesta y poder citotóxico. Realizar estos estudios resulta primordial para valorar la potencial utilización de dichos nanodispositivos en ensayos *in vivo*.

La línea celular elegida para los estudios *in vitro* ha dependido en cada caso de la aplicación y el centro de actuación para el que ha sido diseñado el nanosistema. En esta Tesis se han realizado cultivos en diferentes condiciones de acuerdo a las necesidades y características de cada línea celular. Las células empleadas han sido las siguientes: células de tumor de Ewin (A673), de fibrosarcoma (HT1080), de osteosarcoma humano (SAOS2) y (HOS), de neuroblastoma (NB1681), de cáncer de próstata (LNCap) y osteoblastos de ratón (MC3T3-E1). Las nanopartículas en suspensión se han puesto en contacto con las células y los ensayos se han realizado a diferentes tiempos y condiciones en función de la información deseada.

Pases de células

La mayoría de líneas celulares que crecen adheridas a plástico sufren una parada en su crecimiento a densidades elevadas, impuesta por el proceso de inhibición por contacto. Dependiendo de la morfología y propiedades de cada línea, las células paran de dividirse, bien cuando ocupan toda la superficie de la placa, o bien cuando todas están en contacto con otras (sin necesidad de cubrir completamente el plástico). A este momento, situación (o densidad) se le denomina *confluencia* del cultivo. Nunca se debe dejar un

cultivo en confluencia durante períodos prolongados, debiendo reducirse la densidad de células en ése momento, para permitir su crecimiento de forma continuada.

Si se quiere *mantener* la línea dividiéndose en una superficie igual a la usada hasta entonces, se descartarán parte de las células; si lo que se pretende es *expandir* las células, para aumentar su número total, se distribuirán todas las células a un número mayor de placas, sin desechar ninguna célula. En cualquiera de los dos casos, la densidad de células se reduce en un porcentaje que varía para cada línea, y que suele oscilar entre un 80 % y un 90 % (pase 1/5 o 1/10, respectivamente).

Para la mayoría de líneas celulares que crecen adheridas a un sustrato, es necesario despegar o levantar las células antes de poder realizar los pases celulares. La forma más conveniente de levantarlas en una suspensión celular (para poder manejarlas fácilmente en suspensión), es mediante el uso de tripsina una proteasa que se dirige a aquéllas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte. Para que la tripsinización sea efectiva, y para contribuir a debilitar la adherencia de las células al soporte, aparte de tripsina, hay que asegurarse de eliminar el suero del medio (que contiene inhibidor de tripsina), así como cationes divalentes presentes en el medio y que median la interacción célula-sustrato (mediante el uso de EDTA). Para ello, el procedimiento estándar de tripsinización es el siguiente:

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Lavar 1x (una vez) con PBS/EDTA.
3. Incubar con 1-2 mL de disolución de Tripsina/EDTA durante 5 min, a 37 °C hasta que las células se vean redondas bajo el microscopio, señal de que su adherencia está muy disminuida.
4. Diluir la tripsina/EDTA en la placa con 8-9 mL de medio completo para detener la tripsinización.
5. Transferir este volumen a un tubo estéril, y centrifugar 5 min a 700 rpm. Descartar el sobrenadante (para eliminar la tripsina, y el EDTA, ya que si no, no se adherirán de nuevo las células al sembrarlas).
6. Resuspender el sedimento celular en un volumen adecuado de medio de cultivo fresco y sembrar en la superficie apropiada.

AII.5. Citometría de flujo (FC)

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico basada en la utilización de luz láser, para el recuento y clasificación de las células según sus características morfológicas y la presencia de biomarcadores. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan una a una un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser. La luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de

detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células (**Figura AII.3**). También permite el análisis multiparamétrico simultáneo de otras características físicas y químicas, evaluando en promedio más de dos mil partículas por segundo. Los parámetros analizables por citometría de flujo son: *i*) los asociados a la dispersión de luz (light scatter) que producen las partículas o células directamente relacionados con el tamaño y la complejidad y *ii*) las distintas fluorescencias asociadas a la partícula o célula.

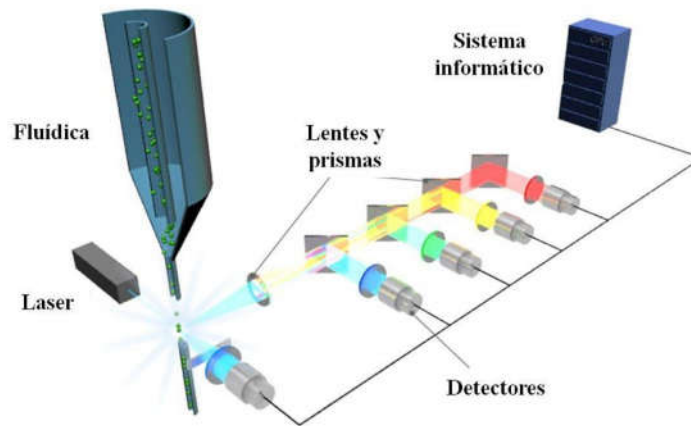


Figura AII.3. Esquema del principio de la citometría de flujo. Imagen obtenida en www.biotechspain.com.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral los datos han sido recogidos mediante dos citómetros diferentes según el estudio realizado: un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences) ubicado en el Instituto de Salus Carlos III y un citómetro FACScan machine (Becton, Dickinson and Company) emplazado en el CAI del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM.

El uso de esta técnica nos ha permitido cuantificar el tipo y la cantidad de células que internalizan nanopartículas fluorescentes. Estas se han sintetizado con y sin agente de vectorización en superficie, y se han expuesto frente a células sanas y células cancerosas. De la misma forma ha permitido estudiar la citotoxicidad de los materiales también frente a células sanas y células tumorales.

AII.6. Microscopía confocal (CM)

El CM es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un "pinhole" espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal. Como se observa en la **Figura AII.4A** el "pinhole" es una abertura localizada delante del

fotomultiplicador que evita el pasaje de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco, la luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no converge en el pinhole y no es detectada por el fotomultiplicador.

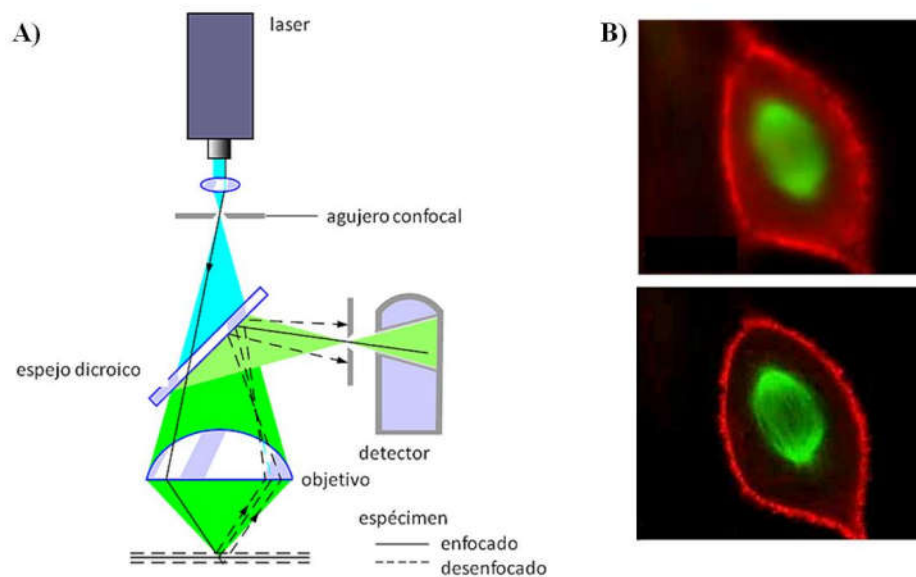


Figura AII.4 A) Esquema simplificado del funcionamiento del microscopio confocal. B) Comparación entre dos micrografías de una célula en mitosis, contrastada con un doble marcaje fluorescente. Arriba una imagen tomada con un microscopio fotónico clásico. Abajo la imagen obtenida con un microscopio confocal. Imágenes obtenidas de www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_7.htm (acceso 7 julio de 2016).

Este microscopio da lugar a una imagen mucho más definida (**Figura AII.4B**) gracias a que presenta una serie de ventajas con respecto a la microscopía fotónica clásica:

- Uso de la fluorescencia (epi-fluorescencia).
- Enfoca un solo plano del espécimen.
- Elimina la información proveniente de otros planos no enfocados del espécimen.
- Obtención de cortes ópticos seriados a partir de muestras con cierto grosor o cuyo corte fino se dificulta.
- Gracias a programas de computación, se combinan los cortes ópticos seriados y a partir de ellos se reconstruye en tres dimensiones la estructura observada.

Las imágenes han sido adquiridas usando un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con un $63 \times$ (apertura numérica 1.4) de aceite objetivo de inmersión. Para efectos de presentación, las imágenes han sido exportadas en formato TIFF y procesadas con Adobe Photoshop (Mountain View, CA, EE.UU.), para los ajustes de brillo y contraste.

En este trabajo la microscopía confocal se ha empleado como complemento a la citometría de flujo para estudiar la internalización de las MSNs en las células así como su localización en el interior de las mismas.

También ha sido utilizada para comparar las diferencias en adhesión bacteriana que presentan los materiales zwitteriónicos frente a los que no lo son. Como se describió en la **sección A2.2.ii** el microscopio confocal se utilizó para visualizar la cantidad de bacterias adheridas a cada material utilizando el kit BacklightTM. Para observar la fluorescencia del SYTO 9 la muestra se ha excitado a 480 nm, y se ha medido a 500 nm, mientras que para el PI la λ_{exc} es 490/635 nm, con la fluorescencia emitida a 618 nm.³⁰² Cada experimento se llevó a cabo con tres especímenes. Tres zonas de cada espécimen de una superficie de $95,4 \mu\text{m} \times 95,4 \mu\text{m}$ fueron capturadas en cada imagen. Las imágenes mostrando las áreas cubiertas con bacterias muertas (rojo) y vivas (verde) se optimizaron utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health Bethesda).

AII.7. Ensayos de viabilidad celular con el kit de MTS

El MTS es un ensayo colorimétrico para la evaluación de la actividad metabólica celular basado en la reducción del compuesto de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) (MTS). El compuesto de tetrazolio MTS (reactivo de Owen) es biorreducido por las células en un producto coloreado: el formazán que es soluble en el medio de cultivo tisular (**Figura AII.5**). Esta conversión se lleva a cabo presumiblemente por el NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*) o NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*) producido por las enzimas deshidrogenasa en células metabólicamente activas. La cantidad de formazán medida por absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Este método permite por tanto medir supervivencia y proliferación celular, así como también, determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos.

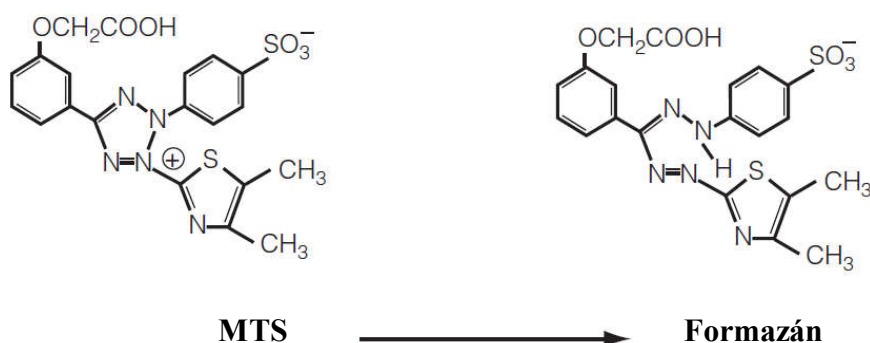


Figura AII.5 Estructuras del tetrazolio de MTS y del formazán.

El kit de MTS empleado en esta Tesis es CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) y el protocolo seguido para una placa de 96 pocillos es el que se describe a continuación:

1. Descongelar el kit CellTiter 96® acuosa. Para asegurarse de que el reactivo se descongela por completo, para un tamaño de 20 mL, es necesario dejar el reactivo a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos, o colocar el reactivo unos 10 minutos en un baño de agua a 37 °C.
2. Pipetear 20 µL del reactivo ya descongelado en cada uno de los pocillos que previamente contienen la muestra en 100 µL de medio de cultivo.
3. Incubar la placa a 37 °C durante 1-4 horas en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂.
4. Medir la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos.

El análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de MTS es quizás el más empleado para determinar la viabilidad celular en cultivos sembrados con distintas concentraciones de nanopartículas potencialmente antitumorales. Y precisamente este es el uso que se le ha dado en esta Tesis tal y como se muestra en la **Figura AII.6**.



Figura AII.6 Esquema de la metodología del ensayo MTS. Imagen adaptada de www.itsbio.co.kr (acceso 27 julio de 2016).

“No desprecies el recuerdo del camino recorrido. Ello no retrasa tu carrera, sino que la dirige.”

Pablo VI

Bibliografía

- (1) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB J.* **2005**, *19*, 311–330.
- (2) [Http://www.nih.gov/science/nanotechnology/](http://www.nih.gov/science/nanotechnology/)(accesed July 23, 2016).
- (3) Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine--Challenge and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 872–897.
- (4) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomedicine-Nanotechnology Biol. Med.* **2013**, *9*, 1–14.
- (5) European Commission: Second Regulatory Review on Nanomaterials 2012.
- (6) Aguilar, Z. P. Nanomaterials for Medical Applications. In; Elsevier, 2013.
- (7) Radomska, A.; Leszczyszyn, J.; Radomski, M. W. The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Adv. Clin. Exp. Med.* *25*, 151–162.
- (8) Cash, K. J.; Clark, H. A. Nanosensors and Nanomaterials for Monitoring Glucose in Diabetes. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 584–593.
- (9) Rezaei, B.; Ghani, M.; Shoushtari, A. M.; Rabiee, M. Electrochemical Biosensors Based on Nanofibres for Cardiac Biomarker Detection: A Comprehensive Review. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 513–523.
- (10) Zaidi, S. A.; Shin, J. H. Recent Developments in Nanostructure Based Electrochemical Glucose Sensors. *Talanta* **2016**, *149*, 30–42.
- (11) Karimi, M.; Ghasemi, A.; Sahandi Zangabad, P.; Rahighi, R.; Moosavi Basri, S. M.; Mirshekari, H.; Amiri, M.; Shafaei Pishabad, Z.; Aslani, A.; Bozorgomid, M.; *et al.* Smart Micro/nanoparticles in Stimulus-Responsive Drug/gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1457–1501.
- (12) Masood, F. Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *60*, 569–578.
- (13) Ahmed, T. A.; Aljaeid, B. M. Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 483–507.
- (14) Gao, W.; Thamphiwatana, S.; Angsantikul, P.; Zhang, L. Nanoparticle Approaches against Bacterial Infections. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2014**, *6*, 532–547.
- (15) Courtney, C. M.; Goodman, S. M.; McDaniel, J. A.; Madinger, N. E.; Chatterjee, A.; Nagpal, P. Photoexcited Quantum Dots for Killing Multidrug-Resistant Bacteria. *Nat Mater* **2016**, *15*, 529–534.
- (16) Dhivya, S.; Ajita, J.; Selvamurugan, N. Metallic Nanomaterials for Bone Tissue Engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* *11*, 1675–1700.
- (17) Mohamed, A.; Xing, M. (Mengqiu). Nanomaterials and Nanotechnology for Skin Tissue Engineering. *Int. J. Burns Trauma* **2012**, *2*, 29–41.
- (18) Hao, N.; Chen, X.; Jayawardana, K. W.; Wu, B.; Sundhoro, M.; Yan, M. Shape Control of Mesoporous Silica Nanomaterials Templated with Dual Cationic Surfactants and Their Antibacterial Activities. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 87–91.
- (19) Myung, J. H.; Tam, K. A.; Park, S.; Cha, A.; Hong, S. Recent Advances in Nanotechnology-Based Detection and Separation of Circulating Tumor Cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2016**, *8*, 223–239.
- (20) Sari, E.; Üzek, R.; Duman, M.; Denizli, A. Fabrication of Surface Plasmon Resonance Nanosensor for the Selective Determination of Erythromycin via Molecular Imprinted Nanoparticles. *Talanta* **2016**, *150*, 607–614.

- (21) Garcia-Bennett, A. E.; Ballell, L. Non-Absorbable Mesoporous Silica for the Development of Protein Sequestration Therapies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 428–434.
- (22) Estelrich, J.; Sánchez-Martín, M. J.; Busquets, M. A. Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: From Simple to Dual Contrast Agents. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 1727–1741.
- (23) Zhen, Z.; Xie, J. Development of Manganese-Based Nanoparticles as Contrast Probes for Magnetic Resonance Imaging. *Theranostics* **2012**, *2*, 45–54.
- (24) Padmanabhan, P.; Kumar, A.; Kumar, S.; Chaudhary, R. K.; Gulyás, B. Nanoparticles in Practice for Molecular-Imaging Applications: An Overview. doi:10.1016/j.actbio.2016.06.003. *Acta Biomater.*
- (25) Vallet-Regí, M.; Ruiz-Hernández, E. Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5177–5218.
- (26) Vallet-Regí, M.; Manzano García, M.; Colilla, M. *Biomedical Applications of Mesoporous Ceramics: Drug Delivery, Smart Materials, and Bone Tissue Engineering*; CRC; Taylor & Francis: Boca Raton, Fla.; London, 2012.
- (27) Colilla, M. Chapter 5: Silica-Based Ceramics: Mesoporous Silica. In *Bio-Ceramics with Clinical Applications*; Vallet-Regí, M., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014.
- (28) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism. *Nature* **1992**, *359*, 710–712.
- (29) Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G.; Chmelka, B.; Stucky, G. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* **1998**, *279*, 548–552.
- (30) Che, S.; Liu, Z.; Ohsuna, T.; Sakamoto, K.; Terasaki, O.; Tatsumi, T. Synthesis and Characterization of Chiral Mesoporous Silica. *Nature* **2004**, *429*, 281–284.
- (31) Soler-Illia, G. J. A. A.; Innocenzi, P. Mesoporous Hybrid Thin Films: The Physics and Chemistry Beneath. *Chemistry* **2006**, *12*, 4478–4494.
- (32) Sanchez, C.; Boissière, C.; Grosso, D.; Laberty, C.; Nicole, L. Design, Synthesis, and Properties of Inorganic and Hybrid Thin Films Having Periodically Organized Nanoporosity. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 682–737.
- (33) Schacht, S.; Huo, Q.; Voigt-Martin, I.; Stucky, G.; Schuth, F. Oil-Water Interface Templating of Mesoporous Macroscale Structures. *Science* **1996**, *273*, 768–771.
- (34) Zhao, G.; Aziz, B.; Hedin, N. Carbon Dioxide Adsorption on Mesoporous Silica Surfaces Containing Amine-like Motifs. *Appl. Energy* **2010**, *87*, 2907–2913.
- (35) Ullah, R.; Atilhan, M.; Aparicio, S.; Canlier, A.; Yavuz, C. T. Insights of CO₂ Adsorption Performance of Amine Impregnated Mesoporous Silica (SBA-15) at Wide Range Pressure and Temperature Conditions. *Int. J. Greenh. Gas Control* **2015**, *43*, 22–32.
- (36) Tian, R.; Sun, J.; Zhang, H.; Ye, M.; Xie, C.; Dong, J.; Hu, J.; Ma, D.; Bao, X.; Zou, H. Large-Pore Mesoporous SBA-15 Silica Particles with Submicrometer Size as Stationary Phases for High-Speed CEC Separation. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 742–748.
- (37) Li, X.; Lee, Y. R.; Row, K. H. Synthesis of Mesoporous Siliceous Materials in Choline Chloride Deep Eutectic Solvents and the Application of These Materials to High-Performance Size Exclusion Chromatography. *Chromatographia* **2016**, *79*, 375–382.
- (38) Tang, B.; Bi, W.; Row, K. H. Exploration of Mesoporous Siliceous Particle-Based High-Performance Size Exclusion Chromatography for the Quantitation of

- Biomacromolecular Polysaccharides. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 774–780.
- (39) Yan, Z.; Meng, H.; Shi, L.; Li, Z.; Shen, P. K. Synthesis of Mesoporous Hollow Carbon Hemispheres as Highly Efficient Pd Electrocatalyst Support for Ethanol Oxidation. *Electrochem. commun.* **2010**, *12*, 689–692.
- (40) Sun, J.; Bao, X. Textural Manipulation of Mesoporous Materials for Hosting of Metallic Nanocatalysts. *Chemistry* **2008**, *14*, 7478–7488.
- (41) Serrano, E.; Linares, N.; García-Martínez, J.; Berenguer, J. R. Sol-Gel Coordination Chemistry: Building Catalysts from the Bottom-Up. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 844–860.
- (42) Zhang, H.; Li, X. Novel Mesoporous Silica Materials with Hierarchically Ordered Nanochannel: Synthesis with the Assistance of Straight-Chain Alkanes and Application. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 1–16.
- (43) Sathe, T. R.; Agrawal, A.; Nie, S. Mesoporous Silica Beads Embedded with Semiconductor Quantum Dots and Iron Oxide Nanocrystals: Dual-Function Microcarriers for Optical Encoding and Magnetic Separation. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5627–5632.
- (44) Wark, M.; Wellmann, H.; Rathouský, J.; Zukal, A. *Impact of Zeolites and Other Porous Materials on the New Technologies at the Beginning of the New Millennium, Proceedings of the 2nd International FEZA (Federation of the European Zeolite Associations) Conference*; Studies in Surface Science and Catalysis; Elsevier, 2002; Vol. 142.
- (45) Wang, Y.; Zhao, Q.; Han, N.; Bai, L.; Li, J.; Liu, J.; Che, E.; Hu, L.; Zhang, Q.; Jiang, T.; *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11*, 313–327.
- (46) Balas, F.; Manzano, M.; Horcajada, P.; Vallet-Regí, M. Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8116–8117.
- (47) Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Materials in the Context of Drug Delivery Systems and Bone Tissue Engineering. *Chemistry* **2006**, *12*, 5934–5943.
- (48) Manzano, M.; Vallet-Regí, M. New Developments in Ordered Mesoporous Materials for Drug Delivery. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5593.
- (49) Karimi, M.; Mirshekari, H.; Aliakbari, M.; Sahandi-Zangabad, P.; Hamblin, M. R. Smart Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled-Release Drug Delivery. *Nanotechnol. Rev.* **2016**, *5*.
- (50) Giret, S.; WongChi Man, M.; Carcel, C. Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 13850–13865.
- (51) Vallet-Regí, M.; Ruiz-González, L.; Izquierdo-Barba, I.; González-Calbet, J. M. Revisiting Silica Based Ordered Mesoporous Materials: Medical Applications. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 26–31.
- (52) Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Colilla, M.; Manzano, M. Bone-Regenerative Bioceramic Implants with Drug and Protein Controlled Delivery Capability. *Prog. Solid State Chem.* **2008**, *36*, 163–191.
- (53) Vallet-Regí, M.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I. Bioactive Mesoporous Silicas as Controlled Delivery Systems: Application in Bone Tissue Regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 1–15.
- (54) Shadjou, N.; Hasanzadeh, M. Silica-Based Mesoporous Nanobiomaterials as Promoter of Bone Regeneration Process. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103*, 3703–3716.
- (55) Radu, D. R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E. W.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. A

- Polyamidoamine Dendrimer-Capped Mesoporous Silica Nanosphere-Based Gene Transfection Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216–13217.
- (56) Trewyn, B. G.; Nieweg, J. A.; Zhao, Y.; Lin, V. S.-Y. Biocompatible Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Morphologies for Animal Cell Membrane Penetration. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 23–29.
- (57) Martínez, Á.; Fuentes-Paniagua, E.; Baeza, A.; Sánchez-Nieves, J.; Cicuéndez, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; González, B.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles Decorated with Carbosilane Dendrons as New Non-Viral Oligonucleotide Delivery Carriers. *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 15651–15666.
- (58) Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y. Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288.
- (59) Chung, T.-H.; Wu, S.-H.; Yao, M.; Lu, C.-W.; Lin, Y.-S.; Hung, Y.; Mou, C.-Y.; Chen, Y.-C.; Huang, D.-M. The Effect of Surface Charge on the Uptake and Biological Function of Mesoporous Silica Nanoparticles in 3T3-L1 Cells and Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2959–2966.
- (60) Chiu, H.-Y.; Deng, W.; Engelke, H.; Helma, J.; Leonhardt, H.; Bein, T. Intracellular Chromobody Delivery by Mesoporous Silica Nanoparticles for Antigen Targeting and Visualization in Real Time. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25019.
- (61) Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8582–8594.
- (62) Yiu, H. H. P.; Wright, P. A. Enzymes Supported on Ordered Mesoporous Solids: A Special Case of an Inorganic–organic Hybrid. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690.
- (63) Ferdousi, M.; Pazouki, M.; Hessari, F. A.; Kazemzad, M. Simultaneous Control of Rod Length and Pore Diameter of SBA-15 for PPL Loading. *J. Porous Mater.* **2016**, *23*, 453–463.
- (64) Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311.
- (65) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W. A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843.
- (66) Inagaki, S.; Fukushima, Y.; Kuroda, K. Synthesis of Highly Ordered Mesoporous Materials from a Layered Polysilicate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 680.
- (67) Zhao, D.; Huo, Q.; Feng, J.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6024–6036.
- (68) Bagshaw, S. A.; Prouzet, E.; Pinnavaia, T. J. Templating of Mesoporous Molecular Sieves by Nonionic Polyethylene Oxide Surfactants. *Science* **1995**, *269*, 1242–1244.
- (69) Ryoo, R.; Kim, J. M.; Ko, C. H.; Shin, C. H. Disordered Molecular Sieve with Branched Mesoporous Channel Network. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17718–17721.
- (70) Inagaki, S.; Koiwai, A.; Suzuki, N.; Fukushima, Y.; Kuroda, K. Syntheses of Highly Ordered Mesoporous Materials, FSM-16, Derived from Kanemite. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1449–1457.
- (71) Corma, A. From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2373–2420.
- (72) Zhang, N.; Liu, S.; Jiang, L.; Luo, M.; Chi, C.; Ma, J. Adsorption of Strontium from Aqueous Solution by Silica Mesoporous SBA-15. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*

- 2015**, 303, 1671–1677.
- (73) Terasaki, O. *Mesoporous Crystals and Related Nano-Structured Materials*; Terasaki, O., Ed.; 1st ed.; Elsevier Science: Stockholm, Sweden, 2004.
- (74) Zhao, D.; Wan, Y.; Zhou, W. Mechanisms for Formation of Mesoporous Materials. In *Ordered Mesoporous Materials*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013; pp. 55–116.
- (75) Han, L.; Che, S. Anionic Surfactant Templated Mesoporous Silicas (AMs). *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 3740–3752.
- (76) Wei-Dong, X.; Yu-Xiang, Y.; Jing, C.; Zhaolun, W.; Xiang-Nong, L. Preparation of Mesoporous Silica Using Amphoteric Surfactant Potassium and Sodium N-Dodecyl Glycine Template. *J. Am. Ceram. Soc.* **2008**, 91, 1517–1521.
- (77) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525.
- (78) C.A. Miller, P. Neogi. *Interfacial Phenomena: Equilibrium and Dynamic Effects*. Surfactant Series. Vol. 17, Marcel Dekker.
- (79) C. J. Brinker and G.W. Scherer, *Sol-Gel Science, the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, London, 1990.
- (80) Kang, K.-K.; Rhee, H.-K. Synthesis and Characterization of Novel Mesoporous Silica with Large Wormhole-like Pores: Use of TBOS as Silicon Source. *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 84, 34–40.
- (81) Kim, J. M.; Stucky, G. D. Synthesis of Highly Ordered Mesoporous Silica Materials Using Sodium Silicate and Amphiphilic Block Copolymers. *Chem. Commun.* **2000**, 1159–1160.
- (82) Fulvio, P. F.; Pikus, S.; Jaroniec, M. Short-Time Synthesis of SBA-15 Using Various Silica Sources. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 287, 717–720.
- (83) Liu, J.; Yang, Q.; Zhao, X. S.; Zhang, L. Pore Size Control of Mesoporous Silicas from Mixtures of Sodium Silicate and TEOS. *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, 106, 62–67.
- (84) Schubert, U.; Husing, N. *Synthesis of Inorganic Materials*; 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012.
- (85) Ralph K. Iler. *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*. Wiley. ISBN: 978-0-471-02404-0.
- (86) Ying, J. Y.; Mehnert, C. P.; Wong, M. S. Synthesis and Applications of Supramolecular-Templated Mesoporous Materials. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, 38, 56–77.
- (87) Vartuli, J. C.; Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Chu, A. S.; McCullen, S. B.; Johnson, I. D.; Sheppard, E. W. Synthesis of Mesoporous Materials: Liquid-Crystal Templating versus Intercalation of Layered Silicates. *Chem. Mater.* **1994**, 6, 2070–2077.
- (88) Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. *Angew. Chemie* **2006**, 45, 3216–3251.
- (89) Chen, C.-Y.; Burkett, S. L.; Li, H.-X.; Davis, M. E. Studies on Mesoporous Materials II. Synthesis Mechanism of MCM-41. *Microporous Mater.* **1993**, 2, 27–34.
- (90) Firouzi, A.; Kumar, D.; Bull, L.; Besier, T.; Sieger, P.; Huo, Q.; Walker, S.; Zasadzinski, J.; Glinka, C.; Nicol, J.; *et al.* Cooperative Organization of Inorganic-Surfactant and Biomimetic Assemblies. *Science (80-.)*. **1995**, 267, 1138–1143.
- (91) Attard, G. S.; Glyde, J. C.; Göltner, C. G. Liquid-Crystalline Phases as Templates for the Synthesis of Mesoporous Silica. *Nature* **1995**, 378, 366–368.

- (92) Huo, Q.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Demuth, D. G.; Feng, P.; Gier, T. E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B. F. Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphasic Arrays. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1176–1191.
- (93) Tanev, P. T.; Pinnavaia, T. J. A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular Sieves. *Science* **1995**, *267*, 865–867.
- (94) Ojeda-López, R.; Pérez-Hermosillo, I. J.; Marcos Esparza-Schulz, J.; Cervantes-Urbe, A.; Domínguez-Ortiz, A. SBA-15 Materials: Calcination Temperature Influence on Textural Properties and Total Silanol Ratio. *Adsorption* **2015**, *21*, 659–669.
- (95) Keene, M. T. J.; Gougeon, R. D. M.; Denoyel, R.; Harris, R. K.; Rouquerol, J.; Llewellyn, P. L. Calcination of the MCM-41 Mesophase: Mechanism of Surfactant Thermal Degradation and Evolution of the Porosity. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 2843–2849.
- (96) Kruk, M.; Jaroniec, M.; Ko, C. H.; Ryoo, R. Characterization of the Porous Structure of SBA-15. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1961–1968.
- (97) Chen, C.-Y.; Li, H.-X.; Davis, M. E. Studies on Mesoporous Materials. *Microporous Mater.* **1993**, *2*, 17–26.
- (98) Liong, M.; Lu, J.; Kovoichich, M.; Xia, T.; Ruehm, S. G.; Nel, A. E.; Tamanoi, F.; Zink, J. I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano* **2008**, *2*, 889–896.
- (99) Colilla, M.; Martínez-Carmona, M.; Sánchez-Salcedo, S.; Ruiz-González, M. L.; González-Calbet, J. M.; Vallet-Regí, M. A Novel Zwitterionic Bioceramic with Dual Antibacterial Capability. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5639–5651.
- (100) Carcouët, C. C. M. C.; van de Put, M. W. P.; Mezari, B.; Magusin, P. C. M. M.; Laven, J.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Esteves, A. C. C.; Sommerdijk, N. A. J. M.; van Benthem, R. A. T. M.; *et al.* Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 1433–1438.
- (101) Tarn, D.; Ashley, C. E.; Xue, M.; Carnes, E. C.; Zink, J. I.; Brinker, C. J. Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 792–801.
- (102) Yang, Y.; Yu, C. Advances in Silica Based Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 317–332.
- (103) Wu, S.-H.; Mou, C.-Y.; Lin, H.-P. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3862–3875.
- (104) Tang, F.; Li, L.; Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
- (105) Grün, M.; Lauer, I.; Unger, K. K. The Synthesis of Micrometer- and Submicrometer-Size Spheres of Ordered Mesoporous Oxide MCM-41. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 254–257.
- (106) Yano, K.; Fukushima, Y. Particle Size Control of Mono-Dispersed Super-Microporous Silica Spheres. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2577–2581.
- (107) Liu, S.; Lu, L.; Yang, Z.; Cool, P.; Vansant, E. F. Further Investigations on the Modified Stöber Method for Spherical MCM-41. *Mater. Chem. Phys.* **2006**, *97*, 203–206.
- (108) Manzano, M.; Aina, V.; Areán, C. O.; Balas, F.; Cauda, V.; Colilla, M.; Delgado, M. R.; Vallet-Regí, M. Studies on MCM-41 Mesoporous Silica for Drug Delivery: Effect of Particle Morphology and Amine Functionalization. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 30–37.
- (109) Impéror-Clerc, M.; Davidson, P.; Davidson, A. Existence of a Microporous Corona

- around the Mesopores of Silica-Based SBA-15 Materials Templated by Triblock Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11925–11933.
- (110) Shah, P.; Ramaswamy, V. Thermal Stability of Mesoporous SBA-15 and Sn-SBA-15 Molecular Sieves: An in Situ HTXRD Study. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *114*, 270–280.
- (111) Galarneau, A.; Cambon, H.; Di Renzo, F.; Fajula, F. True Microporosity and Surface Area of Mesoporous SBA-15 Silicas as a Function of Synthesis Temperature. *Langmuir* **2001**, *17*, 8328–8335.
- (112) Ruthstein, S.; Frydman, V.; Goldfarb, D. Study of the Initial Formation Stages of the Mesoporous Material SBA-15 Using Spin-Labeled Block Co-Polymer Templates. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9016–9022.
- (113) Ryoo, R.; Ko, C. H.; Kruk, M.; Antochshuk, V.; Jaroniec, M. Block-Copolymer-Templated Ordered Mesoporous Silica: Array of Uniform Mesopores or Mesopore Micropore Network? *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11465–11471.
- (114) Zhao, D.; Sun, J.; Li, Q.; Stucky, G. D. Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 275–279.
- (115) Sayari, A.; Jaroniec, M. *Nanoporous Materials III: Proceedings of the 3rd International Symposium on Nanoporous Materials. Vol. 141*; Jaroniec, M., Ed.; Elsevier: Ottawa, Ontario, Canada, 2002.
- (116) Hoffmann, F.; Fröba, M. Vitalising Porous Inorganic Silica Networks with Organic Functions--PMOs and Related Hybrid Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 608–620.
- (117) Williams, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941–2953.
- (118) Woodward, J. I. M. There Is No Such Thing as a Biocompatible Material. **2002**, *35*, 303–328.
- (119) McLaughlin, J. K.; Chow, W. H.; Levy, L. S. Amorphous Silica: A Review of Health Effects from Inhalation Exposure with Particular Reference to Cancer. *J. Toxicol. Environ. Health* **1997**, *50*, 553–566.
- (120) Martin, K. R. The Chemistry of Silica and Its Potential Health Benefits. *J. Nutr. Heal. Aging* **2007**, *11*, 94–98.
- (121) Mayne, A. H.; Bayliss, S. C.; Barr, P.; Tobin, M.; Buckberry, L. D. Biologically Interfaced Porous Silicon Devices. *Phys. status solidi* **2000**, *182*, 505–513.
- (122) Ferreira Junior, R. S.; Anderlini, R. P.; Pimenta, D. C.; De Oliveira Orsi, R.; Barraviera, B.; Sant'Anna, O. A. New Nanostructured Silica Adjuvant (SBA-15) Employed to Produce Antivenom in Young Sheep Using *Crotalus Durissus Terrificus* and *Apis Mellifera* Venoms Detoxified by Cobalt-60. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* **2010**, *73*, 926–933.
- (123) Mody, K. T.; Popat, A.; Mahony, D.; Cavallaro, A. S.; Yu, C.; Mitter, N. Mesoporous Silica Nanoparticles as Antigen Carriers and Adjuvants for Vaccine Delivery. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5167–5179.
- (124) Carvalho, L. V.; Ruiz, R. de C.; Scaramuzzi, K.; Marengo, E. B.; Matos, J. R.; Tambourgi, D. V.; Fantini, M. C. A.; Sant'Anna, O. A. Immunological Parameters Related to the Adjuvant Effect of the Ordered Mesoporous Silica SBA-15. *Vaccine* **2010**, *28*, 7829–7836.
- (125) Mahony, D.; Cavallaro, A. S.; Stahr, F.; Mahony, T. J.; Qiao, S. Z.; Mitter, N. Mesoporous Silica Nanoparticles Act as a Self-Adjuvant for Ovalbumin Model Antigen in Mice. *Small* **2013**, *9*, 3138–3146.
- (126) Chen, Y.; Chen, H.; Shi, J. In Vivo Bio-Safety Evaluations and Diagnostic/Therapeutic Applications of Chemically Designed Mesoporous Silica

- Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3144–3176.
- (127) Bowman, B. J.; Ofner, C. M.; Schott, H.; Perrie, Y. Chapter 20: Colloidal Dispersions. In *Remington. Essentials of Pharmaceutics*; Felton, L., Ed.; Pharmaceutical Press: Albuquerque, NM, USA, 2013.
- (128) Lu, J.; Li, Z.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. In Vivo Tumor Suppression Efficacy of Mesoporous Silica Nanoparticles-Based Drug-Delivery System: Enhanced Efficacy by Folate Modification. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 212–220.
- (129) Anderson, S. I.; Downes, S.; Perry, C. C.; Caballero, A. M. Evaluation of the Osteoblast Response to a Silica Gel in Vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1998**, *9*, 731–735.
- (130) Gao, Y.; Yang, C.; Liu, X.; Ma, R.; Kong, D.; Shi, L. A Multifunctional Nanocarrier Based on Nanogated Mesoporous Silica for Enhanced Tumor-Specific Uptake and Intracellular Delivery. *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 251–259.
- (131) Asefa, T.; Tao, Z. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265–2284.
- (132) Hudson, S. P.; Padera, R. F.; Langer, R.; Kohane, D. S. The Biocompatibility of Mesoporous Silicates. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4045–4055.
- (133) Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Novel Insights into Ordered Mesoporous Materials for Biomedical Applications. **2009**, 159–196.
- (134) Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. In Vitro Stability of SBA-15 under Physiological Conditions. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *132*, 442–452.
- (135) Rolfe, B.; Mooney, J.; Zhang, B.; Jahnke, S.; Le, S.-J.; Chau, Y.-Q.; Huang, Q.; Wang, H.; Campbell, G.; Campbell, J. The Fibrotic Response to Implanted Biomaterials: Implications for Tissue Engineering. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*; Eberli, P. D., Ed.; In Tech: Brisbane, Australia, 2011; pp. 551–568.
- (136) Love, R. J.; Jones, K. S. Biomaterials, Fibrosis, and the Use of Drug Delivery Systems in Future Antifibrotic Strategies. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *37*, 259–281.
- (137) Kastellorizios, M.; Tipnis, N.; Burgess, D. J. Foreign Body Reaction to Subcutaneous Implants. In *Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions*; Lambris, D. J.; Ekdahl, N. K.; Ricklin, D.; Nilsson, B., Eds.; Springer International Publishing: Uppsala, Sweden, 2015; pp. 93–108.
- (138) LeGeros, R. Z.; Craig, R. G. Strategies to Affect Bone Remodeling: Osteointegration. *J. Bone Miner. Res.* **1993**, *8 Suppl 2*, S583–S596.
- (139) Díaz, A.; López, T.; Manjarrez, J.; Basaldella, E.; Martínez-Blanes, J. M.; Odriozola, J. A. Growth of Hydroxyapatite in a Biocompatible Mesoporous Ordered Silica. *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 173–179.
- (140) Lozano, D.; Manzano, M.; Doadrio, J. C.; Salinas, A. J.; Vallet-Regí, M.; Gómez-Barrena, E.; Esbrit, P. Osteostatin-Loaded Bioceramics Stimulate Osteoblastic Growth and Differentiation. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 797–803.
- (141) Trejo, C. G.; Lozano, D.; Manzano, M.; Doadrio, J. C.; Salinas, A. J.; Dapía, S.; Gómez-Barrena, E.; Vallet-Regí, M.; García-Honduvilla, N.; Buján, J.; *et al.* The Osteoinductive Properties of Mesoporous Silicate Coated with Osteostatin in a Rabbit Femur Cavity Defect Model. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8564–8573.
- (142) Lozano, D.; Trejo, C. G.; Gómez-Barrena, E.; Manzano, M.; Doadrio, J. C.; Salinas, A. J.; Vallet-Regí, M.; García-Honduvilla, N.; Esbrit, P.; Buján, J. Osteostatin-Loaded onto Mesoporous Ceramics Improves the Early Phase of Bone Regeneration in a Rabbit Osteopenia Model. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 2317–2323.

- (143) Manzano, M.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Drug Delivery from Ordered Mesoporous Matrices. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 1383–1400.
- (144) Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small* **2010**, *6*, 1952–1967.
- (145) Lin, Y.-S.; Tsai, C.-P.; Huang, H.-Y.; Kuo, C.-T.; Hung, Y.; Huang, D.-M.; Chen, Y.-C.; Mou, C.-Y. Well-Ordered Mesoporous Silica Nanoparticles as Cell Markers. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4570–4573.
- (146) Tao, Z.; Toms, B. B.; Goodisman, J.; Asefa, T. Mesoporosity and Functional Group Dependent Endocytosis and Cytotoxicity of Silica Nanomaterials. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1869–1880.
- (147) Slowing, I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792–14793.
- (148) Shahbazi, M.-A.; Herranz, B.; Santos, H. A. Nanostructured Porous Si-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Biomatter* **2012**, *2*, 296–312.
- (149) Huang, X.; Li, L.; Liu, T.; Hao, N.; Liu, H.; Chen, D.; Tang, F. The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility in Vivo. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5390–5399.
- (150) He, Q.; Zhang, Z.; Gao, F.; Li, Y.; Shi, J. In Vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small* **2011**, *7*, 271–280.
- (151) Mamaeva, V.; Rosenholm, J. M.; Bate-Eya, L. T.; Bergman, L.; Peuhu, E.; Duchanoy, A.; Fortelius, L. E.; Landor, S.; Toivola, D. M.; Linden, M.; *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Targeted Inhibition of Notch Signaling in Cancer. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1538–1546.
- (152) Reffitt, D. M.; Jugdaohsingh, R.; Thompson, R. P.; Powell, J. J. Silicic Acid: Its Gastrointestinal Uptake and Urinary Excretion in Man and Effects on Aluminium Excretion. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *76*, 141–147.
- (153) Trewyn, B. G.; Giri, S.; Slowing, I. I.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticle Based Controlled Release, Drug Delivery, and Biosensor Systems. *Chem. Commun.* **2007**, 3236–3245.
- (154) Baeza, A.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Advances in Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Stimuli-Responsive Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 319–337.
- (155) *Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers*; Saunders, Ed.; Elsevier: Philadelphia, USA, 2012.
- (156) Ribeiro, M.; Monteiro, F. J.; Ferraz, M. P. Infection of Orthopedic Implants with Emphasis on Bacterial Adhesion Process and Techniques Used in Studying Bacterial-Material Interactions. *Biomatter* **2012**, *2*, 176–194.
- (157) Nablo, B. J.; Rothrock, A. R.; Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide-Releasing Sol-Gels as Antibacterial Coatings for Orthopedic Implants. *Biomaterials* **2005**, *26*, 917–924.
- (158) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, K. R. and P. W., Ed.; 4th ed.; Garland Science: New York, USA, 2002.
- (159) Martínez Dubois, S. *Cirugía: Bases Del Conocimiento Quirúrgico Y Apoyo En Trauma*; 3rd ed.; Mcgraw-hill / interamericana de Mexico: Mexico, 2001.
- (160) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. The Significance of Infection Related to Orthopedic Devices and Issues of Antibiotic Resistance. *Biomaterials*

- 2006, 27, 2331–2339.
- (161) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, 34, 8533–8554.
- (162) Vila, J.; Soriano, A.; Mensa, J. [Molecular Basis of Microbial Adherence to Prosthetic Materials. Role of Biofilms in Prosthesis-Associated Infection]. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. clínica* **2008**, 26, 48–54.
- (163) Rodriguez, L. C.; Palmer, K.; Montagner, F.; Rodrigues, D. C. A Novel Chlorhexidine-Releasing Composite Bone Cement: Characterization of Antimicrobial Effectiveness and Cement Strength. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2015**, 30, 34–47.
- (164) Chadayammuri, V.; Hake, M.; Mauffrey, C. Innovative Strategies for the Management of Long Bone Infection: A Review of the Masquelet Technique. *Patient Saf. Surg.* **2015**, 9, 32.
- (165) Patzakis, M. J.; Zalavras, C. G. Chronic Posttraumatic Osteomyelitis and Infected Nonunion of the Tibia: Current Management Concepts. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2005**, 13, 417–427.
- (166) Sievert, D. M.; Ricks, P.; Edwards, J. R.; Schneider, A.; Patel, J.; Srinivasan, A.; Kallen, A.; Limbago, B.; Fridkin, S.; Facilities, for the N. H. S. N. (NHSN) T. and P. N. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2013**, 34, 1–14.
- (167) Simchi, A.; Tamjid, E.; Pishbin, F.; Boccaccini, A. R. Recent Progress in Inorganic and Composite Coatings with Bactericidal Capability for Orthopaedic Applications. *Nanomedicine* **2011**, 7, 22–39.
- (168) Tsukayama, D. T.; Estrada, R.; Gustilo, R. B. Infection after Total Hip Arthroplasty. A Study of the Treatment of One Hundred and Six Infections. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1996**, 78, 512–523.
- (169) Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, J. W. Biofilm Formation in Staphylococcus Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-Resistant Materials. *Biomaterials* **2012**, 33, 5967–5982.
- (170) Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Ehrlich, G. D.; Montanaro, L. Chapter 2: Biofilm-Based Implant Infections in Orthopaedics. In *Biofilm-based Healthcare-associated Infections: Volume I*; Donelli, G., Ed.; Springer International Publishing: Switzerland, 2015; pp. 29–46.
- (171) C C R de Carvalho, C. Biofilms: Recent Developments on an Old Battle. *Recent Pat. Biotechnol.* **2007**, 1, 49–57.
- (172) Vila, J.; Soriano, A.; Mensa, J. Bases Moleculares de La Adherencia Microbiana Sobre Los Materiales Protésicos. Papel de Las Biocapas En Las Infecciones Asociadas a Los Materiales Protésicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2008**, 26, 48–55.
- (173) Montanaro, L.; Campoccia, D.; Arciola, C. R. Advancements in Molecular Epidemiology of Implant Infections and Future Perspectives. *Biomaterials* **2007**, 28, 5155–5168.
- (174) Arciola, C. R.; Visai, L.; Testoni, F.; Arciola, S.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L. Concise Survey of Staphylococcus Aureus Virulence Factors That Promote Adhesion and Damage to Peri-Implant Tissues. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, 34, 771–780.
- (175) Montanaro, L.; Testoni, F.; Poggi, A.; Visai, L.; Speziale, P.; Arciola, C. R.

- Emerging Pathogenetic Mechanisms of the Implant-Related Osteomyelitis by Staphylococcus Aureus. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 781–788.
- (176) Went, P.; Krismer, M.; Frischhut, B. Recurrence of Infection after Revision of Infected Hip Arthroplasties. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1995**, *77*, 307–309.
- (177) Lange, J.; Troelsen, A.; Thomsen, R. W.; Søballe, K. Chronic Infections in Hip Arthroplasties: Comparing Risk of Reinfection Following One-Stage and Two-Stage Revision: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Epidemiol.* **2012**, *4*, 57–73.
- (178) Periasamy, S.; Joo, H.-S.; Duong, A. C.; Bach, T.-H. L.; Tan, V. Y.; Chatterjee, S. S.; Cheung, G. Y. C.; Otto, M. How Staphylococcus Aureus Biofilms Develop Their Characteristic Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 1281–1286.
- (179) Carpentier, B.; Cerf, O. Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food Industry. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *75*, 499–511.
- (180) Costerton, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-)*. **1999**, *284*, 1318–1322.
- (181) Golovlev, E. L. No Title. *Microbiology* **2002**, *71*, 249–254.
- (182) Chen, L.; Wen, Y. The Role of Bacterial Biofilm in Persistent Infections and Control Strategies. *Int. J. Oral Sci.* **2011**, *3*, 66–73.
- (183) Otto, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 175–188.
- (184) Costerton, J. W.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. Biofilm in Implant Infections: Its Production and Regulation. *Int. J. Artif. Organs* **2005**, *28*, 1062–1068.
- (185) Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, 2458–2461.
- (186) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Clinical Implications of Anti-Infective Biomaterials and Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8018–8029.
- (187) Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. Reducing Implant-Related Infections: Active Release Strategies. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 780–789.
- (188) Song, S.-W.; Hidajat, K.; Kawi, S. Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix-Drug Interactions. *Langmuir* **2005**, *21*, 9568–9575.
- (189) Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Bioceramics for Drug Delivery. *Acta Mater.* **2013**, *61*, 890–911.
- (190) Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Revisiting Bioceramics: Bone Regenerative and Local Drug Delivery Systems. *Prog. Solid State Chem.* **2012**, *40*, 17–30.
- (191) Vallet-Regí, M.; Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M. Structure and Functionalization of Mesoporous Bioceramics for Bone Tissue Regeneration and Local Drug Delivery. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **2012**, *370*, 1400–1421.
- (192) Legnoverde, M. S.; Simonetti, S.; Basaldella, E. I. Influence of pH on Cephalexin Adsorption onto SBA-15 Mesoporous Silica: Theoretical and Experimental Study. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *300*, 37–42.
- (193) Molina-Manso, D.; Manzano, M.; Doadrio, J. C.; Del Prado, G.; Ortiz-Pérez, A.; Vallet-Regí, M.; Gómez-Barrena, E.; Esteban, J. Usefulness of SBA-15 Mesoporous Ceramics as a Delivery System for Vancomycin, Rifampicin and Linezolid: A Preliminary Report. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *40*, 252–256.
- (194) Vallet-Regí, M.; Doadrio, J. C.; Doadrio, A. L.; Izquierdo-Barba, I.; Pérez-Pariente, J. Hexagonal Ordered Mesoporous Material as a Matrix for the

- Controlled Release of Amoxicillin. *Solid State Ionics* **2004**, *172*, 435–439.
- (195) Doadrio, A. L.; Sousa, E. M. B.; Doadrio, J. C.; Pérez Pariente, J.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Mesoporous SBA-15 HPLC Evaluation for Controlled Gentamicin Drug Delivery. *J. Control. Release* **2004**, *97*, 125–132.
- (196) Doadrio, J. C.; Sousa, E. M. B.; Izquierdo-Barba, I.; Doadrio, A. L.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. Functionalization of Mesoporous Materials with Long Alkyl Chains as a Strategy for Controlling Drug Delivery Pattern. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 462–466.
- (197) International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.
- (198) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- (199) Jenkins, V.; Catt, S.; Banerjee, S.; Gourley, C.; Montes, A.; Solis-Trapala, I.; Monson, K.; Fallowfield, L. Patients' and Oncologists' Views on the Treatment and Care of Advanced Ovarian Cancer in the UK: Results from the ADVOCATE Study. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 2264–2271.
- (200) Chabner, B. a; Roberts, T. G. Timeline: Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72.
- (201) Iwamoto, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. *Biol. Pharm. Bulliten* **2013**, *36*, 715–718.
- (202) Patil, Y. B.; Swaminathan, S. K.; Sadhukha, T.; Ma, L.; Panyam, J. The Use of Nanoparticle-Mediated Targeted Gene Silencing and Drug Delivery to Overcome Tumor Drug Resistance. *Biomaterials* **2010**, *31*, 358–365.
- (203) Wang, X.; Yang, L.; Chen, Z.; Shin, D. M. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA-A Cancer J. Clin.* **2008**, *58*, 97–110.
- (204) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat Nano* **2007**, *2*, 751–760.
- (205) Scheinberg, D. A.; Villa, C. H.; Escorcía, F. E.; McDevitt, M. R. Conscripts of the Infinite Armada: Systemic Cancer Therapy Using Nanomaterials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 266–276.
- (206) Srinivasan, M.; Rajabi, M.; Mousa, S. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2015**, *5*, 1690–1703.
- (207) Bregoli, L.; Movia, D.; Gavigan-Imedio, J. D.; Lysaght, J.; Reynolds, J.; Prina-Mello, A. Nanomedicine Applied to Translational Oncology: A Future Perspective on Cancer Treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 81–103.
- (208) Ábalos, C. Adhesión Bacteriana a Biomateriales. *Av. Odontoestomatol.* *21*, 347–353.
- (209) Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, *18*, 1049–1056.
- (210) Dunne, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 155–166.
- (211) Bustanji, Y.; Arciola, C. R.; Conti, M.; Mandello, E.; Montanaro, L.; Samorì, B. Dynamics of the Interaction between a Fibronectin Molecule and a Living Bacterium under Mechanical Force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13292–13297.
- (212) Arciola, C. R.; Bustanji, Y.; Conti, M.; Campoccia, D.; Baldassarri, L.; Samorì, B.; Montanaro, L. Staphylococcus Epidermidis-Fibronectin Binding and Its Inhibition

- by Heparin. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3013–3019.
- (213) Speziale, P.; Pietrocola, G.; Rindi, S.; Provenzano, M.; Provenza, G.; Di Poto, A.; Visai, L.; Arciola, C. R. Structural and Functional Role of Staphylococcus Aureus Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules of the Host. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 1337–1352.
- (214) Jiang, S.; Cao, Z. Ultralow-Fouling, Functionalizable, and Hydrolyzable Zwitterionic Materials and Their Derivatives for Biological Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 920–932.
- (215) Lin, W.; Zhang, J.; Wang, Z.; Chen, S. Development of Robust Biocompatible Silicone with High Resistance to Protein Adsorption and Bacterial Adhesion. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2053–2059.
- (216) Chen, S.; Li, L.; Zhao, C.; Zheng, J. Surface Hydration: Principles and Applications toward Low-Fouling/nonfouling Biomaterials. *Polymer (Guildf)*. **2010**, *51*, 5283–5293.
- (217) Zheng, J.; Li, L.; Tsao, H.-K.; Sheng, Y.-J.; Chen, S.; Jiang, S. Strong Repulsive Forces between Protein and Oligo (Ethylene Glycol) Self-Assembled Monolayers: A Molecular Simulation Study. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 158–166.
- (218) Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Zwitterionic Ceramics for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2016**, doi:10.1016/j.actbio.2016.02.027.
- (219) Sánchez-Salcedo, S.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Preventing Bacterial Adhesion on Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Bioprinting* **2016**, *2*, 20–34.
- (220) Dong, Z.; Mao, J.; Yang, M.; Wang, D.; Bo, S.; Ji, X. Phase Behavior of Poly(sulfobetaine Methacrylate)-Grafted Silica Nanoparticles and Their Stability in Protein Solutions. *Langmuir* **2011**, *27*, 15282–15291.
- (221) Zhang, L.; Xue, H.; Gao, C.; Carr, L.; Wang, J.; Chu, B.; Jiang, S. Imaging and Cell Targeting Characteristics of Magnetic Nanoparticles Modified by a Functionalizable Zwitterionic Polymer with Adhesive 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine Linkages. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6582–6588.
- (222) Xiao, W.; Lin, J.; Li, M.; Ma, Y.; Chen, Y.; Zhang, C.; Li, D.; Gu, H. Prolonged in Vivo Circulation Time by Zwitterionic Modification of Magnetite Nanoparticles for Blood Pool Contrast Agents. *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, *7*, 320–327.
- (223) Rosen, J. E.; Gu, F. X. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles with Cysteine: A Low-Fouling Zwitterionic Surface. *Langmuir* **2011**, *27*, 10507–10513.
- (224) Estephan, Z. G.; Hariri, H. H.; Schlenoff, J. B. One-Pot, Exchange-Free, Room-Temperature Synthesis of Sub-10 Nm Aqueous, Noninteracting, and Stable Zwitterated Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **2013**, *29*, 2572–2579.
- (225) Wei, H.; Insin, N.; Lee, J.; Han, H.-S.; Cordero, J. M.; Liu, W.; Bawendi, M. G. Compact Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biological Applications. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 22–25.
- (226) Zhou, Z.; Wang, L.; Chi, X.; Bao, J.; Yang, L.; Zhao, W.; Chen, Z.; Wang, X.; Chen, X.; Gao, J. Engineered Iron-Oxide-Based Nanoparticles as Enhanced T1 Contrast Agents for Efficient Tumor Imaging. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3287–3296.
- (227) Izquierdo-Barba, I.; Sánchez-Salcedo, S.; Colilla, M.; Feito, M. J.; Ramírez-Santillán, C.; Portolés, M. T.; Vallet-Regí, M. Inhibition of Bacterial Adhesion on Biocompatible Zwitterionic SBA-15 Mesoporous Materials. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2977–2985.
- (228) Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Sánchez-Salcedo, S.; Fierro, J. L. G.; Hueso, J. L.; Vallet-Regí, M. Synthesis and Characterization of Zwitterionic SBA-15 Nanostructured Materials. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6459–6466.

- (229) Sanchez-Salcedo, S.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Design and Preparation of Biocompatible Zwitterionic Hydroxyapatite. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1595–1606.
- (230) Foster, T. J. The Staphylococcus Aureus “superbug.” *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1693–1696.
- (231) Jin, Y. G.; Qiao, S. Z.; Xu, Z. P.; Yan, Z.; Huang, Y.; Diniz da Costa, J. C.; Lu, G. Q. Phosphonic Acid Functionalized Silicas for Intermediate Temperature Proton Conduction. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2363.
- (232) Arap, W.; Pasqualini, R.; Montalti, M.; Petrizza, L.; Prodi, L.; Rampazzo, E.; Zaccheroni, N.; Marchiò, S. Luminescent Silica Nanoparticles for Cancer Diagnosis. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2195–2211.
- (233) Rosenholm, J. M.; Linden, C. S. and M. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Therapeutic, Diagnostic and Targeted Action in Cancer Treatment. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 1166–1186.
- (234) Wu, X.; Wu, M.; Xiaojun Zhao, J. Recent Development of Silica Nanoparticles as Delivery Vectors for Cancer Imaging and Therapy. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 297–312.
- (235) Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles: Their Projection in Nanomedicine. *ISRN Mater. Sci.* **2012**, *2012*, 1–20.
- (236) Mekaru, H.; Lu, J.; Tamanoi, F. Development of Mesoporous Silica-Based Nanoparticles with Controlled Release Capability for Cancer Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *95*, 40–49.
- (237) Knežević, N. Ž.; Durand, J.-O. Targeted Treatment of Cancer with Nanotherapeutics Based on Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chempluschem* **2015**, *80*, 26–36.
- (238) Baeza, A.; Manzano, M.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Recent Advances in Mesoporous Silica Nanoparticles for Antitumor Therapy: Our Contribution. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 803–813.
- (239) Andersson, J.; Rosenholm, J.; Areva, S.; Lindén, M. Influences of Material Characteristics on Ibuprofen Drug Loading and Release Profiles from Ordered Micro- and Mesoporous Silica Matrices. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4160–4167.
- (240) Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 825–858.
- (241) Colilla, M.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Controlled Release Applications. In *The Sol-Gel Handbook*; Levy, D.; Zayat, M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015; pp. 1309–1344.
- (242) Langer, R. Drug Delivery and Targeting. *Nature* **1998**, *392*, 5–10.
- (243) Danhier, F.; Feron, O.; Preat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135–146.
- (244) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer-Chemotherapy - Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- (245) Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. The Present and Future Role of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment. *Lancet. Oncol.* **2004**, *5*, 497–508.
- (246) Pekkanen, A. M.; DeWitt, M. R.; Rylander, M. N. Nanoparticle Enhanced Optical Imaging and Phototherapy of Cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1677–

- 1712.
- (247) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. Photocontrolled Reversible Release of Guest Molecules from Coumarin-Modified Mesoporous Silica. *Nature* **2003**, *421*, 350–353.
- (248) Knežević, N. Ž.; Lin, V. S.-Y. A Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Photosensitive Cooperative Treatment of Cancer with a Mesopore-Capping Agent and Mesopore-Loaded Drug. *Nanoscale* **2013**, *5*, 1544.
- (249) Knežević, N. Ž.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Visible Light Responsive Controlled Release Delivery System. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2817–2819.
- (250) Tian, Y.; Kong, Y.; Li, X.; Wu, J.; Ko, A. C.-T.; Xing, M. Light- and pH-Activated Intracellular Drug Release from Polymeric Mesoporous Silica Nanoparticles. *Colloid. Surface. B.* **2015**, *134*, 147–155.
- (251) Duncan, R.; Izzo, L. Dendrimer Biocompatibility and Toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 2215–2237.
- (252) Brown, D. M.; Johnston, H.; Gubbins, E.; Stone, V. Cytotoxicity and Cytokine Release in Rat Hepatocytes, C3A Cells and Macrophages Exposed to Gold Nanoparticles--Effect of Biological Dispersion Media or Corona. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3416–3429.
- (253) Lee, E. S.; Gao, Z.; Bae, Y. H. Recent Progress in Tumor pH Targeting Nanotechnology. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 164–170.
- (254) Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V. To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135–146.
- (255) Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orłowski, J. Sensors and Regulators of Intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50–61.
- (256) Pizzolato, J. F.; Saltz, L. B. The Camptothecins. *Lancet* **2003**, *361*, 2235–2242.
- (257) Herben, V. M.; ten Bokkel Huinink, W. W.; Beijnen, J. H. Clinical Pharmacokinetics of Topotecan. *Clin. Pharmacokinet.* **1996**, *31*, 85–102.
- (258) Tardi, P.; Choice, E.; Masin, D.; Redelmeier, T.; Bally, M.; Madden, T. D. Liposomal Encapsulation of Topotecan Enhances Anticancer Efficacy in Murine and Human Xenograft Models. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3389–3393.
- (259) Franklin, W. A.; Waintrub, M.; Edwards, D.; Christensen, K.; Prendegast, P.; Woods, J.; Bunn, P. A.; Kolhouse, S. F. New Anti-Lung-Cancer Antibody Cluster 12 Reacts with Human Folate Receptors Present on Adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 89–95.
- (260) Chow, K. U.; Nowak, D.; Boehrer, S.; Ruthardt, M.; Knau, A.; Hoelzer, D.; Mitrou, P. S.; Weidmann, E. Synergistic Effects of Chemotherapeutic Drugs in Lymphoma Cells Are Associated with down-Regulation of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs), Prostate-Apoptosis-Response-Gene 4 (Par-4), Death-Associated Protein (Daxx) and with Enforced Caspase Activation. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 711–724.
- (261) Chen, M.; He, X.; Wang, K.; He, D.; Yang, S.; Qiu, P.; Chen, S. A pH-Responsive Polymer/mesoporous Silica Nano-Container Linked through an Acid Cleavable Linker for Intracellular Controlled Release and Tumor Therapy in Vivo. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 428–436.
- (262) Hong, C. E.; Park, A. K.; Lyu, S. Y. Synergistic Anticancer Effects of Lectin and Doxorubicin in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *394*, 225–235.
- (263) Abdullaev, F. I.; de Mejia, E. G. Antitumor Effect of Plant Lectins. *Nat. Toxins* **1997**, *5*, 157–163.

- (264) De Mejía, E. G.; Prisecaru, V. I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 425–445.
- (265) Puzstai, A.; Bardocz, S.; Ewen, S. W. B. Uses of Plant Lectins in Bioscience and Biomedicine. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1130–1140.
- (266) Peumans, W. J.; Verhaert, P.; Pfüller, U.; Van Damme, E. J. Isolation and Partial Characterization of a Small Chitin-Binding Lectin from Mistletoe (*Viscum Album*). *FEBS Lett.* **1996**, *396*, 261–265.
- (267) Lei, H.-Y.; Chang, C.-P. Lectin of Concanavalin A as an Anti-Hepatoma Therapeutic Agent. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 10.
- (268) Shi, Z.; Chen, J.; Li, C.; An, N.; Wang, Z.; Yang, S.; Huang, K.; Bao, J. Antitumor Effects of Concanavalin A and *Sophora Flavescens* Lectin in Vitro and in Vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 248–256.
- (269) Miyagi, T.; Takehara, T.; Tatsumi, T.; Suzuki, T.; Jinushi, M.; Kanazawa, Y.; Hiramatsu, N.; Kanto, T.; Tsuji, S.; Hori, M.; *et al.* Concanavalin a Injection Activates Intrahepatic Innate Immune Cells to Provoke an Antitumor Effect in Murine Liver. *Hepatology* **2004**, *40*, 1190–1196.
- (270) Kaneko, Y.; Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, *313*, 670–673.
- (271) Cho, J.; Kushiro, K.; Teramura, Y.; Takai, M. Lectin-Tagged Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Targeting of Sialic Acid on Living Cells. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2012–2018.
- (272) Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7548–7558.
- (273) Baeza, A.; Guisasaola, E.; Torres-Pardo, A.; Gonzalez-Calbet, J. M.; Melen, G. J.; Ramirez, M.; Vallet-Regí, M. Hybrid Enzyme-Polymeric Capsules/Mesoporous Silica Nanodevice for In Situ Cytotoxic Agent Generation. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 4625–4633.
- (274) Martínez-Carmona, M.; Colilla, M.; Vallet-Regí, M. Smart Mesoporous Nanomaterials for Antitumor Therapy. *Nanomaterials* **2015**, *5*, 1906–1937.
- (275) Martínez-Carmona, M.; Baeza, A.; Rodríguez-Milla, M. A.; García-Castro, J.; Vallet-Regí, M. Mesoporous Silica Nanoparticles Grafted with a Light-Responsive Protein Shell for Highly Cytotoxic Antitumoral Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5746–5752.
- (276) Pearce, O. M. T.; Läubli, H. Sialic Acids in Cancer Biology and Immunity. *Glycobiol.* **2016**, *26*, 111–128.
- (277) He, H.; Xiao, H.; Kuang, H.; Xie, Z.; Chen, X.; Jing, X.; Huang, Y. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticle-Oxaliplatin Conjugates for Improved Anticancer Drug Delivery. *Colloid. Surface. B* **2014**, *117*, 5–81.
- (278) Bellamy, L. J. *Advances in Infrared Group Frequencies. Published*; 3rd ed.; Chapman and Hall Ltd.: New York, 1975.
- (279) Editor, G.; Pearton, S.; Richeter, S.; Raehm, L.; Allen, B. L.; Keddie, M. B.; Star, A. Poly (Acrylic Acid)-Capped Lanthanide-Doped BaFCl Nanocrystals: Synthesis and Optical Properties. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1057.
- (280) Chen, T.; Yu, H.; Yang, N.; Wang, M.; Ding, C.; Fu, J. Graphene Quantum Dot-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles through an Acid-Cleavable Acetal Bond for Intracellular Drug Delivery and Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4979–4982.
- (281) Miyoshi, T.; Takegoshi, K.; Hikichi, K. High-Resolution Solid State ¹³C N.m.r. Study of the Interpolymer Interaction, Morphology and Chain Dynamics of the Poly(acrylic Acid)/poly(ethylene Oxide) Complex. *Polymer (Guildf)*. **1997**, *38*,

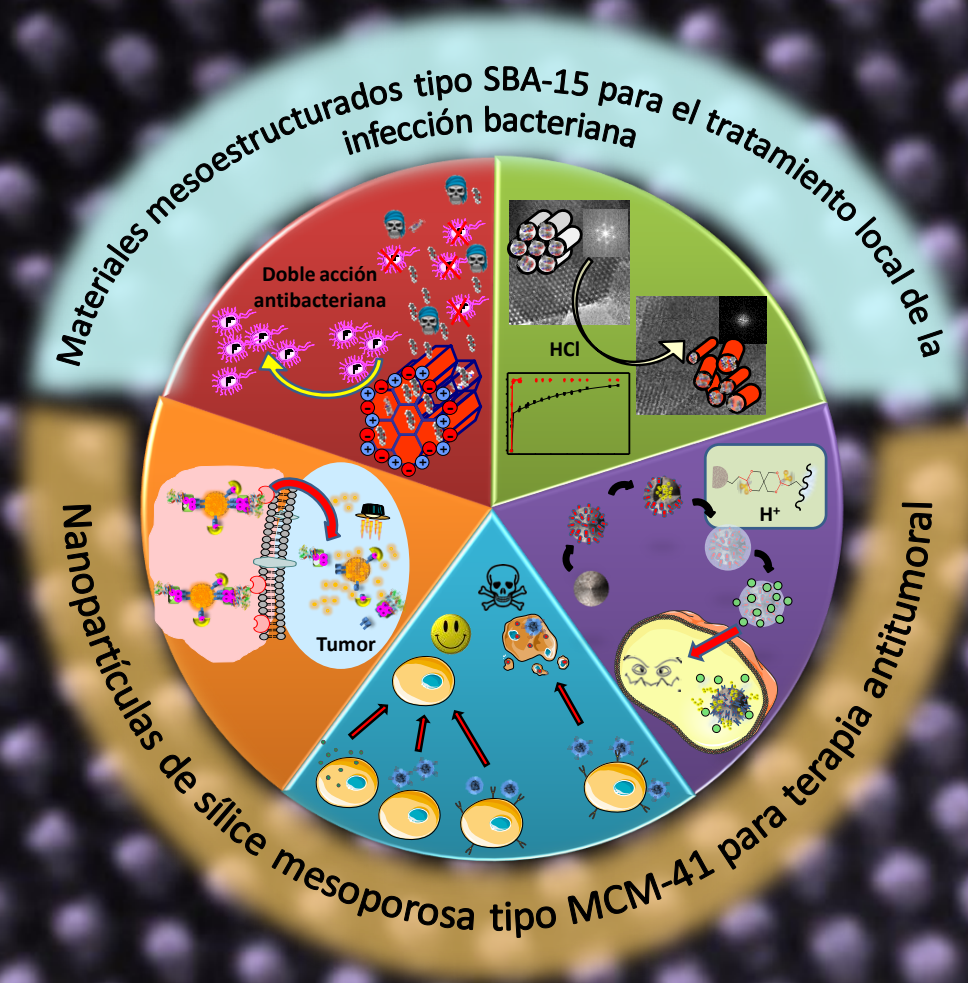
- 2315–2320.
- (282) Pávlov, I. P. *Física Del Estado Sólido*; 1st ed.; Rubiños: Madrid, Spain, 1985.
- (283) Atkins, P.; Paula, J. *Physical Chemistry*; 7th Edn.; Oxford University Press, 2002.
- (284) Unger, K. Structure of Porous Adsorbents. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1972**, *11*, 267–278.
- (285) Sing, K. S. W. Reporting Physisorption Data for Gas/solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2201–2218.
- (286) Morishige, K.; Ito, M. Capillary Condensation of Nitrogen in MCM-41 and SBA-15. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 8036.
- (287) Thommes, M. Physical Adsorption Characterization of Nanoporous Materials. *Chemie Ing. Tech.* **2010**, *82*, 1059–1073.
- (288) *Nanoporous Materials: Science and Engineering*; World Scientific, 2004; Vol. 22.
- (289) Faraldos, M.; Goberna, C. *Técnicas de Análisis Y Caracterización de Materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas*; Madrid, Spain, 2002.
- (290) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- (291) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380.
- (292) Neimark, A. V.; Ravikovitch, P. I.; Grün, M.; Schüth, F.; Unger, K. K. Pore Size Analysis of MCM-41 Type Adsorbents by Means of Nitrogen and Argon Adsorption. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *207*, 159–169.
- (293) Zeeh, M. H. H. M. B. *Métodos Espectroscópicos En Química Orgánica*; Síntesis, Ed.; 1999.
- (294) Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; 3rd Edit.; Springer Science, 2003.
- (295) Keattch, C. J. *An Introduction to Thermogravimetry*; Dollimore, D., Ed.; 2nd ed.; Heyden and Son: London, UK, 1975.
- (296) Beckhoff, B.; Kanngießer, B.; Langhoff, N.; Wedell, R.; Wolff, H. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*; Beckhoff, B.; Kanngießer, B.; Langhoff, N.; Wedell, R.; Wolff, H., Eds.; Springer: Berlin, German, 2006.
- (297) Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications*; Harcourt Brace Jovanovich, Ed.; Academic Press: London, UK, 1981.
- (298) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*; Dover Publications Inc.: Mineola, New York, 2000.
- (299) Manual de Bioseguridad En El Laboratorio. 3rd Ed. Organización Mundial de La Salud: Ginebra, Switzerland, 2005. ISBN 92 4 354650 3.
- (300) Wagner, V. E.; Koberstein, J. T.; Bryers, J. D. Protein and Bacterial Fouling Characteristics of Peptide and Antibody Decorated Surfaces of PEG-Poly(acrylic Acid) Co-Polymers. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2247–2263.
- (301) Boehm, M.; Olive, M.; True, A. L.; Crook, M. F.; San, H.; Qu, X.; Nabel, E. G. Bone Marrow-derived Immune Cells Regulate Vascular Disease through a p27(Kip1)-Dependent Mechanism. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 419–426.
- (302) Izquierdo-Barba, I.; García-Martín, J. M.; Álvarez, R.; Palmero, A.; Esteban, J.; Pérez-Jorge, C.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Nanocolumnar Coatings with Selective Behavior towards Osteoblast and Staphylococcus Aureus Proliferation. *Acta Biomater.* **2015**, *15*, 20–28.

La nanomedicina es una disciplina científica que ha experimentado un gran apogeo en los últimos años, lo que ha permitido mejorar la calidad y la expectativa de vida en la sociedad contemporánea. De entre todos los biomateriales empleados en nanomedicina esta Tesis Doctoral se ha centrado en los Nanomateriales de Sílice Mesoestructurada (NSM) para la prevención y/o el tratamiento de dos patologías diferentes, la infección bacteriana ósea y el cáncer, ambas de gran prevalencia e impacto sanitario y económico en la sociedad actual. Para ellos e han diseñado dos tipos de materiales:

1) Nuevos NSM zwitteriónicos tipo SBA-15 como implantes óseos capaces de prevenir la infección bacteriana, factor clave que en muchos casos provoca el rechazo del biomaterial.

2) Nuevos nanodispositivos inteligentes tipo MCM-41 capaces de dirigirse preferentemente a células tumorales y de liberar el citotóxico confinado en sus poros en respuesta a un estímulo externo o interno.

Cada sistema ha sido evaluado frente a líneas bacterianas o celulares adecuadas obteniendo en todos los casos resultados muy prometedores.



MONCLOA
campus de
Excelencia
Internacional

ciber-66n

i+12
Instituto de Investigación
Hospital 12 de Octubre

