

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Nanopartículas mesoporosas de sílice para el tratamiento de  
la infección ósea: optimización de terapias personalizadas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Anna Aguilar Colomer**

Directores

**Isabel Izquierdo Barba**  
**Monsterrat Colilla Nieto**  
**Jaime Esteban Moreno**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

Nanopartículas mesoporosas de sílice para el tratamiento de la infección ósea: optimización de terapias personalizadas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Anna Aguilar Colomer

DIRECTOR

Isabel Izquierdo Barba  
Monsterrat Colilla Nieto  
Jaime Esteban Moreno





# **Nanopartículas mesoporosas de sílice para el tratamiento de la infección ósea: optimización de terapias personalizadas**

**Anna Aguilar Colomer**

**Directores:**

**Isabel Izquierdo Barba (UCM)  
Montserrat Colilla Nieto (UCM)  
Jaime Esteban Moreno (FJD)**

---

**Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Complutense de Madrid**

*Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas  
UD de Química Inorgánica y Bioinorgánica*

**Facultad de Farmacia  
Enero 2022**









U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. \_\_\_\_\_,  
estudiante en el Programa de Doctorado \_\_\_\_\_,  
de la Facultad de \_\_\_\_\_ de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

\_\_\_\_\_

y dirigida por: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Fdo.: \_\_\_\_\_

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



# AGRADECIMIENTOS

A finales del 2016, Jaime, que por aquel entonces había sido mi director de TFM, me animó a presentarme a una plaza predoctoral que ofertaba el grupo de la UCM con los que habíamos estado colaborando durante el máster... Así empezaban los agradecimientos que había empezado a escribir, pero me di cuenta que no era posible escribir lo agradecida que estoy con toda la gente a la que he conocido durante la tesis por aportarme tantas cosas buenas, muchas de ellas académicas pero sobre todo personales. Necesitaría un libro solo de agradecimientos para poder daros las gracias individualmente, así que he decidido hacer este apartado un poco más corto con la esperanza de poder daros las gracias personalmente porque es como realmente me gustaría y espero hacerlo. Aún así, no quiero perder la oportunidad de agradecer:

A Marita, por la confianza depositada en mi para realizar una pequeña parte del proyecto Verdi, gracias al cual ha sido posible esta tesis.

Por supuesto, a mis directores Isabel, Montse y Jaime por vuestra incansable ayuda para poder sacar adelante todo el trabajo. Gracias de nuevo, Jaime, por animarme a presentarme a una de las plazas y haber vivido esta experiencia.

A las webs BioRender.com y Servier Medical ART: SMART por facilitar tantos iconos relacionados con la ciencia, lo cual ha permitido crear un gran número de figuras en esta tesis doctoral.

A mis compañeros de la Fundación Jiménez Díaz: facultativos, técnicos, residentes, investigadores y alumnos, especialmente a John, David, África, Ester, Marcos y Antonio, por hacer como si no pasase el tiempo cuando estamos juntos.

A mis compañeros de la facultad de farmacia/medicina/206, por hacer posible este proyecto y por prestar vuestra ayuda cuando la he necesitado.

A Ana, Vicky, Juan, Rocío, Carla, Miguel, Patricia, Víctor, Javi, Elena, Manu y Clara porque no me imagino la tesis sin vosotros, porque siempre se puede contar con vosotros y porque no sé cómo lo hacéis pero sois capaces de transformar un momento de frustración en risas y despreocupación.

A Adrián y David, porque a pesar de vuestra breve estancia en el grupo, nunca hemos perdimos el contacto.

A mis compañeros de piso, Guille y Pili, por mantener sana mi salud mental al llegar a casa cada día.

A Isi, por apostar por la relación, por tu paciencia infinita, por los viajes de ida y vuelta, por llevarme y recogerme de las estaciones de bus y tren todas las veces. Gracias por hacerme feliz.

A Mireia y a mis padres, por estar siempre ahí, por cuidarme, por ayudarme, por animarme y sobre todo por confiar en mí.

Porque realizar una tesis doctoral no es tarea fácil y sin todos vosotros no lo hubiese conseguido.  
Por muchos más momentos juntos,

**GRACIAS**

---

# ABREVIATURAS

**AC:** N-acetilcisteína

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**APTES:** 3-(Aminopropil)triethoxisilano

**AQE:** Análisis químico elemental

**BET:** Brunauer-Emmett-Teller

**CaP:** Fosfato de calcio

**CTAB:** Bromuro de cetiltrimetilamonio

**D<sub>H</sub>:** Tamaño hidrodinámico

**DLS:** Dispersión dinámica de luz

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**D<sub>p</sub>:** Diámetro poro

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**EDS:** Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

**EPR:** efecto de retención y permeabilidad aumentada

**EPS:** Sustancias poliméricas extracelulares

**EtOH:** Etanol

**FCS:** Suero fetal bovino

**FITC:** Sal sódica de fluoresceína

**FTIR:** Microscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier

**Gel:** Gelatina

**GM:** Sulfato de gentamicina

**HA:** Hidroxiapatita

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**ICTS:** Instalación Científico Tecnológica Singular

**LVX:** Levofloxacino

**MGBs:** Vidrios mesoporosos bioactivos

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria

**MSN:** Nanopartícula mesoporosa de sílice

**MSN\*:** Nanopartículas mesoporosas de sílice con marcaje de fluoresceína

**MSNs:** término general que engloba los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub>

**MSN-COOH:** Nanopartículas mesoporosa de sílice con grupos carboxilo

**MSN-NH<sub>2</sub>:** Nanopartículas mesoporosa de sílice con grupos amino

**MSN-LVX/MSN-L:** Nanopartículas cargada con LVX

**MSN-GM:** Nanopartículas cargada con GM

**MSN-RIF:** Nanopartículas cargada con RIF

**MSN@Gels:** Conjunto de materiales MSN con recubrimiento de gelatina

**MSN@HA:** Conjunto de materiales MSN que presentan HA / Nanopartícula recubierta con nanocristales de HA

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PTA:** Ácido fosfotúngstico

**RIF:** Rifampicina

***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*

**S<sub>BET</sub>:** superficie específica

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión

**TEOS:** Tetraetil ortosilicato

**TESPA:** 3-(trietoxisilil)propilsuccínico

**TG:** Análisis termogravimétrico

**TSA:** Medio agar triptona soja

**TSB:** Medio triptona soja

**UV-Vis:** Ultravioleta visible

**V<sub>p</sub>:** Volumen de poro

**XRD:** Difracción de rayos X

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract.....	3
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Infección de prótesis articular ósea .....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Etiopatogenia de la infección protésica .....	6
1.1.2. Tratamiento de la infección protésica .....	9
<b>1.2 Nanomateriales en el tratamiento de la infección .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) .....</b>	<b>14</b>
1.3.1. Síntesis y propiedades de las MSNs .....	14
1.3.2. Aplicaciones de las MSNs .....	19
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Síntesis de <i>nanoantibióticos</i> basados en nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN)25</b>	<b>25</b>
3.1.1 Síntesis de las nanoplataformas (MSN).....	25
3.1.2 Funcionalización superficial de las MSN con grupos amino .....	26
3.1.3 Carga con los antibióticos levofloxacino, gentamicina y rifampicina .....	27
3.1.4 Diseño de los nanosistemas MSN@Gels.....	29
3.1.5 Diseño del nanosistema MSN@HA .....	31
<b>3.2 Caracterización físico-química de los nanosistemas .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Estudio de estabilidad <i>in vitro</i> de los nanosistemas .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de los diferentes fármacos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5 Estudios de efectividad antimicrobiana en biofilms de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>39</b>
3.5.1 Estudio de las cargas antibióticas liberadas .....	39
3.5.2 Estudio directo de los <i>nanoantibióticos</i> sobre biofilms preformados .....	43
<b>3.6 Estudios celulares <i>in vitro</i> con células preosteoblásticas murinas.....</b>	<b>45</b>
3.6.1 Estudios de biocompatibilidad .....	45
3.6.2 Estudios de diferenciación celular.....	46
<b>3.7 Análisis estadísticos.....</b>	<b>48</b>
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 MSNs como nanosistemas dosificadores de antibióticos.....</b>	<b>49</b>
4.1.1 Caracterización de los nanosistemas basados en MSN .....	50
4.1.2 Evaluación de la estabilidad <i>in vitro</i> en condiciones fisiológicas .....	55
4.1.3 Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de los antibióticos .....	56

4.1.4 Estudios de efectividad antimicrobiana .....	60
4.1.5 Estudios de la biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	68
<b>4.2 MSNs como nanosistemas multiterapia (MSN@Gels) .....</b>	<b>70</b>
4.2.1 Caracterización de los nanosistemas MSN@Gels .....	71
4.2.2 Evaluación de la estabilidad <i>in vitro</i> en condiciones fisiológicas .....	73
4.2.3 Ensayos de liberación <i>in vitro</i> .....	75
4.2.4 Estudios de efectividad antibiofilm .....	78
4.2.5 Estudios de la biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	83
<b>4.3 MSNs como nanosistemas multifuncionales (MSN@HA) .....</b>	<b>86</b>
4.3.1 Caracterización de los materiales MSN@HA .....	87
4.3.2 Efecto sobre las células preosteoblásticas .....	91
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo I. Productos comerciales .....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo II. Técnicas de caracterización .....</b>	<b>100</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>105</b>

# Resumen

Esta Tesis Doctoral se centra en el diseño, síntesis, caracterización y evaluación biológica de *nanoantibióticos* basados en nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) para el tratamiento de la infección bacteriana ósea como una alternativa prometedora frente a las terapias actuales.

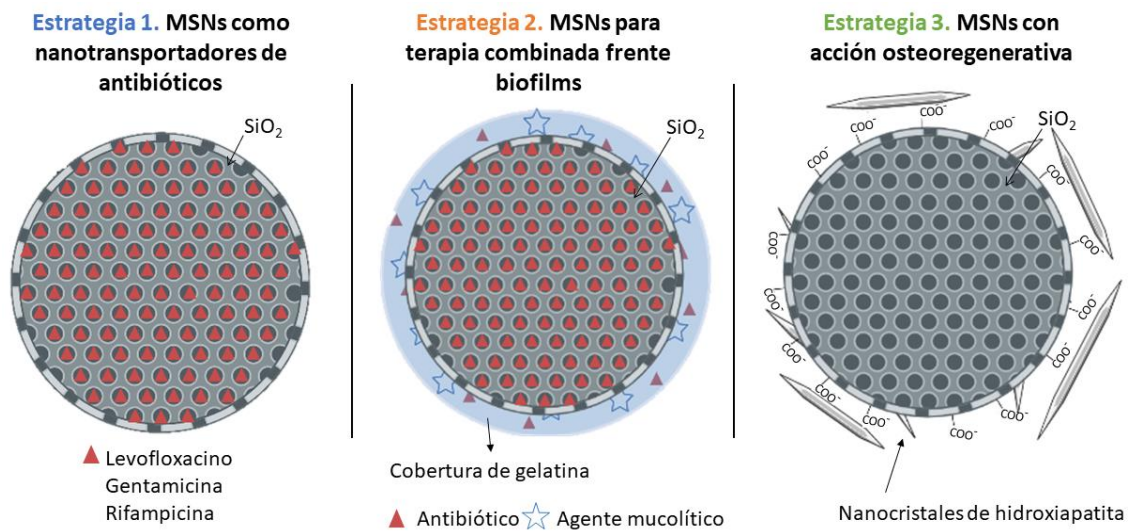
La infección ósea es una enfermedad grave que presenta serias implicaciones clínicas y socioeconómicas. Una de las dificultades para conseguir un tratamiento eficaz frente a esta patología radica en la presencia de bacterias formando *biofilms*, lo cual compromete el tratamiento antibiótico y requiere de tratamientos quirúrgicos y farmacológicos muy agresivos que pueden afectar la calidad de vida del paciente. Además, el uso incorrecto de los antibióticos durante el tratamiento favorece la aparición de bacterias multiresistentes. Por ello, es necesario desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento eficiente y local de la infección ósea capaces de solventar las limitaciones presentes en los tratamientos convencionales.

La nanotecnología ha entrado en este escenario proporcionando numerosas herramientas para el desarrollo de nanotransportadores innovadores capaces de albergar, proteger, transportar y liberar localmente diferentes agentes antimicrobianos, reduciendo considerablemente los efectos secundarios asociados a la administración masiva y sistémica de antibióticos. Estos nanosistemas, denominados *nanoantibióticos* en la presente Tesis Doctoral, constituyen unas innovadoras y prometedoras nanomedicinas para aumentar el arsenal terapéutico frente a esta patología. Dichos *nanoantibióticos* se basan en el uso de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs), las cuales, en los últimos años han recibido un interés creciente en el tratamiento de otras patologías óseas como el cáncer y la osteoporosis. Sus características intrínsecas, como sus propiedades estructurales y texturales, así como su superficie fácilmente funcionalizable, les permiten cargar y liberar de forma controlada agentes antimicrobianos de muy diversa naturaleza, y les convierte en nanoplataformas ideales para el desarrollo de nanoterapias avanzadas. Dichas nanoplataformas presentan además la peculiaridad de ser altamente versátiles, estables en medios biológicos, biocompatibles y fácilmente excretables.

En esta Tesis Doctoral, se han utilizado las MSNs como punto de partida en el desarrollo de tres estrategias para el tratamiento de dichas infecciones óseas: 1) En primer lugar se ha demostrado la capacidad de las MSNs para cargar y liberar antibióticos de diferentes familias,

demostrando así la versatilidad de estos nanosistemas como dosificadores de fármacos; 2) En segundo lugar se han desarrollado MSNs como nanosistemas multicomponente capaces de albergar y liberar la combinación de un antibiótico y un agente mucolítico para terapia combinada contra la infección; 3) En tercer lugar, se han desarrollado MSNs con capacidad multifunción, las cuales, al mismo tiempo que combaten la infección permiten promover la regeneración ósea del tejido dañado durante el proceso infeccioso.

La **Fig. 1** ilustra de forma esquemática las tres estrategias desarrolladas en esta Tesis doctoral.



**Fig. 1.** Representación esquemática de las tres estrategias desarrolladas en la presente Tesis Doctoral a partir de MSNs para el tratamiento de la infección ósea.

La presente Tesis Doctoral se ha dividido en cinco apartados: *i) Introducción, ii) Objetivos, iii) Materiales y Métodos, iv) Resultados y discusión y v) Conclusiones*, así como dos *Anexos* y la *Bibliografía* utilizada.

# Abstract

This PhD Thesis focuses on the design, synthesis, characterization and biological evaluation of *nanoantibiotics* based on mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for the treatment of bacterial bone infection as a promising alternative to current therapies.

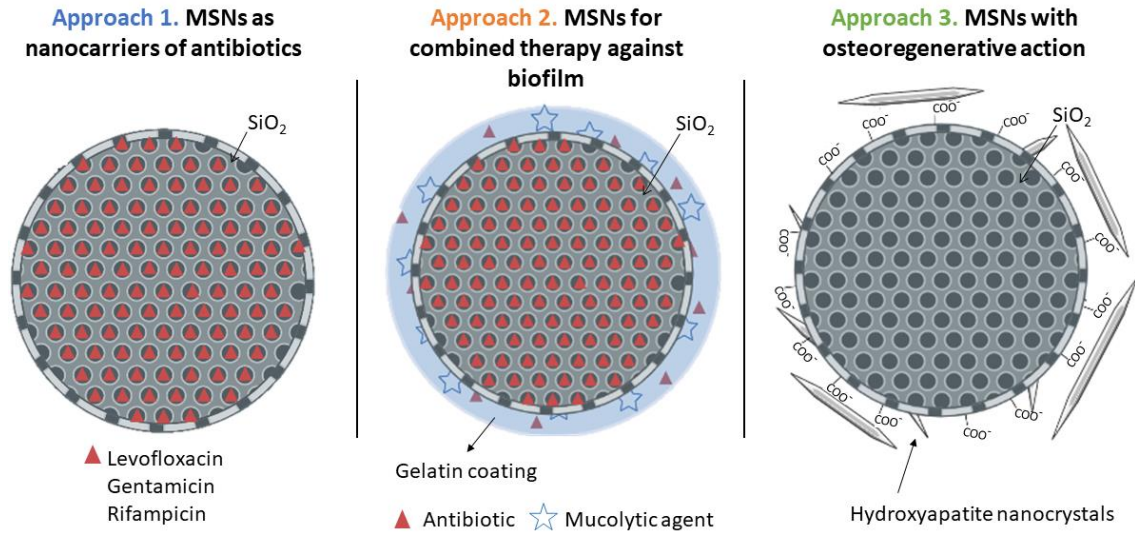
Bone infection is a serious disease that has serious clinical and socioeconomic implications. One of the difficulties in achieving effective treatment for this pathology lies in the presence of bacteria forming *biofilms*, which compromises antibiotic treatment and requires very aggressive surgical and pharmacological treatments that can affect the patient's quality of life. In addition, the incorrect use of antibiotics during treatment favors the appearance of multi-resistant bacteria. Therefore, it is necessary to develop new alternatives for the efficient and local treatment of bone infection capable of solving the limitations present in conventional treatments.

Nanotechnology has entered this scenario by providing numerous tools for the development of innovative nanocarriers capable of harboring, protecting, transporting and locally releasing different antimicrobial agents, considerably reducing the side effects associated with the massive and systemic administration of antibiotics. These nanosystems, called *nanoantibiotics* in this PhD Thesis, constitute innovative and promising nanomedicines to increase the therapeutic arsenal against this pathology. Such *nanoantibiotics* are based on the use of mesoporous silica nanoparticles (MSNs), which, in recent years, have received increasing interest in the treatment of other bone pathologies such as cancer and osteoporosis. Their intrinsic characteristics, such as their structural and textural properties, as well as their easily functionalizable surface, allow them to load and release antimicrobial agents of a very diverse nature in a controlled manner, and make them ideal nanoplatforms for the development of advanced nanotherapies. Such nanoplatforms also have the peculiarity of being highly versatile, stable in biological media, biocompatible and easily excretable.

In this PhD Thesis, MSNs have been used as a starting point in the development of three strategies for the treatment of these bone infections: 1) First, the ability of MSNs to load and release antibiotics from different families has been demonstrated, thus demonstrating the versatility of these nanosystems as drug dispensers; 2) Secondly, MSNs have been developed as multicomponent nanosystems capable of harboring and releasing the combination of an antibiotic and a mucolytic agent for combined therapy against infection; 3) Third, MSNs with

multifunction capacity have been developed, which, at the same time that they fight infection, allow promoting bone regeneration of damaged tissue during the infectious process.

**Fig. 1** schematically illustrates the three strategies developed in this PhD thesis.



**Fig. 1.** Schematic representation of the three strategies developed in this PhD Thesis from MSNs for the treatment of bone infection.

This PhD Thesis has been divided into five sections: *i) Introduction, ii) Objectives, iii) Materials and Methods, iv) Results and discussion* and *v) Conclusions*, as well as two *Annexes* and the *Bibliography* used.

# 1. Introducción

## 1.1 Infección de prótesis articular ósea

El progresivo envejecimiento de la población ha creado una creciente demanda por mejorar la calidad de vida de estas personas [1]. Un ejemplo de ello es el elevado número de pacientes portadores de una prótesis articular en los países desarrollados en los últimos años. Sólo en España se estima que el número de reemplazos de rodilla, cadera y en menor grado, hombro y otras articulaciones es de 30000/año, y se estima que el número de cirugías relacionadas con la inserción de una prótesis de rodilla se verá multiplicado por siete en el año 2030 [2], [3]. Una de las principales problemáticas asociadas a la utilización de implantes es la infección. Las infecciones relacionadas con dispositivos ortopédicos, constituyen una de las complicaciones más devastadoras a la que se enfrenta la sociedad en la actualidad [4]. Las prótesis ortopédicas son susceptibles a una infección debido a la presencia de una superficie donde las bacterias pueden adherirse y un ambiente inflamado inducido por la cirugía, creando un nicho ideal para el desarrollo de una infección bacteriana [5], [6]. Actualmente, las tasas de infección se encuentran entre el 1-2% a pesar de los grandes avances en las medidas profilácticas y las técnicas de cirugía aséptica [7]. Además, la tasa de infección recurrente después de la cirugía de revisión sigue siendo muy alta con tasas de hasta el 33% [8].

La infección protésica articular incluye procesos inflamatorios debidos al reclutamiento de una amplia gama de tipos de células que incluyen macrófagos, fibroblastos, células gigantes, neutrófilos, linfocitos y, principalmente osteoclastos, como consecuencia de la infección. Este proceso puede derivar en la destrucción del hueso, proceso conocido como osteolisis [9], [10]. [11].

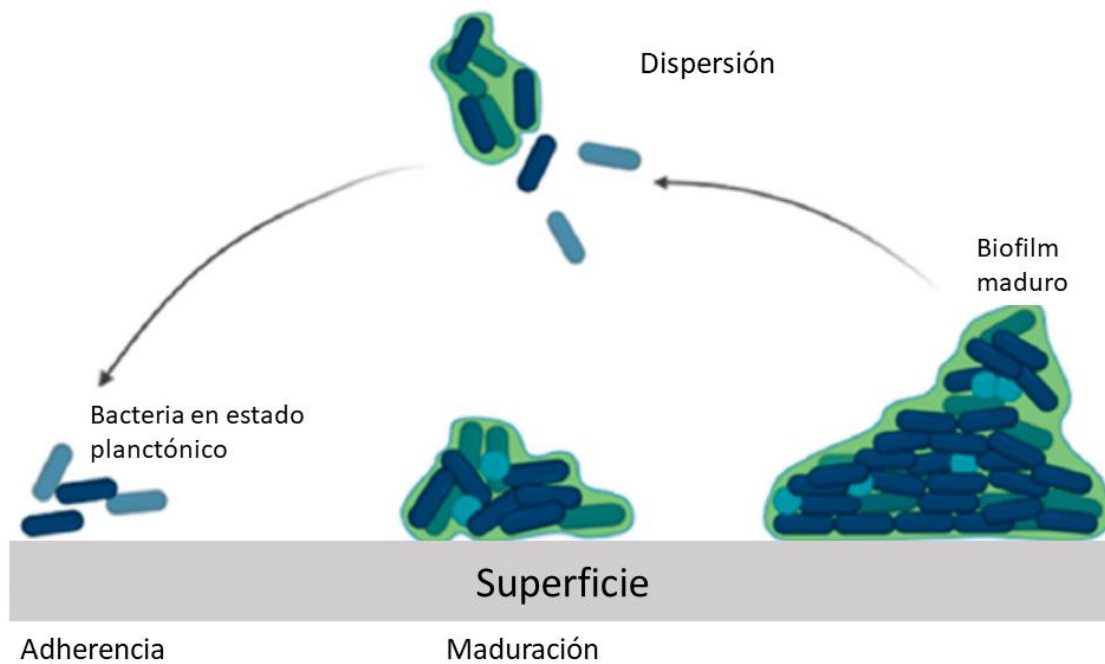
Las infecciones óseas asociadas a implantes se clasifican en agudas tempranas (<3 meses), retardadas o crónicas (3-24 meses) y agudas tardías (>24 meses) según el tiempo de aparición de los síntomas tras la intervención [12]. Una infección ósea se caracteriza por una acumulación de pus, compuesto éste por células del sistema inmune, vivas y muertas, así como bacterias, tejido muerto y agua en la zona infectada, como consecuencia de una intensa respuesta inmune del hospedador. Este pus provoca un aumento en la presión intramedular y congestión vascular, que puede provocar la rotura de la corteza ósea donde se acumula el pus. Si la presión no cesa, puede producirse la rotura de las estructuras que limitan el hueso y la infección puede propagarse al tejido contiguo, incluso, puede llegar a la superficie de la piel [12].

### 1.1.1. Etiopatogenia de la infección protésica

La infección ósea está producida principalmente por las bacterias que forman parte de nuestro microbioma de la piel, y que llegan hasta el hueso por tres vías de diseminación diferentes, que son hematogena, contigua o por contacto directo. Los microorganismos más frecuentemente aislados son bacterias Gram-positivas, entre la que destaca la especie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), causante de hasta el 75% de los casos de infección protésica, involucrando en muchos casos cepas resistentes a meticilina (MRSA, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, de sus siglas en inglés) [13] [14]. Sin embargo, en la última década se ha observado un aumento en los casos de infección ósea causados por bacterias Gram-negativas, representado hasta en un 23% de los casos. Los más habituales son *Escherichia coli* (*E. coli*) o bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* [15], [16]. Incluso se han llegado a detectar infecciones provocadas por hongos en un 1.5 % de los casos [16], siendo *Candida spp* la especie predominante [17].

Aunque la mayoría de las infecciones suelen estar provocadas por un único tipo de bacteria, en un 20% de los casos se producen infecciones polimicrobianas, donde se aíslan dos o más patógenos que pueden ser Gram-positivos y Gram-negativos [16].

Uno de los factores de virulencia más destacados de los microorganismos causantes de una infección ósea es su capacidad para formar biopelículas o biofilms [18]. Los biofilms se definen como poblaciones bacterianas embebidas en una matriz, que se adhieren entre sí y/o a superficies [19]. Ésta matriz, producida principalmente por los mismos organismos que lo componen, puede representar más del 90% del biofilm y está compuesta por un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substance*, de sus siglas en inglés), como exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras macromoléculas [20][21]. La matriz ejerce funciones como la adhesión y agregación de las células bacterianas, actúa como barrera protectora frente a agentes antimicrobianos, propicia la retención de agua, facilita la cohesión del biofilm, interviene en la absorción de compuestos orgánicos e inorgánicos como nutrientes, favorece el intercambio genético entre las bacterias del biofilm y es una fuente importante de carbono [21].



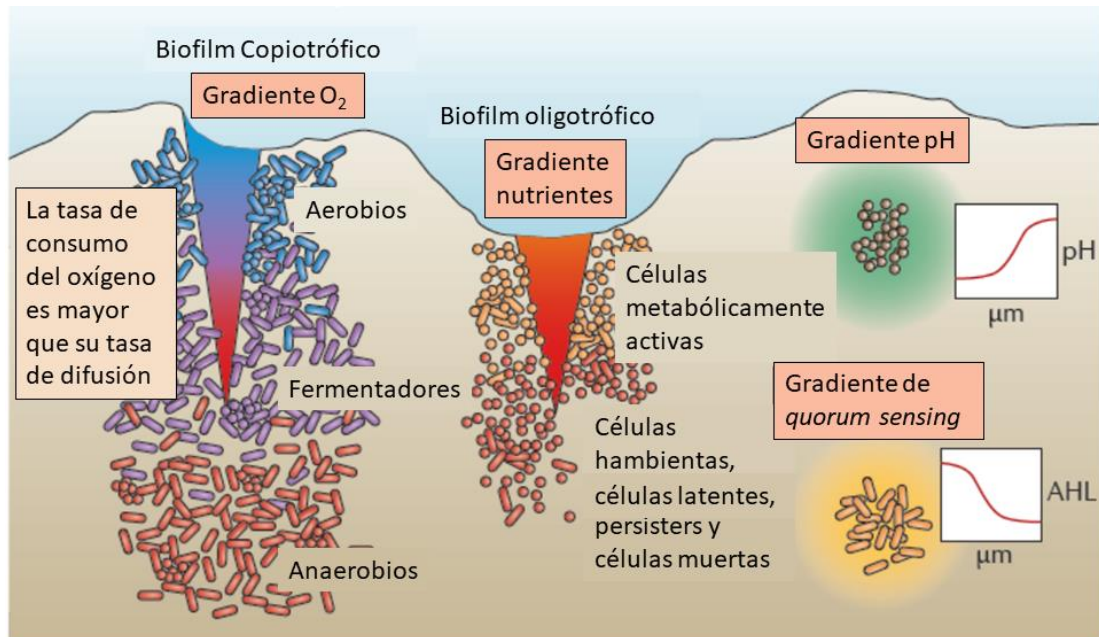
**Fig. 1.1.** Figura esquemática de las diferentes etapas de formación de un biofilm. (Adaptado de la referencia [22]).

Un biofilm se desarrolla en 3 etapas:

- a. La **adhesión** de los microorganismos a la superficie del implante empieza por el contacto directo entre las células libres y una superficie (**Fig. 1.1**). En esta primera etapa, la unión inicialmente es reversible, y solo aquellas células que queden unidas de forma permanente pueden dar lugar a un biofilm maduro [23]. Cuando el contacto se produce sobre una superficie abiótica, la unión inicial está mediada por fuerzas inespecíficas como fuerzas de Van der Waals o fuerzas electrostáticas. Tras su introducción en el medio fisiológico, la superficie del implante se cubre rápidamente con proteínas y componentes del sistema inmune, lo cual permite uniones más estables. Por otra parte, la unión a superficies biológicas se realiza entre las adhesinas expresadas en la superficie de los microorganismos y las proteínas del huésped [24]. En el caso de *E. coli*, produce fimbrias Tipo I para adherirse a los receptores de manosa de las superficies colonizadas [25], mientras que *S. aureus* usa un grupo de adhesinas expresadas en la superficie y reguladas por el operón *ica*, conocidas como MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*, de sus siglas en inglés), que incluyen receptores para fibronectina, colágeno o sialoproteínas del hueso [26]. Las adhesinas son multifuncionales, y no solo median la adhesión a las proteínas, sino que algunas modulan la respuesta inmune del huésped, y otras funcionan como invasinas, mediando la internalización bacteriana en las células del huésped.

- b. En la etapa de **maduración** se establecen mecanismos de comunicación entre bacterias conocidos como *quorum sensing*. Estas vías de señalización controlan gran variedad de funciones relacionadas con la formación de biopelículas, tales como la regulación de la actividad metabólica y la movilidad, y ofrecen ventajas a las bacterias frente a la inmunidad del hospedador, la defensa contra competidores y la adaptación a cambios adversos del entorno. En *Staphylococcus*, este proceso está mediado por los genes reguladores *agr*, y tiene como objetivo la interacción entre las bacterias para especializarse y adquirir funciones específicas (intercambio de nutrientes, adhesión, producción de matriz, etc.) según su localización dentro del biofilm [27]. Por ejemplo, los organismos aerobios se sitúan en las capas superiores del biofilm ya que el consumo de oxígeno es más rápido que la velocidad de difusión (**Fig. 1.2**). De manera similar se produce con los nutrientes, ya que el consumo de nutrientes por los microorganismos en las capas superiores da como resultado la inanición de los microorganismos en las capas inferiores, lo que puede llevar a la adopción de estados de crecimiento lento, como los que se encuentran en las células inactivas, dificultando su eliminación con fármacos que tienen que ser metabolizados por las propias bacterias (**Fig. 1.2**). Otros gradientes que están presentes en los biofilms incluyen gradientes de pH, que son producidos por el metabolismo heterotrófico, y gradientes de moléculas de señalización, en las que la concentración de moléculas sensibles al quorum, como las lactonas (AHL), varía según la distancia desde las células productoras (**Fig. 1.2**) [28].

La presencia del *quorum sensing*, junto con las propiedades de la matriz, provocan un cambio drástico en el estilo de vida del biofilm, el cual es claramente distinto al de las células bacterianas en estado planctónico. Como consecuencia, surgen propiedades emergentes, que no presentan las bacterias en este último estado [33]. Un ejemplo de ello es la resistencia adquirida frente a los antibióticos donde las bacterias especializadas detienen su metabolismo y entran en una fase de crecimiento estacionario, volviéndose 1000 veces más resistentes a los antibióticos que en estado planctónico [35][36]. Estas nuevas propiedades permiten la vida bacteriana en ambientes hostiles para la vida. Sin embargo, estas nuevas propiedades que surgen en el biofilm no son predecibles a partir del estudio de células bacterianas en estado planctónico, y complica el tratamiento de las infecciones óseas [33][37].



**Fig. 1.2.** Representación de los diferentes gradientes que pueden encontrarse en el interior de un biofilm. (Adaptado de la referencia [28]).

- c. En la etapa de **dispersión** del biofilm se produce un desprendimiento de células individuales o fragmentos del biofilm (**Fig. 1.1**), debido a la ausencia de nutrientes o a la falta de espacio [18], [29]. El desarrollo de un nuevo biofilm se reinicia cuando una de las bacterias desprendidas coloniza una nueva superficie, que puede estar cercana al foco de desprendimiento, o alejada mediante diseminación hematológica.

### 1.1.2. Tratamiento de la infección protésica

Los tratamientos actuales para la infección ósea se basan en la combinación de un tratamiento quirúrgico con el fin de eliminar de manera exhaustiva todos los tejidos blandos contaminados y la región ósea infectada, proceso conocido como desbridamiento, con un tratamiento antibiótico agresivo, para evitar el desarrollo de una nueva infección [30]. Se trata de un tratamiento complejo basado en la experiencia de los especialistas y las condiciones en las que se encuentre la zona infectada. Esto se debe a la imposibilidad de conseguir la eliminación de la infección mediante antibióticos como único método de tratamiento. La complejidad para eliminar la infección ósea deriva en importantes implicaciones socioeconómicas. Según un estudio realizado por Garrido-Gómez *et al* [31], se determinó que el coste medio del tratamiento de una infección de prótesis alcanza los 40500 € por paciente, el cual incluye el procedimiento quirúrgico, los cuidados necesarios y la estancia hospitalaria. En el plano social, un tratamiento antibiótico siempre conlleva efectos secundarios cuando se administra de forma sistémica, ya sea por vía oral o intravenosa [32].

Existen diferentes métodos quirúrgicos para el tratamiento de la infección protésica. Algunos contemplan el recambio de la prótesis en un tiempo [33], [34] o en dos tiempos [35], [36], mientras que en otros solo se requiere el desbridamiento de la zona infectada sin recambio de la prótesis, como es el caso del método DAIR (*Debridement, Antibiotic and Implant Retention*, de sus siglas en inglés) [37], [38]. En aquellos casos donde la infección se ha extendido hasta el hueso, es importante eliminar además la región de hueso afectada para prevenir infecciones crónicas que puedan desarrollarse en el futuro. Como consecuencia se produce una pérdida de hueso cuya gravedad dependerá de la cantidad de hueso extraído, aumentando de esta manera la fragilidad del hueso y la probabilidad de una rotura.

Una vez completado el procedimiento quirúrgico, el tratamiento de la infección continua con un tratamiento antibiótico prolongado (entre 4-6 semanas), con el fin de eliminar restos de bacterias planctónicas que puedan haber quedado en la zona desbridada y así evitar la reaparición de la infección [39]. Los antibióticos más usados en este tipo de infecciones incluyen: betalactámicos (penicilinas como: ampicilina o amoxicilina; cefalosporinas, como cefazolina, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima; o incluso carbapenemas como meropenem, imipenem, o ertapenem), aminoglicósidos (como gentamicina o amikacina), fluoroquinolonas (como ciprofloxacino o levofloxacino), glicopéptidos (como vancomicina o teicoplanina), oxazolidonas (linezolid y tedizolid), lipopéptidos cíclicos (como daptomicina) y ansamicinas (cuyo principal representante es la rifampicina), entre otros [40], [41].

En la actualidad, se han producido avances en los métodos de detección de los microorganismos causantes de la infección, como la sonicación de los implantes [42]–[45] o la implantación de técnicas moleculares [46] [47], lo cual ha permitido aplicar un tratamiento mucho más específico y personalizado al paciente. Actualmente se está complementado el desbridamiento con un tratamiento antibiótico local, mediante cementos y espaciadores cargados con antibiótico, para aumentar la concentración de antibiótico en la zona infectada [48][49]. Aunque estas nuevas estrategias intentan mejorar la efectividad de los tratamientos actuales, no descartan la necesidad de una o varias cirugías de desbridamiento, debido a la dificultad para eliminar por completo el biofilm.

Por todos estos motivos, es necesaria la búsqueda de terapias personalizadas con un alto grado de eficacia que se adapten a las necesidades clínicas de cada paciente, simplifiquen la complejidad del tratamiento y no favorezcan la aparición de bacterias multirresistentes. En este sentido se buscan alternativas con una alta especificidad mediante la administración

localizada de pequeñas dosis de un antibiótico para conseguir un gran efecto terapéutico con un mínimo efecto de toxicidad y sin la aparición de bacterias mutantes resistentes.

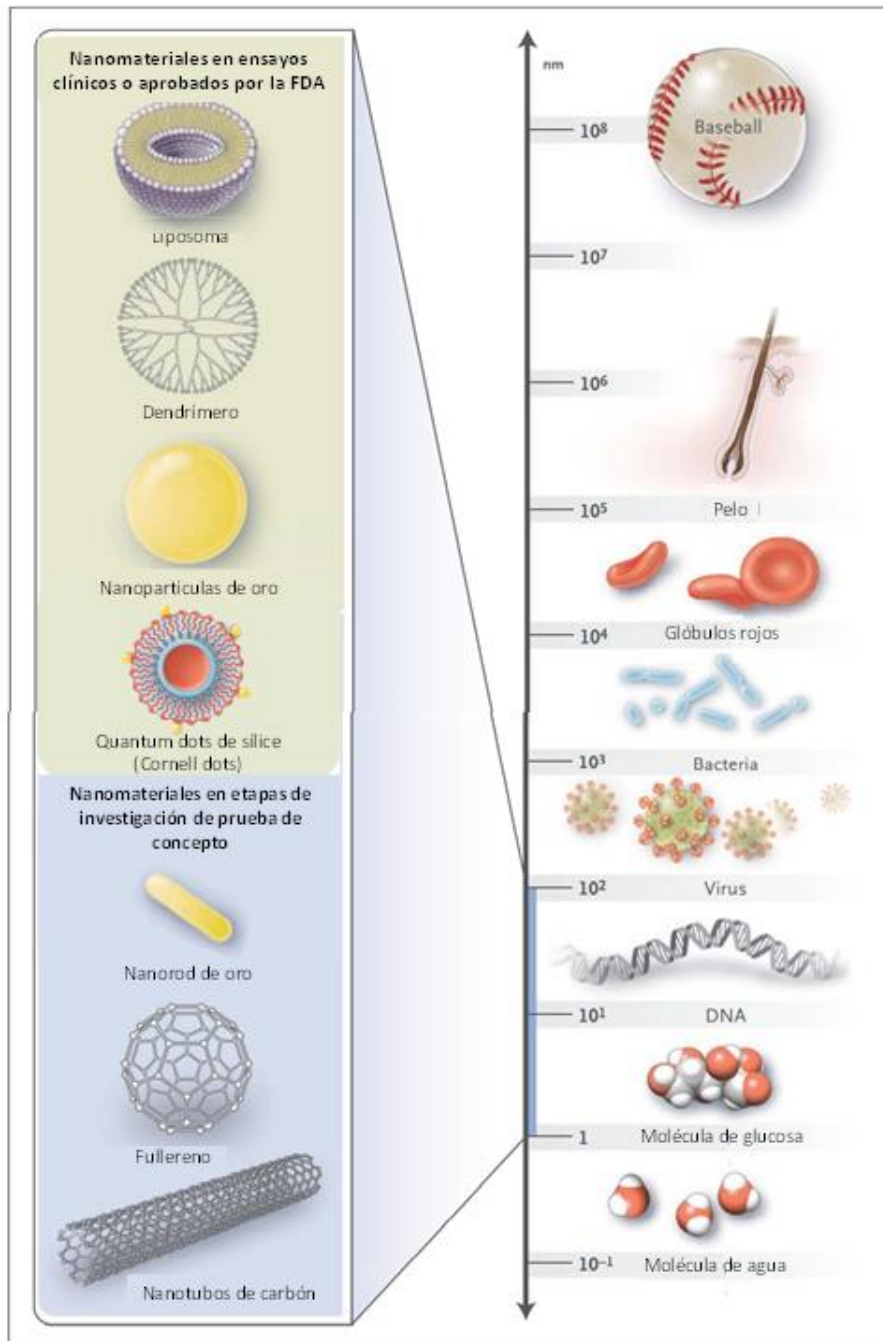
## 1.2 Nanomateriales en el tratamiento de la infección

La nanotecnología ha entrado en el campo de la medicina proporcionando nuevas herramientas centradas en nanomateriales para el tratamiento de diferentes patologías complejas, como es el caso de la infección protésica, objeto de la presente Tesis doctoral. El término "nano", según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA de sus siglas en inglés) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC de sus siglas en inglés), se refiere a cualquier producto con propiedades o fenómenos atribuibles a sus dimensiones, cuando dichas dimensiones se encuentran en el rango de nanoescala de 1-100 nm [50], [51]. A diferencia de los materiales macroscópicos, los nanomateriales presentan una alta relación entre el área de la superficie y el volumen, así como propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y biológicas modulables, y pueden diseñarse para tener diferentes tamaños, formas, composiciones químicas y características químicas de la superficie así como estructuras huecas o sólidas [52].

Según su naturaleza/composición, estos nanomateriales pueden clasificarse, en nanomateriales orgánicos o inorgánicos. Los nanomateriales orgánicos, como micelas, liposomas y nanopartículas poliméricas, se caracterizan por su biodegradabilidad y su biocompatibilidad [53]–[55]. Sin embargo, cabe destacar el grupo de los nanomateriales inorgánicos, donde se agrupan nanomateriales sólidos de metales (plata, oro, zinc) [56], nanomateriales basados en carbón [57] y las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs, *Mesoporous Silica Nanoparticles*, de sus siglas en inglés) [58], por presentar notables ventajas en comparación con sus homólogos orgánicos, como una alta resistencia mecánica y una buena estabilidad química en condiciones fisiológicas, una excelente biocompatibilidad con diferentes tipos celulares y bajas tasas de degradación, lo cual permite mantener su estructura y su papel como transportadores de fármacos hasta alcanzar el sitio deseado de actuación [59].

La nanomedicina está incorporando este tipo de nanopartículas a las nuevas generaciones de vehículos de administración de fármacos, agentes de contraste y dispositivos de diagnóstico, algunos de los cuales se encuentran actualmente en investigación clínica o han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*, de sus siglas en inglés) para uso en humanos (**Fig 1.3**) [52]. Desde su

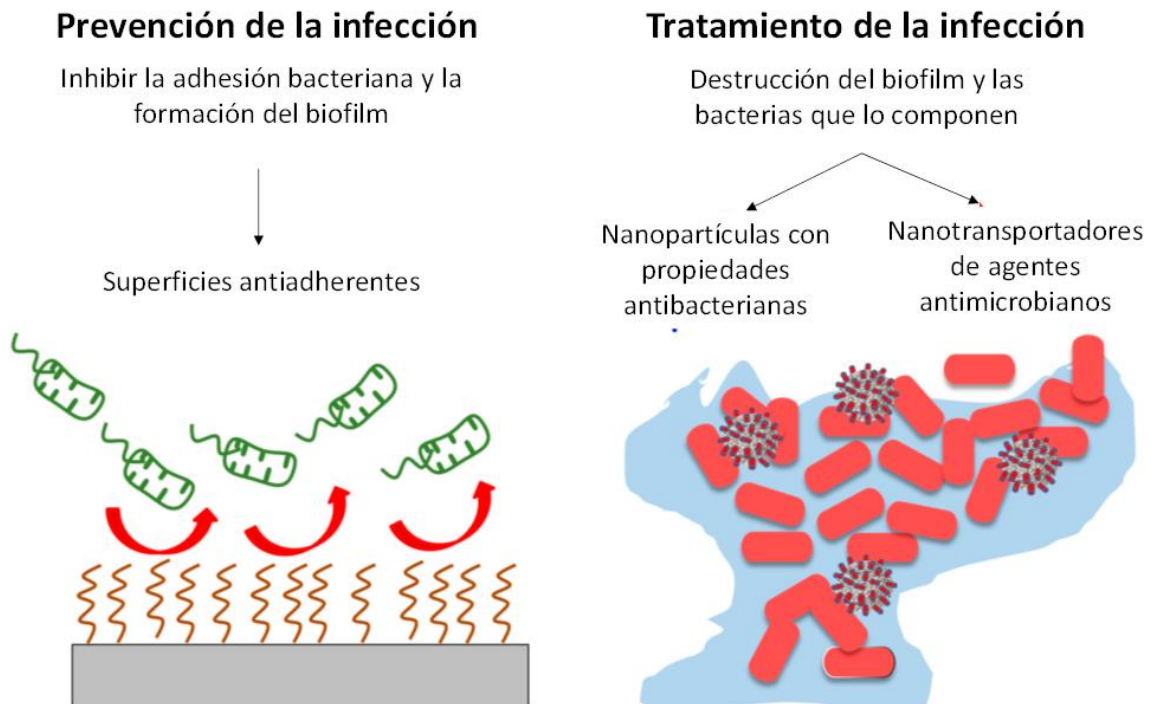
descubrimiento, la comunidad científica ha invertido mucho esfuerzo en el diseño de MSNs versátiles con especial énfasis en el tratamiento del cáncer [60][61]. Recientemente el conocimiento adquirido en el diseño de estos nanosistemas ha permitido ampliar su campo de aplicación, como por ejemplo en la infección. Este es sin duda el punto de partida hacia una mejora considerable en los tratamientos convencionales, donde la tendencia es combinar todos los elementos para abolir de forma eficaz las temidas infecciones bacterianas [62].



**Fig. 1.3.** Nanomateriales aprobados por la FDA o en periodo de investigación para ser utilizados en nanomedicina.

(Adaptado de la referencia [63]).

La ventaja de estas formulaciones de nanomateriales sobre los sistemas convencionales es que pueden aumentar la eficacia del tratamiento y disminuir los efectos secundarios a través de su modo de acción localizado [62]. Desde el punto de vista del tratamiento de la infección protésica, se han desarrollado diferentes enfoques tecnológicos mediante el empleo de nanopartículas para la prevención y/o el tratamiento de la misma [64] (**Fig. 1.4**).



**Fig. 1.4.** Diferentes estrategias para combatir la infección protésica basadas en nanomateriales. A la izquierda se muestra la modificación de la superficie para inhibir la adhesión bacteriana y a la derecha se muestra el uso de nanosistemas para destruir la biopelícula formada utilizando nanopartículas con propiedades antimicrobianas intrínsecas y nanopartículas que actúan como nanoportadores de diferentes agentes antimicrobianos. (adaptado de la referencia [62]).

Si el enfoque se centra en la prevención, los estudios se han focalizado principalmente en reducir la adhesión bacteriana y evitar el crecimiento del biofilm [64] (**Fig. 1.4**). Estas nuevas técnicas se basan principalmente en el uso de nanopartículas zwitteriónicas, caracterizadas por presentar el mismo número de cargas positivas y negativas en su superficie [65], [66]. Diferentes ensayos *in vitro* han mostrado una notable inhibición de la adhesión bacteriana sin la consecuente formación de biofilms con el empleo de este tipo de nanomateriales zwitteriónicos [67], [68]. Las medidas de prevención son de gran relevancia debido al elevado número de cirugías de inserción de prótesis anuales.

Desde el punto de vista del tratamiento, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de nanopartículas con propiedades antibacterianas intrínsecas o que pueden actuar como

portadores de agentes antimicrobianos (**Fig. 1.4**). Metales, óxidos de metales o sales metálicas se han utilizado en forma de nanopartículas para el tratamiento de la infección debido a sus propiedades antimicrobianas intrínsecas [69]–[71], sin embargo, ninguna de estas aproximaciones está dirigida al biofilm, lo cual reduce su eficacia como tratamiento para la infección ósea. La otra estrategia para combatir la infección empleando nanopartículas es utilizarlas como vehículos para administrar agentes antimicrobianos. De esta manera, se protege al compuesto activo de la degradación. Además, pueden ofrecer la posibilidad de administrar simultáneamente varios fármacos según la necesidad de la enfermedad y mejora su biodisponibilidad en la zona afectada si se modifican para dirigirlos a una zona localizada [62]. Entre los diferentes nanomateriales que pueden realizar esta función, denominados “*nanoantibióticos*”, las MSNs constituyen uno de los nanomateriales más prometedores debido a sus interesantes propiedades como sistemas de administración de fármacos tal y como se describe en los siguientes apartados [72].

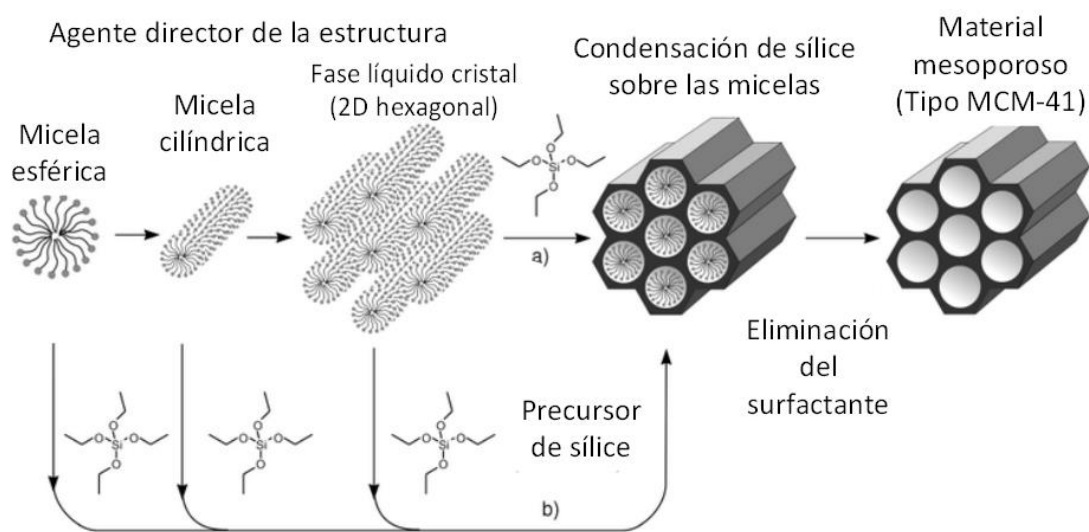
### **1.3 Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)**

#### **1.3.1. Síntesis y propiedades de las MSNs**

Los materiales mesoporosos de sílice fueron desarrollados como respuesta a la primera crisis energética global que tuvo lugar a principios de la década de 1970. A consecuencia de la crisis, muchos esfuerzos se destinaron a la búsqueda de alternativas a los combustibles derivados del petróleo crudo empleando zeolitas como catalizadores del proceso [73], [74]. Sin embargo, las diferentes estrategias mostraron un bajo rendimiento al producirse la obstrucción de los poros del catalizador y en consecuencia su desactivación durante el proceso [74]. Durante la década de 1980, se trabajó en la búsqueda de materiales porosos con poros más grandes que las zeolitas, que pudiesen mejorar su aplicabilidad como catalizadores, adsorbentes, materiales de acogida para la fabricación a nanoescala, etc. sin embargo, no se consiguió mejorar el rendimiento del proceso [75].

Fue en la década de 1990 cuando dos grupos de investigación describieron, de forma independiente, los denominados materiales mesoporosos ordenados de sílice con un sistema de poros ordenado regularmente en el rango de 2-10 nm y paredes porosas esencialmente compuestos de sílice amorfa. El grupo de la Universidad de Waseda en Japón [76], [77], encabezado por Kuroda, describió un método basado en el uso de kanemita ( $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) [73][76], el cual con el tiempo se abandonó, ya que era demasiado específico y no era generalizable a otros tipos de estructuras. Simultáneamente, la empresa Mobil Oil

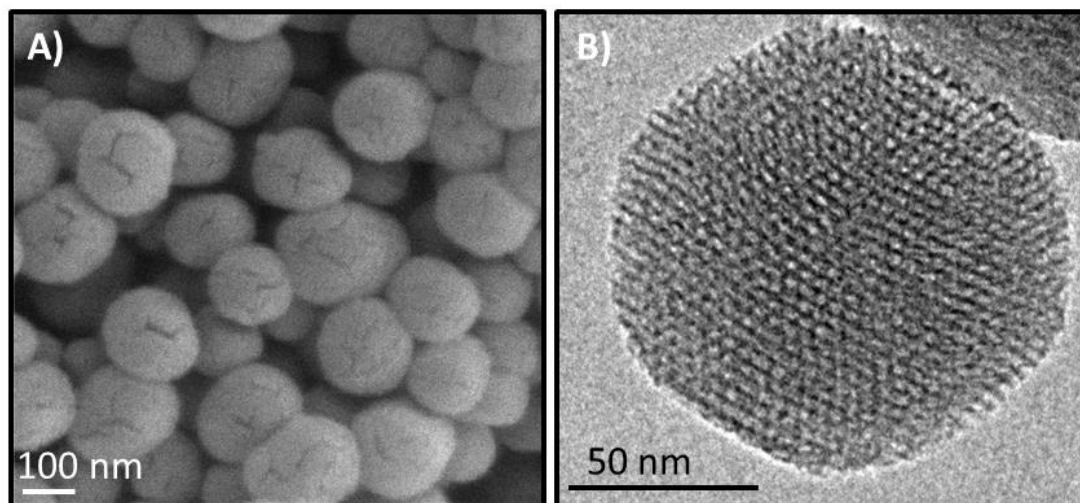
Corporation, concretamente, el grupo encabezado por C.T. Kresge, propuso el método de cristal líquido como mecanismo por el cual se formaban estas mesoestructuras ordenadas [78]–[80]. Según este modelo los surfactantes son los encargados de moldear la estructura porosa interna del material, ya que forman agregados micelares en disolución. A continuación, se produce la condensación y polimerización del precursor de sílice hidrolizado sobre dichos agregados. Dentro de este mecanismo Beck y colaboradores [79] barajaron dos rutas distintas para la obtención de la misma estructura: el mecanismo “True liquid-crystal template” se basa en la creación de agregados supramicelares, mesofases que actúan como plantilla para la condensación de la sílice a su alrededor. En cambio, el mecanismo “Cooperative liquid-crystal template” contempla la influencia de la sílice en la formación de los agregados (**Fig. 1.5**). Este grupo presentó la nueva familia de materiales mesoporosos de sílice (M41S), concretamente la serie MCM-n (donde MCM significa *Mobil Composition of Matter*), la cual exhibe diferentes mesoestructuras. Entre los materiales más representativos de la familia MCM-n destacan los MCM-41 (bidimensional (2D) hexagonal, grupo espacial p6mm), MCM-48 (tridimensional (3D) cúbico, grupo espacial Ia3d) y MCM-50 (laminar, espacio grupo p2) [78], [79], [81].



**Fig. 1.5.** Esquema del mecanismo de formación del material MCM-41 según el proceso sol-gel. A) Ruta “True liquid-crystal template” y b) ruta “Cooperative liquid-crystal template”. (Adaptado de la referencia [82]).

Estos materiales presentan unas propiedades físico-químicas tan notables como tamaño de poro ajustable, alta superficie específica, arquitectura porosa controlable y alta densidad de grupos silanol (-SiOH) en la superficie, lo que favoreció su rápida translación a la escala nanométrica dando lugar a las MSNs (**Fig 1.6**) [83]. Las MSNs, forman parte de la familia MCM-41 y se sintetizan mediante el método de Stöber [84] modificado [85], que se basa en la condensación de precursores de sílice mediante el método sol-gel sobre una serie de plantillas que dirigen la estructura y que posteriormente serán eliminados. Se realiza en condiciones

muy diluidas y en un medio básico para catalizar la hidrólisis y condensación del precursor de sílice para dar lugar a la matriz del material [86].



**Fig. 1.6.** Nanopartículas mesoporosas de sílice A) observada mediante microscopía electrónica de barrido y B) mediante microscopía electrónica de transmisión.

Las MSNs presentan propiedades fisicoquímicas bien definidas y ajustables, que incluyen desde el tamaño de partícula; el tamaño, volumen y estructura del poro hasta la funcionalización de la superficie según la aplicación biomédica a la que se destine. En función de las condiciones de síntesis, se puede ajustar el diámetro de las partículas, consiguiendo diámetros en el rango de 50 a 200 nm [60]. El diámetro de los poros se puede ajustar entre 2 a 30 nm dependiendo del surfactante empleado como molde y las condiciones de síntesis empleadas. Del mismo modo es posible adaptar la porosidad (canales paralelos o poros radiales). El volumen de poros de las MSNs convencionales es de aprox.  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ , aunque ciertos estudios han conseguido diseñar volúmenes más grandes [87]. Otra muestra de la versatilidad de las MSNs es la capacidad para combinar dos materiales (nanosistemas núcleo@corteza), y obtener, por ejemplo una red mesoporosa sobre núcleos de nanopartículas metálicas [88]. Todas estas propiedades aportan a las MSNs una elevada área de superficie ( $700 \text{ a } 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Además, las MSNs han demostrado una alta resistencia mecánica y buena estabilidad química en condiciones fisiológicas [60]. Cabe destacar la excelente biocompatibilidad de las MSNs [89], [90], gracias a su composición de sílice, la cual es una sustancia endógena, especialmente abundante en el hueso, cartílago y otros tejidos de soporte. Diferentes estudios *in vitro* han sugerido que a concentraciones por debajo de  $100 \text{ mg/mL}$ , las MSNs no inducen ninguna citotoxicidad en una variedad de líneas celulares. El conocimiento sobre el perfil de biocompatibilidad *in vivo* de las MSNs es todavía muy limitado. Estudios recientes han informado de la ausencia de toxicidad grave en ratones cuando las

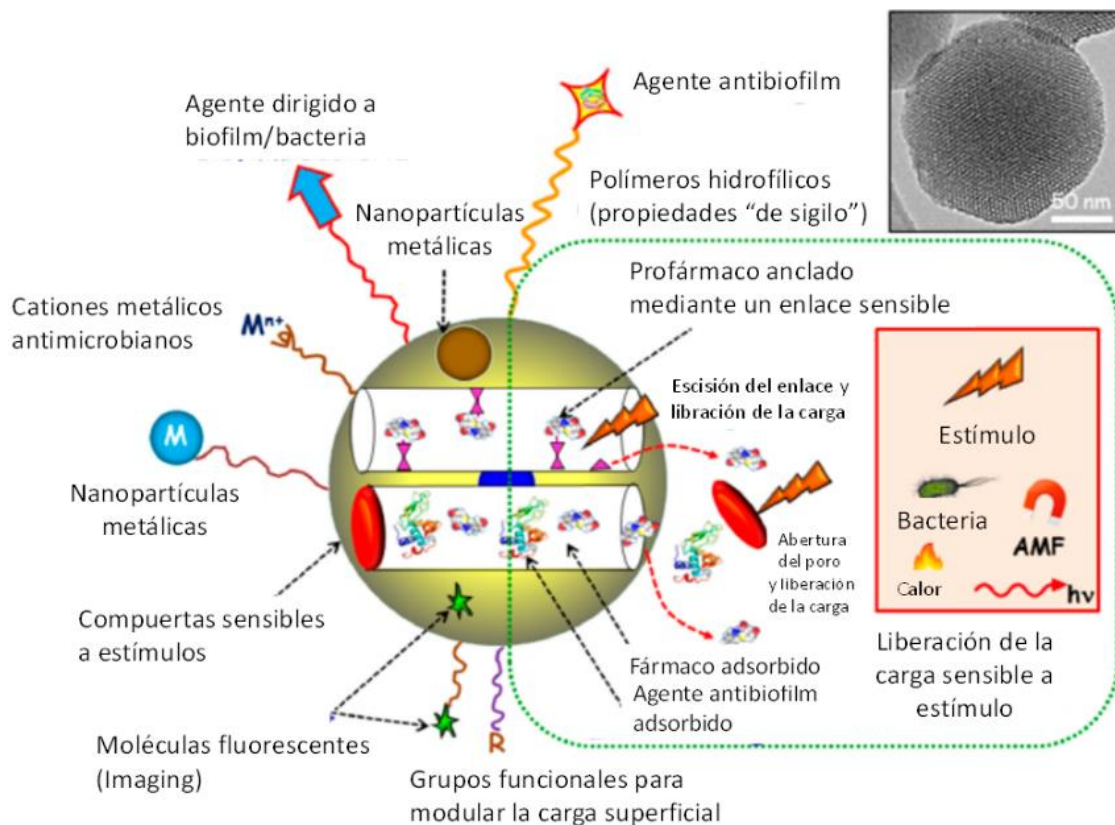
MSNs se estudian a corto plazo y a una concentración requerida para la obtención de imágenes *in vivo*. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Hudson et al. cuyos resultados muestran que la administración intraperitoneal o intravenosa de 1,2 g/kg de MSNs es letal para los ratones SV129, pero es segura cuando se reduce a 40 mg/kg. Estos estudios proporcionan conocimientos preliminares sobre el perfil toxicológico de las MSNs [91].

En este sentido es importante conocer la biodistribución de las MSNs en el organismo. La administración de las MSNs puede realizarse por diferentes vías, destacando la subcutánea o intravenosa, siendo esta última la que conduce a la rápida entrega y distribución por todo el organismo [92]. La presencia de las MSNs en sangre conlleva la adhesión inespecífica de proteínas, creando una corona de proteínas alrededor de la nanopartícula. Como resultado de estas interacciones nanomaterial-proteína, se altera la bioidentidad del nanomaterial, lo que se traduce en modificaciones de su comportamiento, destino y perfil farmacológico [93]. Existen diferentes parámetros capaces de reducir estos efectos y por tanto alargar la vida media circulante de las nanopartículas. Una primera aproximación es la modificación superficial de las MSNs con polímeros hidrófilos como el polietilenglicol (PEG) [94], lo cual disminuye la cantidad de proteínas adsorbidas en las nanopartículas al crear una capa hidrófila [95], [96]. En este sentido, se ha demostrado en modelos murinos que los MSN no PEGilados se acumulan rápidamente en órganos ricos en macrófagos como el pulmón, el hígado y el bazo, mientras que sus homólogos PEGilados muestran una vida media circulante aumentada [97]. También se ha observado como una forma esférica frente a formas alargadas o cilíndricas [98], tamaños de nanopartículas pequeños (< 150 nm) [97] o el ajuste de la carga superficial a través de la unión covalente de silanos que llevan un grupo terminal funcional ( $-NH_2$  o  $-COOH$ ) [99]–[101] retrasan su aclaración del torrente sanguíneo.

La eliminación de las MSNs del organismo se realiza principalmente por vía renal entre las 24-96h tras su administración. Debido al tamaño de las MSNs, se requiere una disolución parcial de la estructura para reducir su tamaño hasta los 70-90 nm y facilitar su excreción por esta vía [101]. Como consecuencia de la disolución se genera ácido silícico biocompatible que puede excretarse a través de la orina [102], [103]. Sin embargo, se han observado MSNs intactas con dimensiones superiores a 90 nm en la orina [104], [105], indicando que las MSNs pueden eliminarse directamente del organismo.

Otro de los principales atractivos de las MSNs es el elevado número de grupos silanol ( $-SiOH$ ) que presentan en su superficie. Esta característica permite modificar la naturaleza fisicoquímica de la superficie a través del proceso de funcionalización y ensamblar diferentes

multifuncionalidades a las MSNs para convertirlas en excelentes nanoplataformas dirigidas hacia un objetivo concreto [72], [106]. Entre las diferentes modificaciones, dirigidas al tratamiento de la infección, se incluyen (**Fig. 1.7**): unión de agentes dirigidos a la superficie externa de las MSNs, lo cual permite la administración específica de antimicrobianos a bacterias patógenas y/o biopelículas [107]; unión de agentes antibiofilm [108]; adhesión superficial de agentes sensibles a estímulos internos (bacterias, pH, potencial redox, etc.) o externos (luz, ultrasonidos, temperatura, etc.) [109]–[112]; también pueden incorporarse a las MSNs nanopartículas metálicas con efecto antimicrobiano para combinar o aumentar el efecto antimicrobiano, cuando sea necesario, por la acción antibacteriana basada en el efecto fototérmico sobre la excitación adecuada del láser [113] o con efecto magnético para guía magnética, detección y alteración del biofilm [114]. Por último, se pueden adicionar moléculas fluorescentes con fines de formación de imágenes [115].



**Fig. 1.7.** Esquematación de la multifuncionalidad que pueden abarcar las MSNs. Las diferentes estrategias abarcan desde grupos funcionales, nanopartículas metálicas o modificaciones que responden a estímulos. (Adaptado de la referencia [59]).

La aparición de los materiales mesoporosos ordenados de sílice representó un descubrimiento revolucionario que, junto con la publicación de esta vía de síntesis generalizable a una amplia variedad de materiales, motivó muchas actividades de investigación en cientos de laboratorios

de todo el mundo [72], [73]. Concretamente, las MSNs, por su excelente versatilidad, han sido ampliamente estudiadas como nanoplataformas inorgánicas, polivalentes y multifuncionales, tal y como se describirá a continuación, buscando la correcta combinación entre los diferentes parámetros (tamaño, estructura del poro y funcionalización), para conseguir la máxima efectividad según el objetivo perseguido.

### 1.3.2. Aplicaciones de las MSNs

Las extraordinarias propiedades estructurales (estructura porosa ordenada), texturales (áreas de superficie y volúmenes de poros elevados) y químicas (presencia de abundantes grupos silanoles), hizo que en el año 2001, el grupo de la profesora María Vallet Regí las propusiese como sistemas de liberación controlada de fármacos con características mejoradas de adsorción de fármacos y cinética de liberación controlable tras estudiar su capacidad para cargar y liberar diferentes agentes terapéuticos (Fig. 1.8) [116], [117].

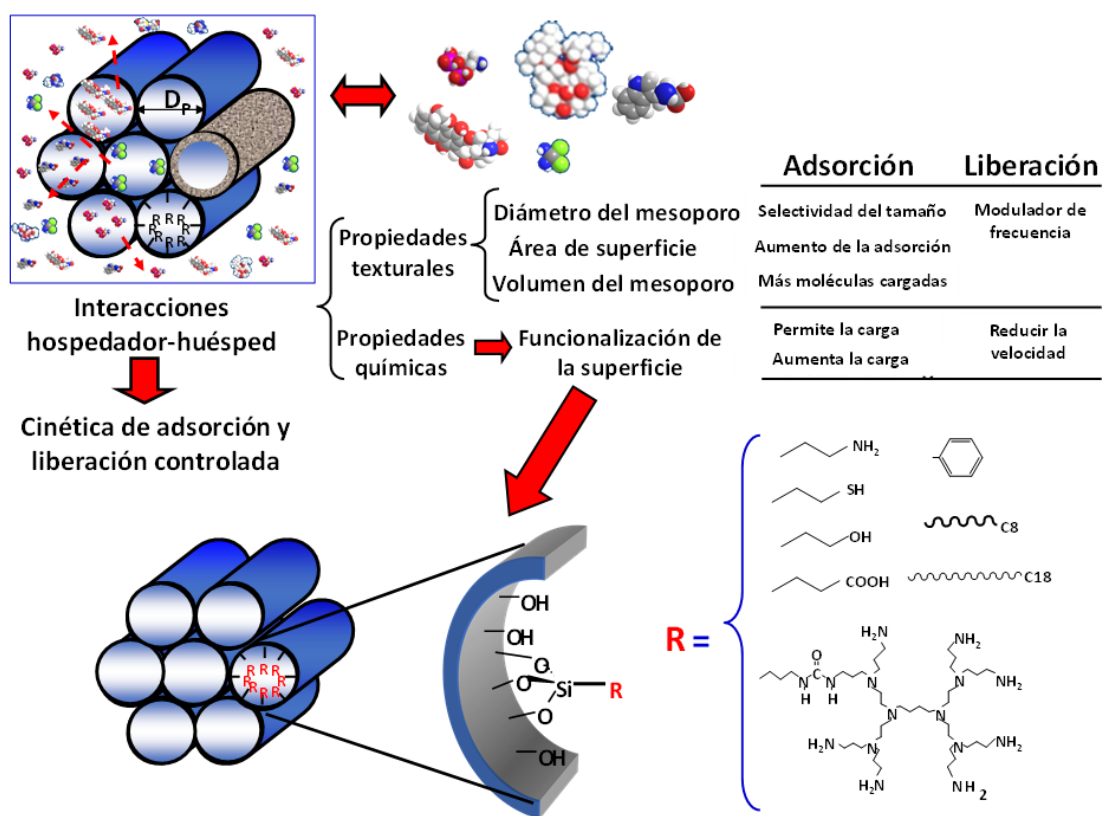


Fig. 1.8. Parámetros que gobiernan la velocidad de carga y liberación de moléculas en las MSNs. Funcionalización de materiales mesoporosos con alcoxisilanos funcionales (R es el grupo orgánico). (Adaptado de la referencia [118]).

El tamaño y el volumen de los poros, así como la superficie específica características son factores determinantes para su uso como sistemas liberadores de fármacos [119]. Por un lado, el tamaño de los poros de las MSNs es un factor limitante de las moléculas que podrían introducirse en los mesoporos en términos de tamaño. En este sentido, las MSNs con grandes

diámetros de poro (hasta 50 nm) se emplean para la adsorción y liberación de proteínas, enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos [120]. Por otro lado, el volumen de los poros es un factor importante que determina la cantidad de moléculas que se pueden cargar [121]. Teniendo en cuenta que la carga de fármaco es un fenómeno de superficie (nanopartícula-agente terapéutico), la alta superficie de las MSNs es otro factor determinante que asegura la gran capacidad de carga en este tipo de nanotransportadores [122]. La combinación adecuada de los diferentes parámetros (tamaño, tipo de interacción y estructura porosa) favorece la utilización de las MSNs para cargar y liberar una gran variedad de biomoléculas y agentes terapéuticos, desde analgésicos y antibióticos hasta proteínas o aminoácidos [123] con fines terapéuticos concretos. Un ejemplo de ello es el tratamiento de la infección, cuyas características específicas, descritas en la sección 1.1, como la presencia de biofilms, podría ser superada con facilidad tras modificar las características de las MSNs.

La vehiculización de antibióticos en un sistema funcionalizado facilita su liberación en una zona concreta, aumentando su disponibilidad en la zona infectada con la necesidad de una menor dosis y disminuyendo los efectos secundarios derivados de la administración sistémica de los mismos. Todo esto sin perder de vista las MSNs como estrategia para la prevención de emergencia de mutantes resistentes [124]–[126]. Desde el punto de vista de la infección ósea, es muy importante ajustar el tratamiento a las características específicas que la diferencian de cualquier otra infección bacteriana para conseguir una aplicación personalizada y efectiva. Por ello, es necesario estudiar las MSNs para este tratamiento específico. La cantidad máxima de antibiótico cargado en las MSNs, su cinética de liberación y su efecto sobre los biofilms generados con bacterias relacionadas con la infección ósea serán los puntos clave de los siguientes capítulos.

Como se ha mencionado previamente, la capacidad de carga de los materiales mesoporosos de sílice está determinada, entre otros parámetros, por el tamaño y el volumen del poro, tal y como se describió en el apartado anterior. En este sentido, aquellos materiales con poros más grandes, como el SBA-15, son capaces de cargar varios fármacos en sus poros de manera simultánea [127], [128], en comparación con las MSNs, cuyo tamaño y el volumen de sus poros se encuentran disminuidos y en consecuencia, su capacidad de carga. Es por ello que se han diseñado diferentes estrategias para conseguir una terapia combinada capaz de liberar de manera compartimentada diferentes fármacos desde una misma nanoplataforma. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Aguilera-Correa [129], donde se muestra el diseño de una nanopartícula capaz de cargar moxifloxacino y colistina en un mismo nanosistema con excelentes resultados frente biofilms de *E. coli*. Esto es posible gracias a la funcionalización

superficial de la nanopartícula con goma arábica que recubre la superficie y facilita la incorporación de agentes biológicamente activos con masas moleculares grandes en las nanopartículas.

Los excelentes resultados obtenidos tras los estudios de los materiales mesoporosos de sílice como dosificadores de antibiótico solos o en combinación, ha atraído un enorme interés por la búsqueda de nuevas y prometedoras propiedades en estos materiales, como su capacidad de regenerar tejido óseo. En consecuencia, muchos estudios se centraron en variar la composición de dichas mesoestructuras para que presenten un comportamiento bioactivo [130]. Esta propiedad engloba la capacidad de un material dado para formar enlaces interfaciales con los tejidos cuando entra en contacto con un fluido fisiológico que implica, siempre, la formación de una capa de hidroxicarbonoapatita, similar al componente mineral de huesos y dientes. La hidroxiapatita (HA)  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  es un mineral de fosfato de calcio con estructura de apatita que forma parte de la fracción inorgánica de la matriz ósea [131]. La HA no presenta efectos citotóxicos y muestra una excelente biocompatibilidad con los tejidos duros y también con la piel y los tejidos musculares [132], [133]. Además, la HA presenta propiedades bioactivas que le permiten unirse directamente al hueso. Desafortunadamente, debido a sus pobres propiedades mecánicas, especialmente en ambientes húmedos, la HA no suele utilizarse para aplicaciones de carga pesada, como dientes o huesos artificiales. Por ello, la aplicación de la HA se ha limitado a recubrimientos sobre prótesis metálicas/poliméricas, o a su uso en la reparación de pequeños defectos óseos [132]. Aunque los mecanismos de nucleación y cristalización de la apatita aún no se comprenden completamente, las características tanto del sustrato como de los fluidos parecen tener una influencia importante. En cuanto a la disolución, parámetros como el pH, la temperatura y la concentración iónica determinan el tipo de fosfato cálcico formado y su tasa de precipitación [134]. Por otro lado, la presencia de grupos silanol y la porosidad parece ser crucial en la formación de la capa de apatita [135], ya que Li *et al*, informaron que esta capa se formaba solo en geles de sílice, pero no en vidrios densos de sílice o cuarzo [136]. Además, la formación de la capa se ve reforzada por la presencia de poros mayores de 2 nm [134], [136], [137], y se ha establecido una relación directa entre el tamaño, volumen de los poros y la velocidad de nucleación. Los materiales de sílice mesoporosa, que tienen tamaños de poro en el rango de 2 a 30 nm y grupos reactivos de silanol y siloxano en la superficie interna, tal y como se describió en la *sección 1.3*, son candidatos prometedores como materiales bioactivos. Sin embargo, los primeros ensayos realizados para estudiar el comportamiento *in vitro* de estos materiales mostraron signos de bioactividad a tiempos demasiado largos (> 2 meses). En consecuencia y sobre la base de los

conocimientos previos, se propusieron dos estrategias para incrementar la bioactividad en los materiales mesoporosos de sílice: dopar con fósforo el material o combinar el material con pequeñas cantidades de vidrios bioactivos. Ambas estrategias favorecieron la nucleación de la apatita superficial consiguiendo a una respuesta bioactiva positiva en un período de tiempo razonable (entre 1 y 15 días) [138].

En los implantes óseos, la osteointegración es decisiva para lograr su supervivencia a largo plazo [139]. La posibilidad de combinar liberación controlada de agentes antimicrobianos con bioactividad es un reto muy atractivo desde el punto de vista de la infección ósea.

Teniendo en cuenta la problemática actual de las infecciones protésicas que sigue sin resolverse, en esta tesis se presentan nuevas alternativas o soluciones al tratamiento local de la infección ósea mediante estrategias basadas en MSNs para hacer frente a la resistencia intrínseca de los biofilms a los antibióticos, así como promover una respuesta bioactiva capaz de reparar la lesión ósea.

## 2. Objetivos

La búsqueda de tratamientos antimicrobianos capaces de combatir de forma eficaz la infección ósea sigue siendo un reto para la comunidad biomédica. La principal limitación de los tratamientos actuales se debe fundamentalmente a la baja concentración de antibiótico que llega a la zona de infección tras su administración sistémica (*vía oral y/o intravenosa*) así como a la aparición de resistencias bacterianas.

El objetivo principal de esta tesis es el diseño y desarrollo de nanosistemas antimicrobianos denominados **nanoantibióticos** para el tratamiento local de infecciones óseas como una alternativa prometedora a los tratamientos convencionales existentes. Para ello, se han utilizado MSNs como nanoplataformas multifuncionales y versátiles capaces de *i)* transportar diferentes familias de antibióticos; *ii)* incorporar sustancias que disgreguen el biofilm (mucolíticos), potenciando así la acción antibiótica; *iii)* regenerar el tejido óseo dañado. Para la consecución de este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. **Vehicular** antibióticos en el interior de los mesoporos de las MSNs para el diseño de terapias locales aumentando así el efecto antimicrobiano. Para ello, se evaluará la capacidad de las MSNs de encapsular antibióticos de diversas familias con el fin de liberarlos de forma controlada. En este sentido, se llevará a cabo un estudio sistemático y cuantitativo para investigar las dosis activas liberadas de los antibióticos levofloxacino (LVX), gentamicina (GM) y rifampicina (RIF) desde diferentes nanosistemas. Dicho estudio se realizará mediante un estudio simultáneo de las dosis liberadas y la determinación de las curvas de actividad biológica de estas dosis. Asimismo, se evaluará el efecto directo sobre el biofilm de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tanto de las dosis antibióticas liberadas como de los nanosistemas completos. Por último, se estudiará la sensibilidad antimicrobiana frente a estos nanosistemas mediante estudios *in vitro*.
2. **Incorporar** agentes mucolíticos para potenciar el efecto antimicrobiano de los antibióticos cargados. Para ello, se pretenden diseñar nanosistemas multiterapia mediante la acción combinada del agente mucolítico y el antibiótico cargado. Con este fin las nanopartículas cargadas con antibiótico (levofloxacino) se recubrirán con películas de gelatina (MSN@Gels) que contengan el agente mucolítico (N-acetilcisteína). Se estudiará el efecto directo sobre el biofilm de *E. coli* para determinar el efecto sinérgico de la liberación combinada de ambos fármacos.

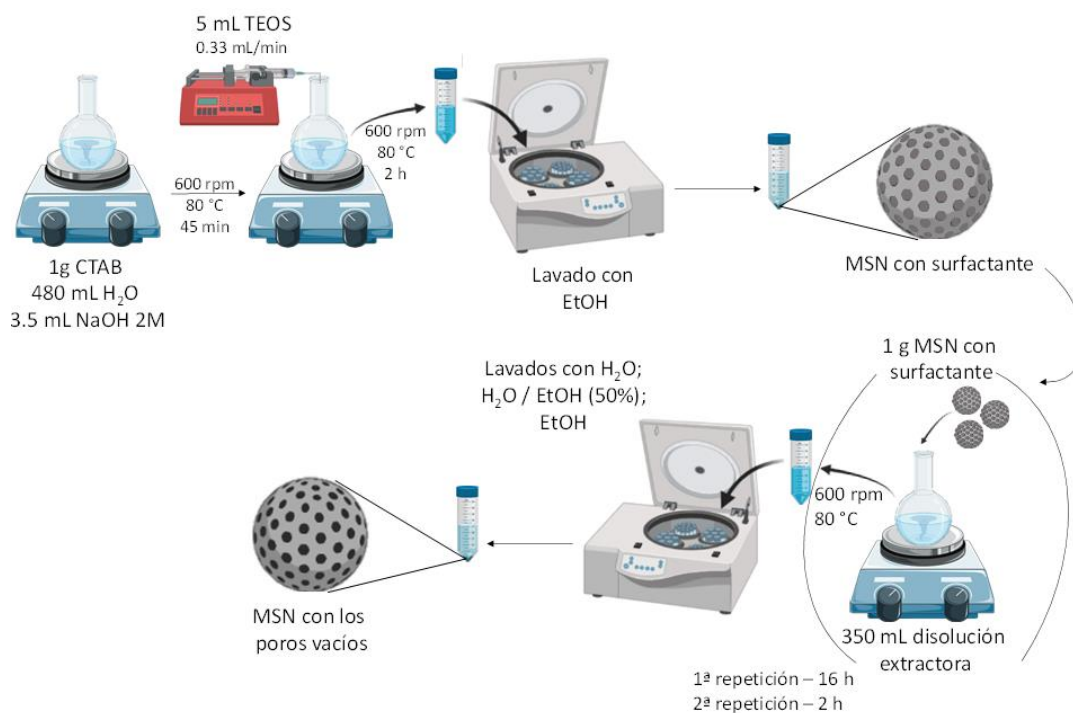
3. **Regenerar** el tejido óseo dañado. Se pretende diseñar nanosistemas que, además de acción antibiótica, tengan la capacidad de promover una respuesta bioactiva con el fin de reparar la lesión osteolítica. Para ello se diseñarán nanosistemas que contengan nanocristales de hidroxiapatita (MSN@HA) en su superficie capaces de generar una respuesta bioactiva. Se realizarán estudios *in vitro* con células preosteoblásticas de ratón con el fin de evaluar la capacidad osteo-regeneradora de estos nanosistemas (mineralización celular).

# 3. Material y métodos

## 3.1 Síntesis de *nanoantibióticos* basados en nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN)

### 3.1.1 Síntesis de las nanoplataformas (MSN)

Las MSN se sintetizaron mediante el método de Stöber modificado utilizando tetraetilortosilicato (TEOS, de sus siglas en inglés) como precursor de sílice y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB de sus siglas en inglés) como agente director de la estructura [85]. Los distintos pasos del procedimiento de síntesis utilizado se muestran esquemáticamente en la **Fig. 3.1**. Brevemente, 1g de CTAB se disolvió en una mezcla de 480 mL de agua milli-Q ( $H_2O$ , resistividad 18.2  $M\Omega$  cm) y 3.5 mL de una disolución de NaOH 2M. La mezcla se agitó magnéticamente a 600 rpm y 80 °C durante 45 min y, a continuación, se añadieron 5 mL de TEOS, con un flujo de 0.33 mL/min utilizando un inyector Ne-300 Just Infusion™ Syringe pump (New Era Pump Systems, Inc, EEUU). La agitación se mantuvo durante 2 h a 80 °C, y a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. El material se recuperó por centrifugación y se lavó con abundante etanol (EtOH), para finalmente secarlo en una estufa de vacío (Vaciotem-T, J.P SELECTA®, España) a 37 °C.



**Fig. 3.1.** Procedimiento experimental para la síntesis de las MSN y la eliminación del surfactante del interior de los poros.

El surfactante se eliminó mediante intercambio iónico, disolviendo 1g de MSN con surfactante en 350 mL de una disolución extractora compuesta por nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 10 mg/mL en EtOH (95% vol.) a 80 °C bajo agitación magnética durante 16 h. Este proceso de extracción se repitió durante 2 h con nueva disolución extractora, y finalmente el sólido se recuperó por centrifugación, se lavó sucesivamente con  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH (50% vol.) y EtOH absoluto y se dejó secar a vacío a 37°C (**Fig. 3.1**).

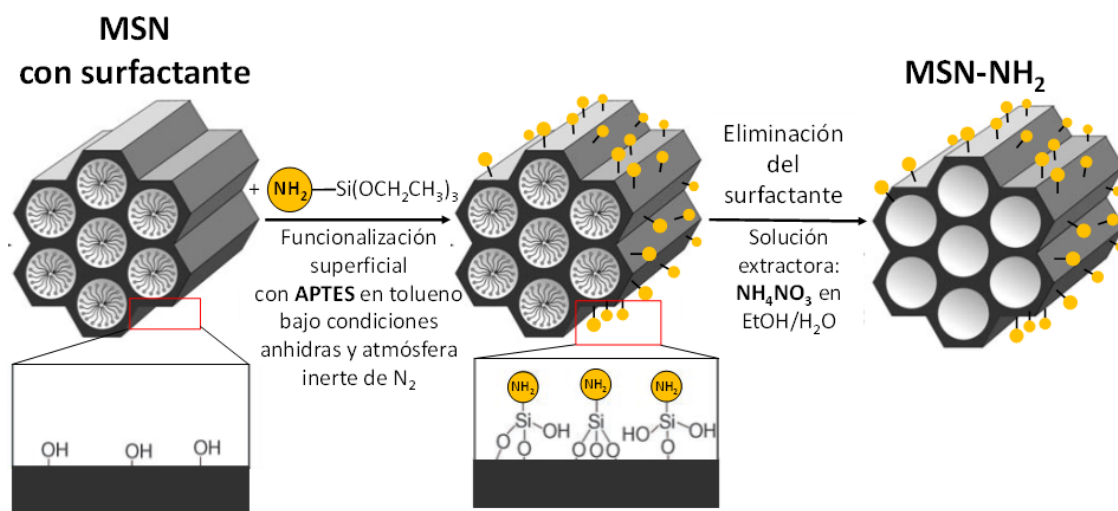
Por otra parte, se sintetizaron nanopartículas con marcaje fluorescente, para lo cual, previamente a la adición del TEOS, se hizo reaccionar 1 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC) con 2.2  $\mu\text{L}$  de (3-aminopropil)trióxosilano (APTES) en 40  $\mu\text{L}$  de EtOH absoluto durante 2 h en atmósfera inerte. A continuación, se añadieron 5 mL de TEOS, y posteriormente, se introdujo la mezcla en el inyector para adicionarlo sobre la disolución de CTAB. La formación de las nanopartículas marcadas (MSN\*) y la extracción del surfactante se realizó utilizando el procedimiento empleado para la síntesis de las MSN, anteriormente descrito.

### **3.1.2 Funcionalización superficial de las MSN con grupos amino**

La funcionalización de las MSN con grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) permite incorporar cargas positivas a la superficie para diseñar modelos vehiculizados dirigidos a bacterias/biofilms cargados negativamente [140]. Por otra parte, las MSN funcionalizadas con grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) constituyen una nanoplataforma de partida ideal para el posterior anclaje de agentes de vectorización y reconocimiento selectivo de bacterias patógenas [125][141]. Por esta razón, en esta tesis doctoral, se eligieron las MSN de sílice pura y modificadas con grupos amino como nanoplataformas modelo.

La funcionalización de las MSN se realizó mediante un proceso post-síntesis utilizando APTES como agente funcionalizante, bajo condiciones anhidras y atmósfera inerte [3]. La funcionalización se produce por condensación entre las moléculas de APTES y los grupos silanol ( $-\text{SiOH}$ ) de la superficie de las MSN. La cantidad de APTES se estableció a partir de la superficie específica ( $S_{\text{BET}}$ , 1237  $\text{m}^2/\text{g}$ ) de las MSN, de la cual el 25% se tuvo en cuenta para la superficie externa, con una concentración promedio de 4.9  $\text{OH}/\text{nm}^2$  [143]. Se utilizó una relación equimolar de APTES/SiOH, asumiendo que cada mol de APTES condensa con un mínimo de un mol y un máximo de tres moles de SiOH libres de la sílice. La reacción se realizó antes de la eliminación del surfactante de los mesoporos, con el fin de funcionalizar de forma selectiva únicamente la superficie más externa y mantener los poros vacíos después del proceso de extracción [4] (**Fig. 3.2**). Para ello, se resuspendió 1 g de MSN que contenía surfactante en 30 mL de tolueno anhidro en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$ . A continuación, se

añadieron 0.5 mL de APTES y la suspensión se agitó a 110 °C a reflujo durante 16 h. El producto se recuperó mediante centrifugación, se sometió a varios ciclos de lavado utilizando tolueno, EtOH absoluto y metanol, y se secó en estufa de vacío a 37 °C. Finalmente, el surfactante se eliminó mediante el procedimiento de intercambio iónico descrito anteriormente en el apartado 3.1.1 dando lugar al material MSN-NH<sub>2</sub>.



**Fig. 3.2.** Proceso de funcionalización de la superficie externa de las MSN con APTES y posterior extracción por intercambio catiónico. (Adaptado de [82]).

### 3.1.3 Carga con los antibióticos levofloxacin, gentamicina y rifampicina

La carga de los antibióticos en las MSN y MSN-NH<sub>2</sub> se realizó empleando los antibióticos levofloxacin (LVX), sulfato de gentamicina (GM) y rifampicina (RIF). Estos tres antibióticos se caracterizan por presentar un amplio espectro de acción contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Como consecuencia, estos antibióticos se utilizan frecuentemente, de forma independiente o en combinación, para el tratamiento de diferentes infecciones tal y como se detalló en la introducción. La **Fig. 3.3** muestra la fórmula química con los diferentes grupos funcionales, así como las principales propiedades químicas de los tres antibióticos escogidos.

La carga de los antibióticos en las MSNs se llevó a cabo siguiendo el método de impregnación previamente descrito en la bibliografía [117], [144] (**Fig. 3.4**). Para ello, se prepararon disoluciones antibióticas de LVX, GM y RIF en EtOH, H<sub>2</sub>O y dimetilsulfóxido (DMSO) respectivamente. La elección del disolvente se realizó teniendo en cuenta el grado de solubilidad de cada antibiótico, con el fin de obtener disoluciones homogéneas y con una elevada concentración de antibiótico. Todas las disoluciones se prepararon a una concentración de 8 mM de antibiótico para minimizar las interacciones fármaco-fármaco,

evitando así la adsorción en multicapa y la cristalización de la droga cargada, como se observó que ocurría utilizando concentraciones más elevadas de antibiótico (resultados no mostrados).

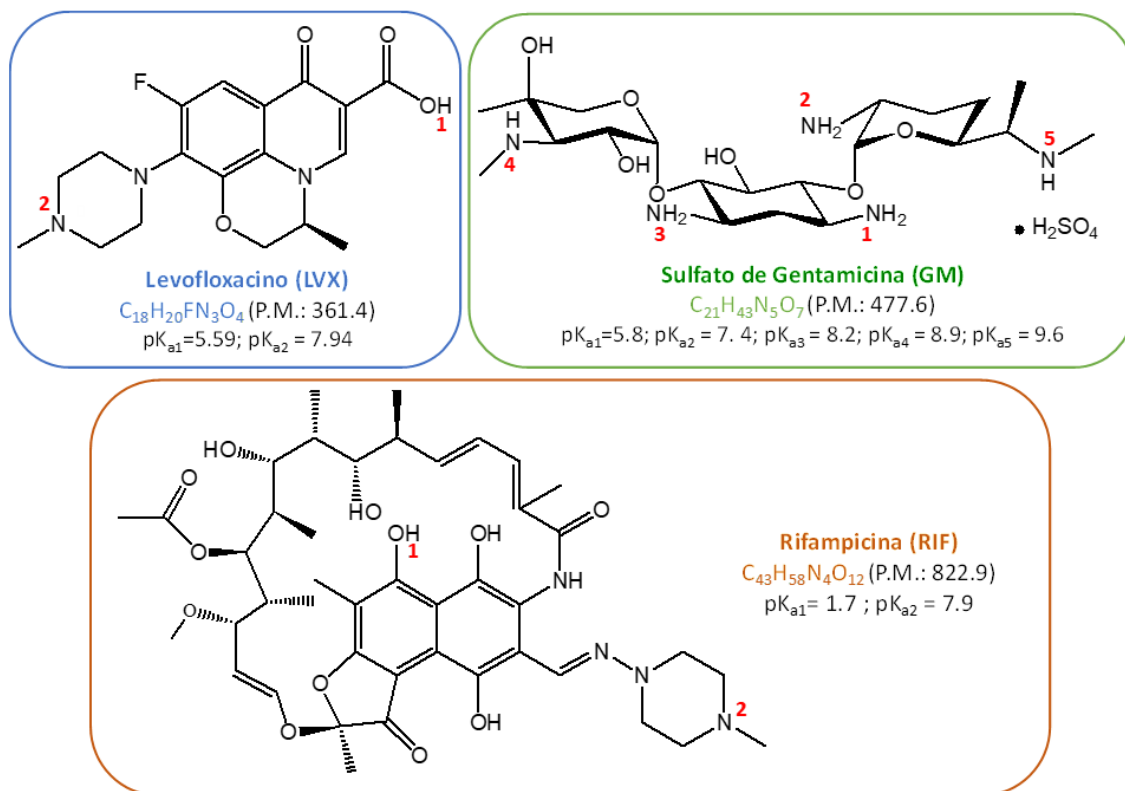
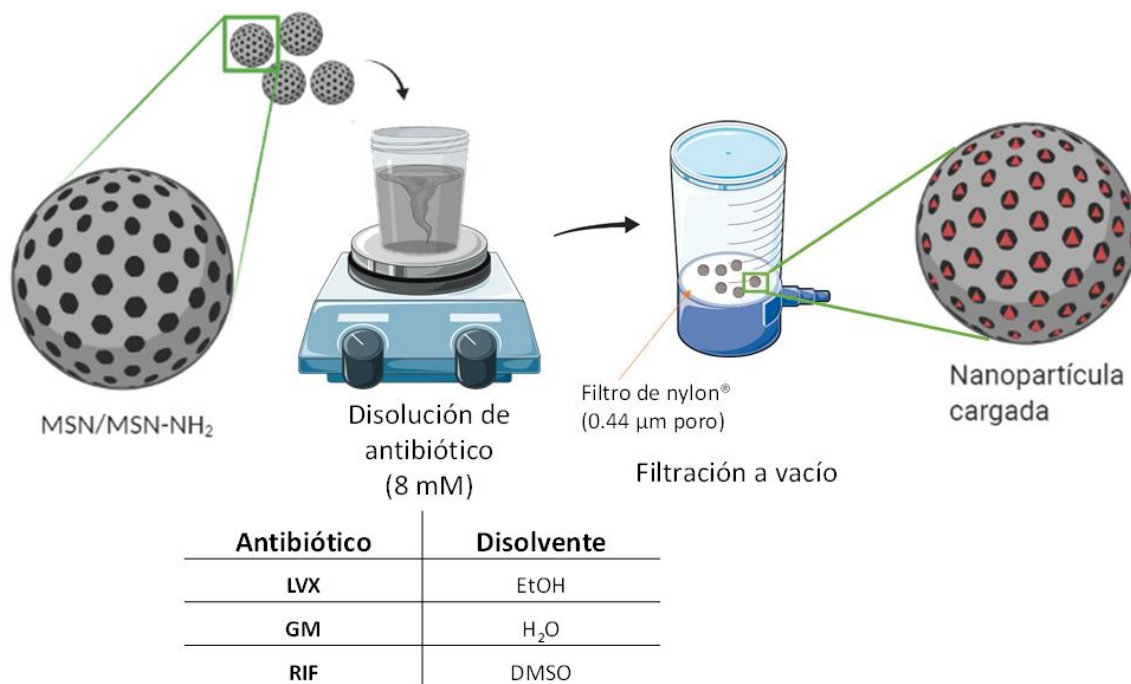


Fig. 3.3. Fórmula, peso molecular y constantes de acidez de LVX, GM y RIF.

La carga de los antibióticos en las MSNs se efectuó dispersando 125 mg de los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en 25 mL de las disoluciones antibióticas de LVX, GM o RIF. Las suspensiones con LVX y RIF se incubaron en agitación magnética, ausencia de luz y 25 °C, durante 16 h, a diferencia de la carga de GM, que se realizó en las mismas condiciones, pero ajustando la temperatura a 4 °C, con el fin de evitar la degradación del fármaco con el tiempo. A continuación, los materiales se filtraron a vacío, empleando un filtro de Nylon® con poros de 0.44 μm de diámetro (Sartorius, Alemania), y se lavaron con el disolvente utilizado en cada proceso de carga con el fin de eliminar el exceso de antibiótico no cargado. Finalmente, se secaron en la estufa de vacío y se utilizó la siguiente nomenclatura: MSN-LVX y MSN-NH<sub>2</sub>-LVX para las MSNs cargadas con LVX; MSN-GM y MSN-NH<sub>2</sub>-GM para las MSNs cargadas con GM y MSN-RIF y MSN-NH<sub>2</sub>-RIF para las MSNs cargadas con RIF.

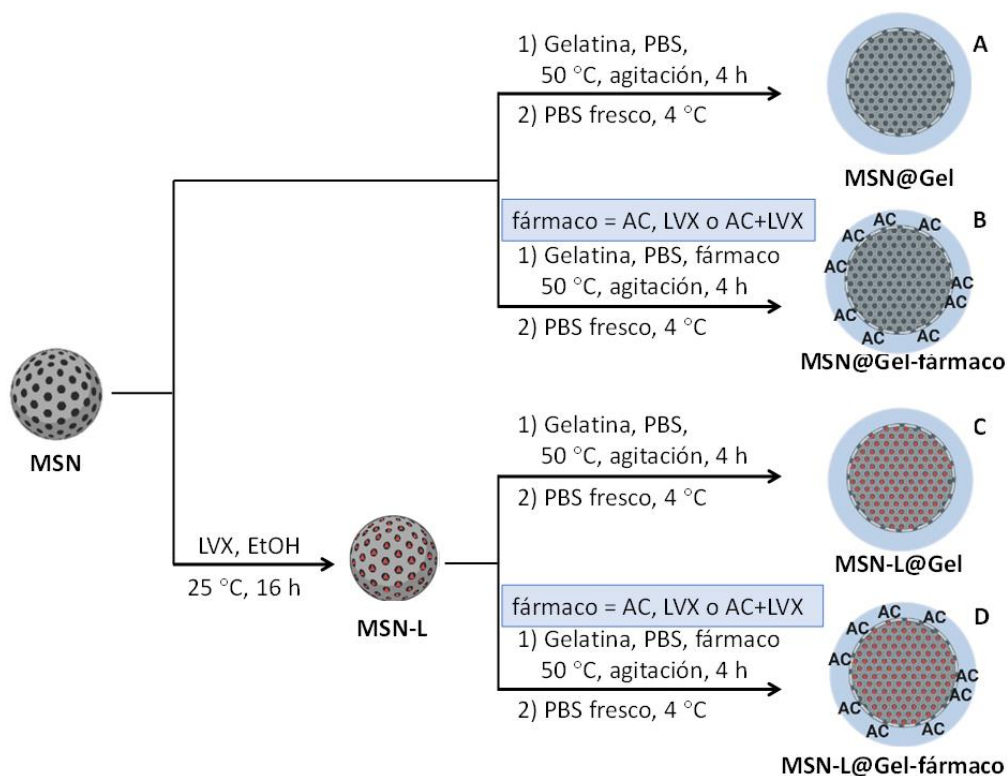


**Fig. 3.4.** Procedimiento experimental para la carga de los antibióticos LVX, GM y RIF en los nanotransportadores MSN y MSN-NH<sub>2</sub> mediante el método de impregnación.

### 3.1.4 Diseño de los nanosistemas MSN@Gels

Uno de los propósitos de esta tesis doctoral es diseñar nanosistemas multiterapia capaces de albergar, de forma simultánea, fármacos de distinta naturaleza y modular la liberación de cada uno de ellos. En esta tesis nos hemos centrado en la combinación de antibióticos con agentes mucolíticos. Con esta finalidad, se realizó un recubrimiento externo con gelatina conteniendo el fármaco mucolítico como agente disgregador del biofilm. De esta forma, se liberaría el mucolítico, el cual actuaría sobre el biofilm y lo dejaría más susceptible al ataque del antibiótico localizado en el interior de los poros. La novedad radica en el diseño de este *nanoantibiótico*, donde coexisten un mucolítico y un antibiótico en un único nanosistema para una eliminación total del biofilm. Dicho recubrimiento externo se ha basado en un protocolo descrito anteriormente por el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta tesis [145], realizando ciertas modificaciones dirigidas al diseño y la optimización de los nanosistemas multiterapia. La optimización de dichos recubrimientos se realizó en función de la cantidad de gelatina presente en la disolución inicial. En este sentido, se prepararon disoluciones de gelatina de concentración 5 mg/mL y 10 mg/mL en una disolución tampón fosfato 1x (PBS de sus siglas en inglés) (pH = 7.4). Esta disolución se agitó magnéticamente a 50 °C hasta lograr la total disolución de la gelatina. A continuación, se añadió el agente mucolítico (N-acetilcisteína, AC) a una concentración de 1.3 mg/mL. Una vez formadas las diferentes disoluciones estables de gelatina, se resuspendieron 20 mg de nanopartículas, utilizando por separado MSN

cargadas con antibiótico y sin cargar. A continuación, las suspensiones se incubaron en agitación magnética durante 4 h a 50 °C. Transcurrido este tiempo, cada una de las suspensiones se enfrió con 25 mL de PBS frío 1x (4 °C), y la mezcla se agitó suavemente. Inmediatamente, las nanopartículas se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS frío [145]. Una vez obtenidas, las nanopartículas se recogieron y se secaron al vacío para obtener los sistemas MSN@Gel<sub>AC</sub> y MSN@2Gel<sub>AC</sub>, correspondientes a la concentración inicial de 5 y 10 mg/mL en PBS (**Fig. 3.5. A y C**). Con el fin de aumentar la actividad terapéutica de los nanosistemas diseñados, y dado que la presencia del recubrimiento podría interferir en la liberación del antibiótico, se diseñaron sistemas cuyo recubrimiento externo presentara LVX además de AC (**Fig. 3.5. B y D**). Para ello, se añadió LVX a una concentración de 1 mg/mL a la disolución inicial de 5 mg/mL de gelatina conteniendo AC.



**Fig. 3.5** Diagrama de síntesis de los diferentes materiales MSN@Gels. En el esquema se representan los diferentes pasos para diseñar los nanosistemas MSN@Gels mediante el recubrimiento de gelatina y la adición de los agentes antimicrobianos en el recubrimiento de nanopartículas sin LVX (A y B) y con LVX en los poros (C y D).

Con el fin de discernir la acción en conjunto y en solitario del mucolítico y del antibiótico, se prepararon una serie de controles los cuales se especifican en la siguiente tabla (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Relación de muestras diseñadas del material MSN@Gels donde se especifican los agentes antimicrobianos utilizados y su localización en el nanosistema.

Nanosistema	Poros	Recubrimiento gelatina
MSN@Gel	-	-
MSN@Gel <sub>L</sub>	-	LVX
MSN@Gel <sub>AC</sub>	-	AC
MSN-L@Gel	LVX	-
MSN-L@Gel <sub>L</sub>	LVX	LVX
MSN-L@Gel <sub>AC</sub>	LVX	AC
MSN-L@Gel <sub>L-AC</sub>	LVX	LVX y AC
MSN-L@2Gel <sub>AC</sub>	LVX	AC

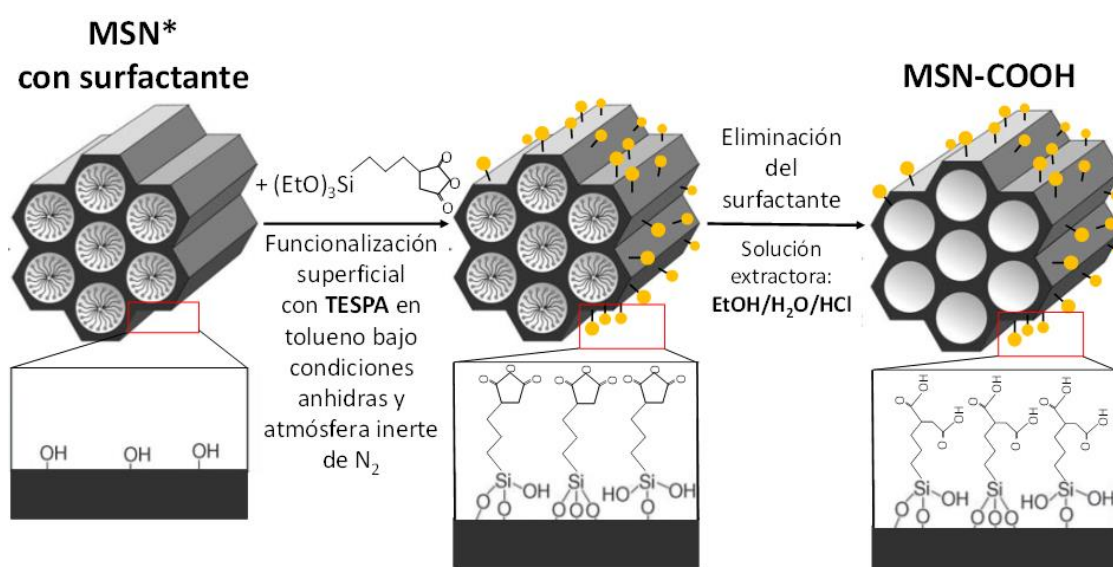
Para comprobar si las moléculas de AC embebidas en la cubierta polimérica de gelatina pueden ser liberadas al medio fisiológico, se realizó una primera aproximación utilizando el fluoróforo FITC, de fácil detección, como molécula modelo. Para ello, se incorporó FITC a la cobertura de gelatina, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la incorporación de la AC en los nanosistemas. Brevemente, se resuspendieron 20 mg de MSN en una disolución de gelatina de 10 mg/mL en PBS 1x (pH = 7.4) conteniendo 6.5 mg de FITC [145], [146]. Como resultado se obtuvo el material MSN@Gel<sub>FITC</sub>.

### 3.1.5 Diseño del nanosistema MSN@HA

Para promover la regeneración del tejido óseo dañado por la osteolisis producida por la colonización bacteriana y, teniendo en cuenta la bioactividad y capacidad osteoregeneradora de la hidroxiapatita (HA), se ha preparado un nanosistema tipo nucleo@corteza basados en MSN con una cobertura externa de cristales de HA. Se han utilizado nanopartículas marcadas fluorescentemente (MSN\*, sección 3.1.1), con el fin de poder efectuar un mejor seguimiento de su mecanismo de acción durante el proceso de regeneración del tejido dañado. Para diseñar estos nanosistemas, la superficie de las MSN\* se funcionalizó previamente con grupos carboxilo (-COOH), siguiendo un protocolo descrito en la bibliografía [147]. Para ello, se preparó una suspensión de 1 g de MSN\* con surfactante en 40 mL de tolueno anhidro. Tras conseguir una suspensión completa y homogénea, se añadieron 267.6 mg de 3-(trietoxisilil)propilsuccínico (TESPA), con una relación molar 1:3 de TESPA/SiOH, en condiciones anhidras y atmosfera inerte. La cantidad de TESPA necesaria para funcionalizar la superficie de las MSN, se determinó a partir del valor de  $S_{BET}$  (1237 m<sup>2</sup>/g de las MSN, de la cual el 25% se tuvo en cuenta para la superficie externa, con una concentración promedio de 4.9 OH/nm<sup>2</sup>

[143]. La suspensión se agitó magnéticamente a 110 °C a reflujo durante 16 h. Trascurrido este tiempo, la suspensión se lavó dos veces con tolueno, tres veces con EtOH absoluto, y se secó a 70 °C.

Para eliminar el surfactante y al mismo tiempo obtener los grupos carboxilo (-COOH) en la superficie, el material seco se resuspendió en una disolución extractora compuesta, en este caso, por EtOH (360 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) y HCl 12 M (10 mL). La presencia del ácido en la suspensión provoca la apertura del anillo succínico del TESPA para dar lugar a los grupos carboxilo (-COOH) sobre la superficie de las MSN\* (**Fig. 3.6**). Esta suspensión se agitó a 65 °C a reflujo durante 16 h y, tras sucesivos ciclos de lavado con H<sub>2</sub>O, mezcla de EtOH y H<sub>2</sub>O al 50% en volumen y EtOH absoluto, el sólido se volvió a resuspender en la disolución extractora durante 2 h adicionales para asegurar la eliminación total del surfactante y la apertura eficiente del anillo de TESPA. Finalmente, el material se lavó y secó a 37 °C en una estufa de vacío, obteniendo el material MSN-COOH.



**Fig. 3.6.** Esquemización del anclaje y posterior apertura del anillo succínico a partir de TESPA para dar lugar a las MSN\* modificadas superficialmente con grupos carboxilo (MSN-COOH). (Adaptado de [82]).

Una vez completada la funcionalización, se procedió a incorporar los nanocristales de HA a la superficie de las MSN-COOH, mediante un proceso de mineralización biomimético descrito en la literatura [148]. Este proceso se basa en la precipitación de fosfato de calcio (CaP) sobre la superficie externa de las MSN-COOH a 25 °C (**Fig. 3.7**). Para ello, se dispersaron 100 mg de MSN-COOH en 10 mL de H<sub>2</sub>O y se añadieron 0.5 mL de una disolución  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 118 mg/mL en H<sub>2</sub>O. Tras agitar la suspensión durante 2 h, se añadió, gota a gota, 0.5 mL de una disolución de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  a 40 mg/mL en H<sub>2</sub>O. A continuación, la disolución se ajustó a un pH =

10 empleando  $\text{NH}_3$  0.1 M, y se agitó durante 16 h. Finalmente, el material se centrifugó, se lavó mediante ciclos sucesivos con  $\text{H}_2\text{O}$  y EtOH absoluto, y se secó en la estufa a  $40^\circ\text{C}$  para obtener el material MSN@HA.

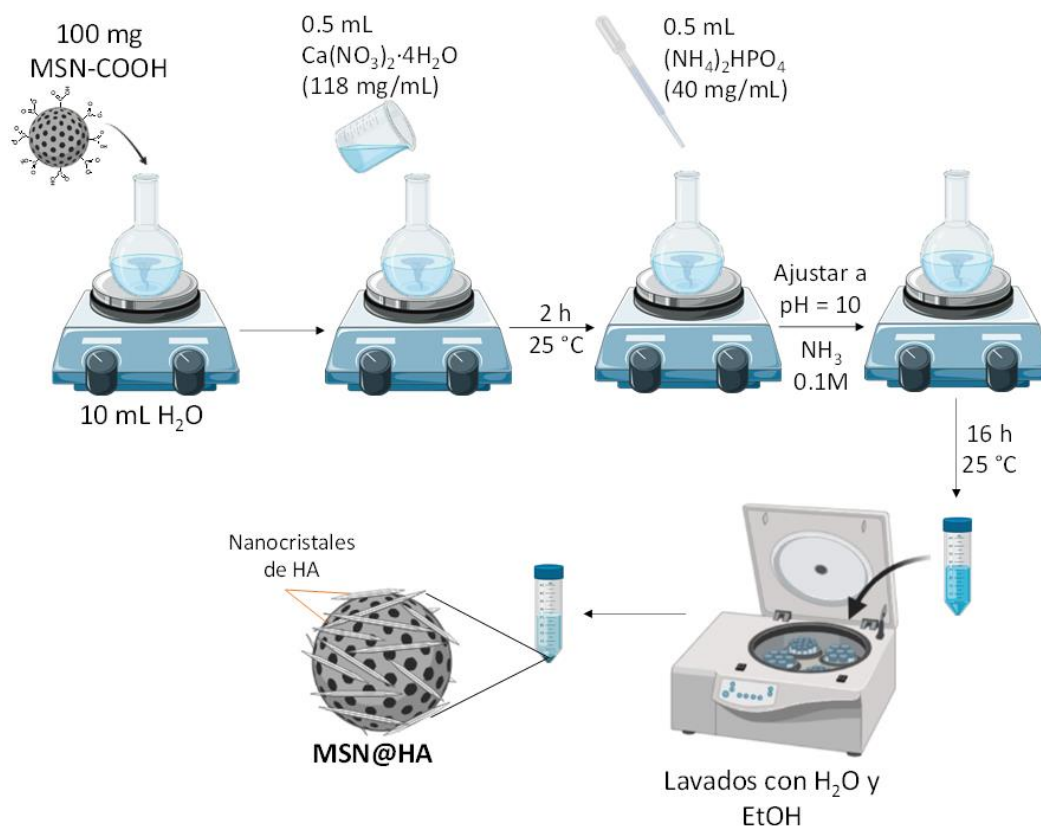


Fig. 3.7. Procedimiento experimental de la síntesis de los nanosistemas MSN@HA.

### 3.2 Caracterización físico-química de los nanosistemas

Los distintos nanosistemas diseñados a lo largo de esta tesis doctoral se sometieron a una caracterización físico-química exhaustiva, incluyendo técnicas como microscopía electrónica de transmisión (TEM de sus siglas en inglés) y difracción de rayos X (XRD de sus siglas en inglés) para la caracterización morfológica y estructural; porosimetría de adsorción de  $\text{N}_2$  para el estudio de las propiedades texturales; espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR de sus siglas en inglés), análisis químico elemental (AQE), dispersión dinámica de luz (DLS de sus siglas en inglés), potencial- $(\zeta)$  zeta y análisis termogravimétrico (TG de sus siglas en inglés) para la caracterización química de cada uno de los nanosistemas diseñados. Las bases de las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización de los materiales se describen en el Anexo II de esta tesis doctoral.

La morfología y el orden mesoestructural de las MSNs se estudiaron por TEM en los equipos JEOL JEM 1400 y JEOL JEM 2100, equipados con una cámara CCD (KeenView Camera) y que operan a 120 y 200 kV, respectivamente, pertenecientes a la Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS) Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Todas las muestras se prepararon dispersando en EtOH una pequeña cantidad del material en polvo con ayuda de un baño de ultrasonidos FisherBrand™ (Thermo Fisher Scientific, EEUU). A continuación, se depositaron unas gotas de la suspensión en una rejilla de cobre recubierta con carbono. Para el estudio por TEM de los materiales con gelatina, se utilizó una disolución de ácido fosfotúngstico al 1% (PTA) como agente de tinción, para poder visualizar el recubrimiento orgánico de gelatina alrededor de las MSN. En el caso del material MSN@HA, se realizó un estudio mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS de sus siglas en inglés) para confirmar la presencia de CaP y cuantificar la relación molar Ca/P, Si/P y Si/Ca en las muestras analizadas. Este dispositivo consiste en un analizador de energía dispersiva de rayos X Oxford Link y una unidad STEM, que se encuentran acoplados en algunos microscopios electrónicos del ICTS CNME de la UCM.

La estructura de mesoporos ordenados de las MSN, antes y después de ser sometidas a los procesos de funcionalización, carga con antibióticos o de ser recubiertas con gelatina o HA, se investigó mediante XRD en polvo a bajo ángulo (SA-XRD) en un difractor Philips X'Pert Plus (Philips Electronics NV, Países Bajos) con geometría de difracción Bragg-Brentano, operando con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) a 40 kV y 20 mA. Los difractogramas se recogieron en el rango entre  $0.6^\circ$  y  $10.0^\circ 2\theta$ , con un paso de  $0.02^\circ 2\theta$  y un tiempo de contacto de 5 s por paso. La estructura cristalina de la HA se investigó mediante XRD a alto ángulo en el mismo equipo, en el rango entre  $5^\circ$  y  $50^\circ 2\theta$ , con un paso de  $0.1^\circ$  y un tiempo de contacto de 5 s por paso. Las medidas se realizaron en el servicio de XRD perteneciente al Centro de apoyo a la investigación (CAI) Técnicas Físicas y Químicas de la UCM.

Para determinar los valores de carga superficial de los nanosistemas diseñados, se realizaron medidas de potencial-( $\zeta$ ) zeta a partir de suspensiones de los materiales en  $\text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0.1 mg/mL. Para ello se utilizó un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), equipado con un láser de 633 nm. El tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ) de los diferentes nanosistemas se midió mediante DLS utilizando el mismo equipo.

Las isotermas de adsorción-desorción de  $\text{N}_2$  de las MSN, antes y después de ser sometidas a los procesos de funcionalización y carga con antibióticos, permitieron estudiar las posibles variaciones que pueden experimentar los parámetros texturales, principalmente superficie

específica ( $S_{\text{BET}}$ ), volumen total de poro ( $V_{\text{T}}$ ) y tamaño de poro ( $D_{\text{p}}$ ). Las isothermas de adsorción-desorción de  $\text{N}_2$  se registraron a  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  en un analizador Micromeritics ASAP2020 (Micromeritics Co, EEUU). Previamente, en todos los casos, 30-50 mg del material en polvo se desgasificaron durante 24 h a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  a vacío ( $<10^{-5}$  Torr). El tratamiento adecuado de las isothermas de adsorción-desorción permitió determinar los principales parámetros texturales de los materiales analizados:  $S_{\text{BET}}$ , mediante la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET) [149];  $V_{\text{T}}$ , calculando el volumen adsorbido a  $P/P_0 \approx 0.97$ ; y  $D_{\text{p}}$ , a partir del máximo de la curva de distribución de diámetros de poro, utilizando la rama de adsorción y el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [150].

La espectrometría de FTIR se utilizó para confirmar el éxito de la funcionalización superficial con grupos amino (en las MSN-NH<sub>2</sub>) o con grupos ácido carboxílico (en las MSN-COOH). También permitió confirmar, de forma cualitativa, la presencia de gelatina y la presencia de cristales de HA alrededor de los nanotransportadores en los materiales MSN@Gels y MSN@HA, respectivamente, a través de sus grupos funcionales específicos. Los espectros de FTIR se recogieron en un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus (Thermo Fisher Scientific, EEUU), equipado con un dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR) Goldengate, en el rango de número de onda entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con un total de 64 barridos por análisis para cada uno de los materiales testados.

Los estudios mediante AQE proporcionaron información sobre los porcentajes de C, H, N y S que componen los diferentes materiales diseñados. Los valores de C y N, derivados de los análisis por AQE, permitieron verificar la funcionalización superficial de los materiales MSN-NH<sub>2</sub>, así como determinar la carga antibiótica en el interior de los mesoporos. Los análisis se realizaron con un termoanalizador Perkin Elmer 2400 CHN (Perkin Elmer, España) y un LECO CHNS-932 (Leco Corporation, EEUU), pertenecientes al CAI Técnicas Físicas y Químicas de la UCM.

Las determinaciones por TG se utilizaron para determinar la cantidad de materia orgánica incorporada en los nanosistemas MSN@Gels y MSN@HA. Estos estudios se realizaron en un analizador Perkin Elmer Instruments Pyris Diamond TG/DTA (Perkin Elmer, España).

### **3.3 Estudio de estabilidad *in vitro* de los nanosistemas**

El estudio de la estabilidad coloidal de las nanoplateformas de partida (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>) en medio fisiológico, permitió evaluar la posible interacción de los nanosistemas con las proteínas

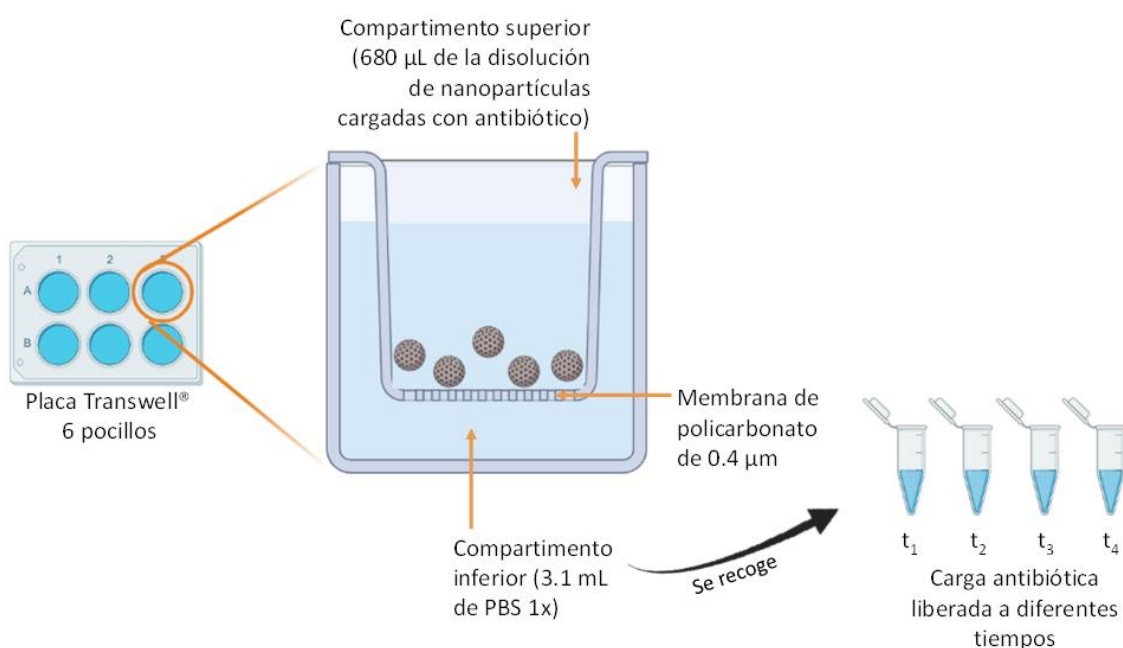
presentes en un medio biológico y la formación de una corona proteica [151]. Para ello, se investigaron posibles cambios en el  $D_H$  y en la carga superficial, determinado por DLS y potencial- $(\zeta)$  zeta respectivamente, de las nanopartículas en cultivo celular suplementado con suero fetal bovino, y a modo comparativo, se efectuaron ensayos de estabilidad en PBS 1x y  $H_2O$ . Para realizar los ensayos, se incubó 1 mg de MSN en 10 mL de medio de cultivo celular  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS de sus siglas en inglés), L-glutamina 1 mM y 1% penicilina-estreptomicina (penicilina 10000 unidades/mL, estreptomicina 10 mg/mL), a 37 °C, bajo agitación orbital a 80 rpm, durante 48 h [152]. Transcurrido este tiempo, las nanopartículas se separaron mediante centrifugación, se resuspendieron en 10 mL de  $H_2O$  y se diluyeron 1/10 con  $H_2O$  antes de efectuar las medidas de DLS y potencial- $(\zeta)$  zeta. Con fines comparativos, se realizó un experimento análogo en  $H_2O$  y PBS 0.1x en ausencia de FCS.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad biológica de la matriz de sílice en disolución acuosa tras cuatro días de liberación de los antibióticos. Para ello, se realizaron estudios de la morfología y el orden mesoestructural por TEM de los materiales MSN, MSN-NH<sub>2</sub> y MSN@Gels en PBS 1x (pH = 7.4), antes y después de los ensayos de liberación, descritos en la *sección 3.4*. (*vide infra*). La preparación de los materiales para su visualización por TEM se realizó siguiendo las indicaciones descritas en la *sección 3.2*. Como control durante los experimentos se utilizaron las MSN sin antibiótico.

Asimismo, se realizó un estudio de solubilidad de los recubrimientos de gelatina y HA por TEM, con el fin de evaluar su degradación en medio acuoso. El estudio de la degradación de la cobertura de gelatina en las muestras MSN@Gels se realizó antes y después de los ensayos de liberación, y requirió la tinción de las muestras con PTA al 1% para resaltar el recubrimiento orgánico de gelatina, tal y como se describe en la *sección 3.2*. En el caso de los nanosistemas MSN@HA, la solubilidad del recubrimiento de los nanocristales se ensayó siguiendo las condiciones descritas en la literatura [153]. Los recubrimientos de HA se evaluaron mediante TEM, y se efectuaron medidas de EDS para evaluar la relación molar Ca/P, Si/P y Si/Ca. Para ello, se preparó una disolución tampón acetato pH = 5.5. A continuación, se resuspendieron 5 mg del material MSN@HA en 5 mL del tampón, y se incubó en agitación orbital a 100 rpm y a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las nanopartículas se lavaron con  $H_2O$  y EtOH sucesivamente, y se secaron a 37 °C en la estufa de vacío. Finalmente, las nanopartículas se prepararon para su visualización por TEM siguiendo las indicaciones descritas en la *sección 3.2*.

### 3.4 Estudios de liberación *in vitro* de los diferentes fármacos

Se han llevado a cabo estudios de liberación *in vitro* con los diferentes materiales diseñados en esta tesis doctoral, con el fin de cuantificar la concentración de antibiótico liberado (LVX, GM y RIF) desde los nanosistemas a diferentes tiempos. Simultáneamente, se ha estudiado el comportamiento cinético de los distintos fármacos albergados (antibióticos y mucolítico), en los poros o en el recubrimiento de gelatina, mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo cinético. Para ello, se resuspendieron 10 mg de nanopartículas cargadas con antibiótico en 0.5 mL de PBS 1x. Seguidamente, se añadieron 680  $\mu$ L de esta suspensión al compartimento superior de un soporte permeable Transwell®, con una membrana de policarbonato de 0.4  $\mu$ m (placa Transwell® de 6 pocillos, Corning, EEUU) (Fig. 3.8). El pocillo inferior se llenó agregando 3.1 mL de PBS 1x, y la placa se incubó a 37 °C, bajo agitación orbital a 100 rpm y ausencia de luz [140]. Transcurridas 0.5, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 72 y 96 h, el PBS se recogió de la cámara inferior y se reemplazó por 3.1 mL de PBS fresco. Los productos de liberación se almacenaron a -80 °C, para preservar su actividad farmacológica hasta el momento de ser utilizados en posteriores ensayos.



**Fig. 3.8.** Representación esquemática del dispositivo Transwell® utilizado para realizar el ensayo de liberación *in vitro* de los antibióticos desde las diferentes nanoplataformas.

La concentración de antibiótico liberado se determinó utilizando la técnica espectroscópica más adecuada en cada caso:

- La cantidad de LVX liberado desde las MSN-LVX, MSN-NH<sub>2</sub>-LVX y los diferentes sistemas MSN@Gels se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello, se utilizó un

espectrofluorímetro Sinergy 4 BioTek (BioTek Instruments GmbH, Alemania), aplicando una longitud de onda de excitación  $\lambda_{\text{ex}} = 292 \text{ nm}$  y una longitud de onda de emisión  $\lambda_{\text{em}} = 494 \text{ nm}$ . Se realizó una curva de calibrado utilizando disoluciones patrón de LVX, con concentraciones comprendidas en el intervalo de 0.01 a 12  $\mu\text{g/mL}$ .

- La cantidad de GM liberada desde las muestras MSN-GM y MSN-NH<sub>2</sub>-GM se determinó mediante espectroscopía ultravioleta, siguiendo las indicaciones previamente descritas en la bibliografía [154]. La monitorización de GM se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC de sus siglas en inglés), en un sistema de análisis automático Alliance, compuesto por un módulo de separación (modelo #2695), acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (modelo #2696) y controlado por el software Empower2 (Waters, EEUU). Se empleó una bomba cuaternaria, con una fase móvil compuesta por acetonitrilo y H<sub>2</sub>O (grado de pureza para HPLC) (80:20, v/v), administrada con un flujo continuo de 1.0 mL/min a 25 °C. Durante el ensayo, se utilizó una columna de fase inversa X-Terra RP-18 de 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 3.9 mm (Waters, EEUU). El volumen de inyección empleado fue de 10  $\mu\text{L}$ , y se detectó a una  $\lambda = 211 \text{ nm}$ , con un tiempo total de cromatograma de 10 min. Se utilizaron como estándares un rango de concentraciones entre 1 y 2 mg/mL.
- La cantidad de RIF liberada desde MSN-RIF y MSN-NH<sub>2</sub>-RIF se cuantificó mediante espectroscopía ultravioleta en un espectrofluorímetro a una  $\lambda = 474 \text{ nm}$  (su máximo de absorción). La curva de calibrado se obtuvo utilizando estándares con concentraciones en el rango de 0.88 a 28.1  $\mu\text{g/mL}$ .

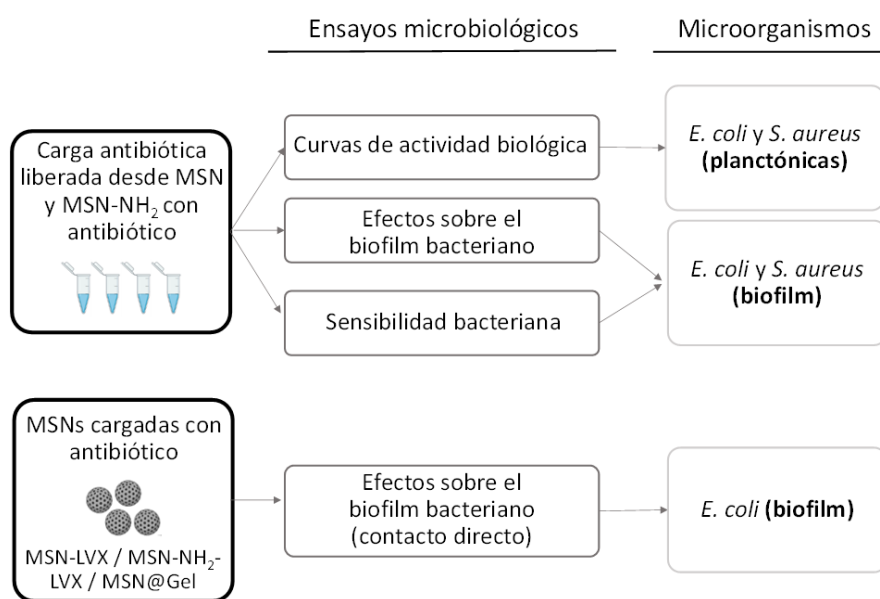
El estudio de la liberación, en medio acuoso, de la AC embebida en la cobertura de gelatina, se realizó empleando el nanosistema MSN@Gel<sub>FITC</sub>. Este sistema permitió estudiar la liberación de una molécula fluorescente (FITC) fácilmente detectable, y disponer así de unas nociones preliminares acerca de la liberación de moléculas desde la cobertura de gelatina. El estudio de la liberación de FITC se realizó siguiendo el protocolo descrito en esta misma *sección 3.4* para la liberación de los antibióticos. Se recogió la muestra trascurridas 0.5, 1, 2, 4, 20, 22, 43 y 45 h de ensayo para su posterior análisis. La concentración de FITC liberada se determinó mediante fluorescencia en un espectrofluorímetro con una  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  y una  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ .

Una vez determinadas las concentraciones de antibiótico liberadas a cada tiempo, se estudiaron las cinéticas de liberación para cada antibiótico y nanosistema. Los datos experimentales se ajustaron al modelo matemático más adecuado, para determinar los parámetros cinéticos característicos del comportamiento de cada antibiótico con el tiempo,

tales como la concentración máxima de fármaco liberada y la constante cinética de liberación, tal y como se verá en las secciones 4.1.3, 4.1.4 y 4.2.3 (*vide infra*).

### 3.5 Estudios de efectividad antimicrobiana en biofilms de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

El siguiente paso fue la evaluación de la capacidad antimicrobiana de los nanosistemas diseñados, cuyo protocolo es uno de los puntos más importantes en esta tesis doctoral. Tal y como se muestra en la **Fig. 3.9**, nos hemos centrado en primer lugar, en las cargas antibióticas liberadas para la determinación de su actividad biológica a partir de las dosis activas a cada tiempo ensayado y su posterior efecto sobre biofilms bacterianos. En segundo lugar, nos hemos centrado en los nanosistemas completos para determinar su efecto antibiofilm. Para los diferentes estudios microbiológicos se escogieron dos cepas de colección, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. El LVX se testó en ambas bacterias, debido a su amplio espectro de acción. Sin embargo, GM y RIF se ensayaron frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, debido a su acción más específica sobre estas bacterias.



**Fig. 3.9.** Esquema-resumen de los ensayos microbiológicos realizados, aplicados por un lado a la carga antibiótica liberada desde los nanosistemas y, por otro al nanosistema completo.

#### 3.5.1 Estudio de las cargas antibióticas liberadas

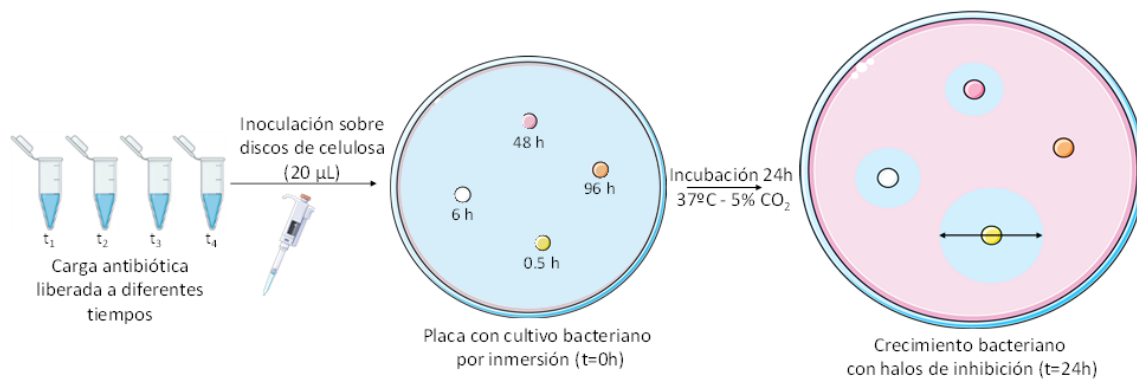
Para evaluar la efectividad antimicrobiana producida por las cargas antibióticas liberadas desde las MSNs, se repitieron los ensayos de liberación de los nanosistemas con antibiótico reemplazando, esta vez, el PBS por medio de cultivo líquido bacteriano Soja Triptona (TSB)

suplementado con 1% de glucosa. De esta forma, evitamos la muerte celular derivada de la elevada presencia de sales en el PBS que puede desembocar en un choque osmótico sobre el biofilm.

Se llevaron a cabo tres experimentos para el estudio de la efectividad antimicrobiana a partir de las cargas antibióticas liberadas desde MSN y MSN-NH<sub>2</sub> (cargadas con LVX, GM y RIF). El primero consistió en determinar las curvas de actividad biológica a partir de las dosis activas de antibiótico liberadas, en los periodos de tiempo establecidos. En el segundo se evaluó la capacidad antimicrobiana de dichas dosis activas en biofilms preformados. Por último, el tercero de los experimentos consistió en detectar posibles cambios en la sensibilidad de las bacterias procedentes de los biofilms tratados (**Fig. 3.9**).

#### **3.5.1.1 Determinación de las curvas de actividad biológica (dosis activas)**

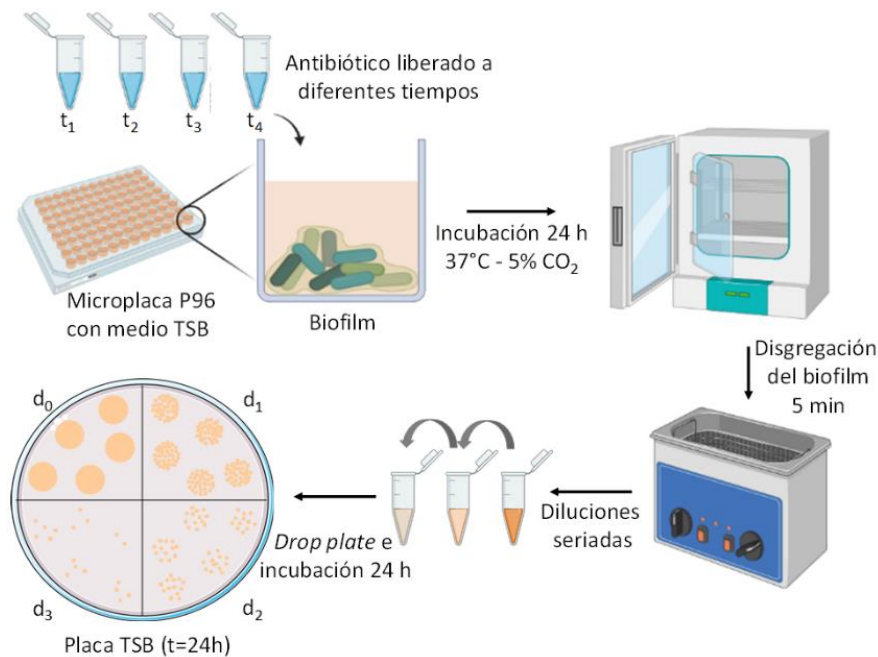
El estudio de la actividad biológica de los antibióticos LVX, GM y RIF liberados a partir de las MSN y MSN-NH<sub>2</sub> permitió determinar la dosis activa, concretamente la porción biológicamente activa integrada en la carga antibiótica liberada a los diferentes tiempos de ensayo (0.5, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 72 y 96 h), y de esta forma obtener las curvas de actividad biológica para cada uno de los antibióticos. La determinación de las dosis activas se realizó mediante el *test de difusión de disco* para cada bacteria y antibiótico, utilizando un método descrito en la literatura [155] (**Fig. 3.10**). Para ello, se preparó un cultivo por inmersión, mezclando 100 mL de medio antibiótico Difco™ 2, con 10 mL de una suspensión 1x10<sup>8</sup> CFU/mL de *E. coli* y *S. aureus* por separado, utilizando H<sub>2</sub>O esterilizada. La suspensión se repartió en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro, añadiendo 20 mL a cada una. Las placas se incubaron durante 5 minutos a 25 °C hasta que el agar se solidificó. A continuación, se añadieron 20 µL de las diferentes cargas antibióticas liberadas a diferentes tiempos desde las MSNs sobre discos de celulosa Whatman® (Whatman plc, Reino Unido) de 6 mm de diámetro. Finalmente, los discos cargados con antibiótico se colocaron en el centro de las placas con agar, y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una estufa con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las dosis activas se estimaron midiendo el diámetro de la zona o halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco cargado. Para obtener la recta de calibrado, se impregnaron los discos con disoluciones conocidas de antibiótico en H<sub>2</sub>O, en el intervalo de concentraciones entre 0.125 y 32 µg/mL [68]. Las curvas de actividad biológica obtenidas se ajustaron a un modelo matemático, que permitió determinar los parámetros cinéticos de constante cinética y la cantidad máxima de antibiótico activo liberado desde los distintos nanosistemas (ver *sección 4.1.4.1*).



**Fig. 3.10.** Test de difusión de disco para la determinación de las curvas de actividad biológica

### 3.5.1.2 Efecto sobre el biofilm bacteriano

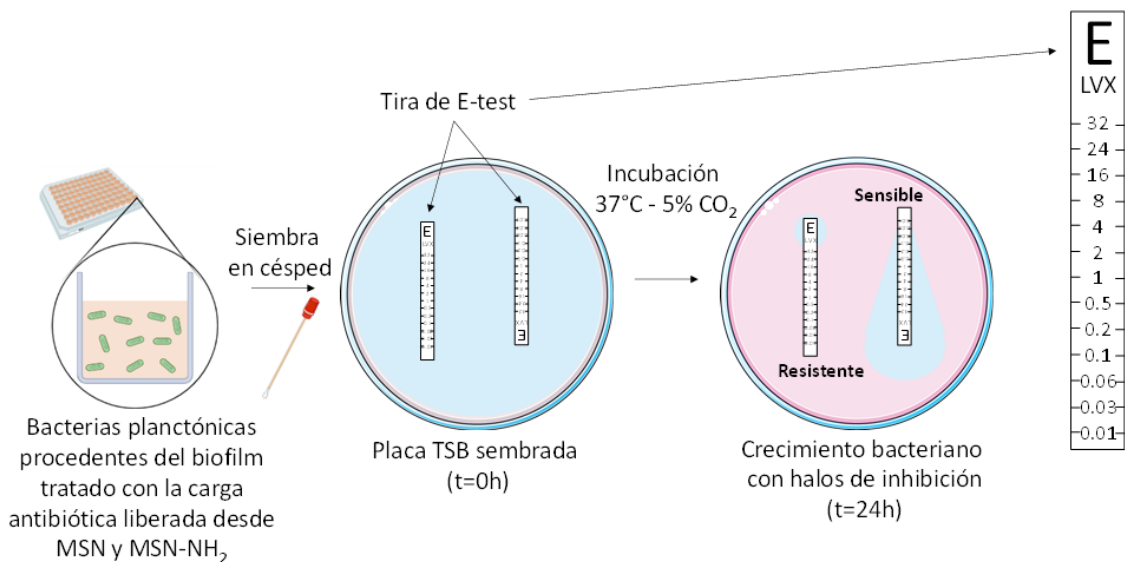
Se realizó un estudio del efecto antimicrobiano de las dosis activas de LVX, GM y RIF liberadas desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, con el fin de estudiar la capacidad de estas dosis antibióticas para erradicar los biofilms de *E. coli* y *S. aureus*. Los ensayos con biofilms se realizaron siguiendo las recomendaciones de Stepanovic *et al* [156] en la elección de inóculo, medios de cultivo o tiempos de incubación para la preparación y el posterior estudio sobre los biofilms bacterianos. Para ello, se prepararon biofilms de ambas bacterias en medio TSB, añadiendo 1x10<sup>8</sup> CFU/mL a cada pocillo, e incubando la placa durante 48 h en estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron sobre el biofilm, 100 µL de las cargas antibióticas liberadas desde las MSN y MSN-NH<sub>2</sub> recogidas a los diferentes tiempos. La placa se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y, tras este tiempo, los biofilms se lavaron con PBS y se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 5 min para disgregar el biofilm [42], [45]. A continuación, se realizaron diluciones seriadas del biofilm disgregado, y se sembraron en placas de medio de cultivo Soja Triptona Agar (TSA) utilizando la técnica *drop plate* [157]. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se realizó el recuento de las colonias para determinar el número de CFU/mL para cada uno de los tiempos de liberación testados (**Fig. 3.11**). El pocillo correspondiente al control negativo solo contenía medio estéril. El experimento se repitió seis veces para cada antibiótico/cepa.



**Fig. 3.11.** Etapas del proceso experimental para la determinación del efecto antibiofilm de las dosis activas liberadas sobre biofilms bacterianos. Las CFU/mL se obtienen mediante la siembra de las diluciones en placas de TSA utilizando la técnica de *drop plate*. ( $d_x$  = dilución sembrada siendo  $d_0$ , la suspensión bacteriana original,  $d_1$  la dilución 1/10,  $d_2$  la dilución 1/100,  $d_3$  la dilución 1/1000 y  $d_4$  la dilución 1/10000).

### 3.5.1.3 Estudios de sensibilidad bacteriana

El uso inadecuado de antibióticos deriva en la aparición de bacterias resistentes, que disminuyen la eficacia del tratamiento sobre las infecciones [158]. Por ello, se realizó un estudio de sensibilidad bacteriana para evaluar la aparición de posibles cepas resistentes. En este sentido, se utilizaron bacterias procedentes de los biofilms tratados con las diferentes dosis activas para cada uno de los antibióticos estudiados, utilizando un test de tiras *E-test* [128]. Para ello, las diferentes cargas liberadas a las 2, 24 y 96 h desde los diferentes nanosistemas (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>) se pusieron en contacto durante 24 h sobre biofilms preformados de 48 h de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. A continuación, los biofilms se lavaron con PBS, se añadieron 200  $\mu$ L de medio TSB, y se sonicaron durante 5 min para su disgregación. Las bacterias resultantes (bacterias planctónicas) se incubaron durante 4 h a 37 °C en una estufa con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Tras ese tiempo, dichas bacterias se sembraron en césped en placas de medio Müeller Hinton, y se añadió una tira *E-test* impregnada con un gradiente conocido de antibiótico, incubándose durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se registró el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI de sus siglas en inglés) antes y después del tratamiento, para compararlos y detectar la aparición de resistencias (**Fig. 3.12**).



**Fig. 3.12.** Procedimiento experimental para el ensayo de sensibilidad bacteriana mediante tiras de *E-test* con gradientes conocidos de antibiótico. La presencia de un halo de inhibición de crecimiento representa sensibilidad hacia el antibiótico mientras que la ausencia de halo indica resistencia al antibiótico testado.

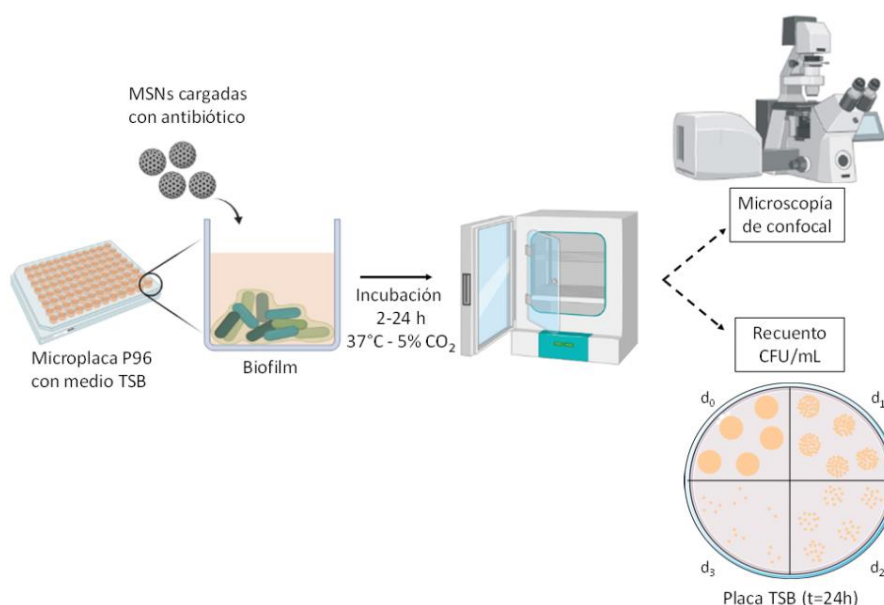
### 3.5.2 Estudio directo de los *nanoantibióticos* sobre biofilms preformados

Una vez evaluado el efecto antimicrobiano de las dosis activas liberadas, se procedió al estudio del efecto directo de los nanosistemas completos (materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> cargados con antibiótico y MSN@Gels) sobre biofilms preformados. El efecto antibiofilm se evaluó visualmente y de forma semicuantitativa mediante microscopia de barrido láser confocal (Olympus FV1200, Japón), mientras que se evaluó de manera cuantitativa mediante el recuento de las CFU/mL (**Fig. 3.13**) para cada uno de los materiales. En estos estudios se utilizó como modelo la cepa de *E. coli* formando biofilms de 48 h. Para ello, se añadieron 200 µL de una suspensión 1x10<sup>7</sup> CFU/mL en TSB a cada pocillo. La placa se incubó en estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez formados, se lavaron con PBS 1x y se añadieron 200 µL de los diferentes nanosistemas resuspendidos en TSB.

Los biofilms destinados al estudio de microscopia confocal se trataron con los sistemas MSN-L@Gel, MSN-L@Gel<sub>L</sub>, MSN-L@Gel<sub>AC</sub>, MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub> y MSN@Gel<sub>AC</sub> con el fin de evaluar el efecto del LVX y/o la AC sobre la matriz y la viabilidad celular. Para ello, se incubaron los biofilms durante 24 h con los nanosistemas, se lavaron con PBS y se agregaron 0.5 mL de TSB. A continuación, los biofilms se trataron con 1.5 µL del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® *BacLight*™, compuesto por las tinciones yoduro de propidio y SYTO®9, para diferenciar entre bacterias vivas/muertas mediante fluorescencia. Tras 5 min de incubación, se añadieron 5 µL de Calcofluor White Stain para teñir la matriz de polisacáridos. Finalmente, las biopelículas se monitorizaron mediante microscopía de barrido láser confocal con una  $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm} / \lambda_{em} = 610$

nm para el yoduro de propidio a través del filtro FITC, una  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}/\lambda_{em} = 635 \text{ nm}$  para el SYTO® con el filtro Texas Red® y  $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}/\lambda_{em} = 433 \text{ nm}$  para la tinción con Calcofluor White [107]. Como resultado se obtuvieron imágenes del biofilm con diferentes áreas de color, destacando en azul la matriz polisacárida del biofilm, en color verde las bacterias vivas y en rojo las bacterias muertas. Se utilizó el programa FIJI (Image J, EEUU) para analizar digitalmente estas imágenes, con el fin de cuantificar cada una de las áreas de color y determinar posibles variaciones entre los diferentes nanosistemas MSN@Gels.

Posteriormente, la determinación del efecto directo de los *nanoantibióticos* se evaluó mediante un estudio exhaustivo de la viabilidad celular a partir del recuento de las CFU/mL para cada uno de los materiales testados, siguiendo las indicaciones de la *sección 3.5.1.2*. En este caso, los biofilms de 48 h de *E. coli* se trataron con 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los nanosistemas MSN-LVX y MSN-NH<sub>2</sub>-LVX, y 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los materiales MSN@Gels. Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, y los biofilms se analizaron tras 2 y 24 h de incubación (solo 24 h en el caso de las MSN@Gels) (**Fig. 3.13**). Como control negativo se utilizaron 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los materiales sin antibiótico (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>), y como control positivo, se administraron directamente  $\approx 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LVX, equivalente a la concentración máxima de antibiótico liberada por los nanosistemas a las 24 h (determinada en los ensayos de liberación). Todos los ensayos incluyeron controles con medio de cultivo estéril únicamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.



**Fig. 3.13.** Proceso experimental para la determinación del efecto antibiofilm de los nanosistemas MSN-LVX, MSN-NH<sub>2</sub>-LVX y el material MSN@Gels en contacto directo con biofilms de *E. coli* mediante microscopía de confocal y el cálculo de CFU/mL. ( $d_x$  = dilución sembrada siendo  $d_0$ , la suspensión bacteriana original,  $d_1$  la dilución 1/10,  $d_2$  la dilución 1/100,  $d_3$  la dilución 1/1000 y  $d_4$  la dilución 1/10000).

## **3.6 Estudios celulares *in vitro* con células preosteoblásticas murinas**

### **3.6.1 Estudios de biocompatibilidad**

Dado que se pretende aplicar los nanosistemas diseñados en esta tesis doctoral al tratamiento de la infección ósea, se evaluó su biocompatibilidad sobre células de hueso. Estos estudios aportan información sobre la respuesta de un material en un medio biológico para su posterior uso en aplicaciones clínicas. En este sentido, se ha evaluado la biocompatibilidad a través del estudio de la viabilidad y el ciclo celular tras el contacto directo entre los diferentes materiales y las células óseas. Para los diferentes estudios, se han utilizado preosteoblastos de ratón de la línea celular MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™).

#### **3.6.1.1 Viabilidad celular**

Los estudios de viabilidad celular se realizaron siguiendo un procedimiento ya descrito en la literatura [159], utilizando los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> con antibiótico, MSN@Gels y MSN@HA. Para ello se utilizó una placa de 96 pocillos, donde se añadió una suspensión de 5000 células en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con FCS, glutamina y antibiótico a cada pocillo. Tras 24 h de incubación en una estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, las células se trataron con los diferentes nanosistemas diseñados en un rango de concentraciones entre 10 y 200  $\mu$ g/mL. En un intervalo de tiempo entre 2 y 4 h de incubación en la estufa, las células se lavaron tres veces con PBS 1x para eliminar las nanopartículas y se incubaron en medio de cultivo fresco. La proliferación celular de los ensayos con MSN@HA se examinó tras 24 y 48 h de incubación, mientras que el resto de los materiales se analizaron tras 24 h y 96 h. Como control, se utilizaron los materiales sin antibiótico (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>). La viabilidad celular se determinó midiendo la densidad óptica mediante un ensayo de MTT utilizando azul de tiazolil tetrazolio bromuro [160] o mediante fluorescencia empleando una disolución de Alamar Blue® al 10% (v/v) con una  $\lambda_{ex}$  = 570 nm y una  $\lambda_{em}$  = 585 nm [161], siguiendo las instrucciones del fabricante en ambos casos. El estudio de viabilidad celular se realizó en un espectrofluorímetro Synergy 4 BioTek. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **3.6.1.2 Ciclo celular**

Para detectar cambios en las diferentes fases del ciclo celular, producidos por el contacto con los *nanoantibióticos*, y que pueden influir en la viabilidad de las células preosteoblásticas, se llevó a cabo un estudio mediante citometría de flujo, siguiendo la metodología descrita en la literatura [162]. Para el ensayo, se seleccionó el sistema completo MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub> por contener todos los componentes que pueden influir en el ciclo celular. Para llevar a cabo este estudio, se sembraron las células en una placa de 6 pocillos, añadiendo 1x10<sup>6</sup> células en cada pocillo en

medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con FCS, glutamina y antibiótico. Tras 24 h de incubación en la estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, las células se trataron con el nanosistema MSN-L@Gel<sub>LAC</sub> a las concentraciones de 10, 25, 50 y 75  $\mu$ g/mL, y se incubaron durante 24 h en una estufa. A continuación, las células se desprendieron de la placa mediante una disolución de tripsina-EDTA. Tras 5 min de incubación, la reacción se detuvo añadiendo medio de cultivo, las células se lavaron con PBS 1x, se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en PBS y se añadió EtOH absoluto frío, gota a gota, mientras la placa era sometida a agitación orbital. La placa se incubó 20 min a 25 °C y, posteriormente, las células se centrifugaron y se resuspendieron con una mezcla de PBS 1x con 50 mg/mL de yoduro de propidio y 100 mg/mL de RNasa A. La mezcla se incubó 20 min a 25 °C protegida de la luz. El análisis del ciclo celular se realizó mediante la detección de la fluorescencia del yoduro de propidio siguiendo las condiciones de la *sección 3.5.2* en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, EEUU). Este equipo está situado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica del ICTS Microscopía de la UCM. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **3.6.2 Estudios de diferenciación celular**

Los estudios de diferenciación celular se han realizado con el nanosistema MSN@HA debido al efecto osteoregenerador que presenta la HA. La presencia de HA en el exterior de los nanosistemas, una vez internalizados en los preosteoblastos, favorecería su diferenciación a osteoblastos. Por ello, se han llevado a cabo dos estudios con el fin de evaluar, en primer lugar, el grado de internalización de los nanosistemas MSN@HA y, en segundo lugar, su capacidad para impulsar la diferenciación en las células MC3T3-E1.

#### **3.6.2.1 Evaluación de la internalización**

El estudio del grado de internalización del nanosistema MSN@HA en las células preosteoblásticas se realizó siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía [163]. Para ello, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos, añadiendo a cada pocillo 10000 células/cm<sup>2</sup> suspendidas en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con FCS, glutamina y antibiótico. Tras 24 h de incubación en una estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, las células se pusieron en contacto con 10, 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL del nanosistema MSN@HA durante 4 h a 37 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS 1x para eliminar las nanopartículas no internalizadas, y se incubaron con disolución de tripsina-EDTA para el desprendimiento de las células. Tras 5 min, la reacción se detuvo con medio de cultivo fresco, y las células se centrifugaron y resuspendieron de nuevo en medio fresco. Posteriormente, se añadió azul tripán (0.4%) para extinguir la fluorescencia de la superficie de las células y registrar únicamente la señal fluorescente intracelular. La internalización se monitorizó mediante

fluorescencia en un citómetro de flujo FACSCan (Becton Dickinson, EEUU) con una  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ . Las condiciones para la adquisición y análisis de datos se establecieron utilizando el Programa CellQuest de Becton-Dickinson, y estas condiciones se mantuvieron durante todos los ensayos. Este equipo está situado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica del ICTS Microscopía de la UCM. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **3.6.2.2 Diferenciación osteoblástica**

Una vez determinado el grado de internalización del nanosistema MSN@HA, se analizó su capacidad para favorecer la diferenciación osteoblástica en las células MC3T3-E1. Esta evaluación se llevó a cabo mediante el estudio del grado de mineralización y la expresión génica de los genes relacionados con la diferenciación osteoblástica. Para estudiar el grado de mineralización, se siguió el procedimiento descrito en la literatura [164]. Para ello, se sembraron 10000 células/cm<sup>2</sup> en los pocillos de una placa de 6 pocillos en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con FCS, glutamina y antibiótico, y, tras 24 h de incubación a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, las células se trataron con 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  del nanosistema MSN@HA durante 4 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS 1x para eliminar las nanopartículas no internalizadas, y se incubaron en medio fresco durante 10 días. Tras ese tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con rojo de alizarina durante 30 min. Finalmente, la tinción se disolvió con una disolución de cloruro de cetilpiridina 10% en fosfato de sodio 10 mM pH = 7 y, se midió el grado de mineralización mediante absorbancia a una  $\lambda = 620 \text{ nm}$  en un espectrofluorímetro.

De forma paralela, se estudió la expresión génica de los genes Runx2 y Alp, relacionados con la diferenciación osteoblástica mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR de sus siglas en inglés), en un equipo de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), tal y como se describe en la bibliografía [165]. Para ello, se repitió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la diferenciación celular, pero con un tiempo de incubación de las células de 5 días, tras la eliminación de las nanopartículas no internalizadas mediante los lavados con PBS. A continuación, se aisló el ARN total de estas células mediante un procedimiento estándar TRIzol y se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc), utilizando un kit de ARN a ADNc de alta capacidad. Para realizar el ensayo de qPCR, se utilizaron cebadores específicos (Assay-by-Design<sup>SM</sup>, Thermo Fisher Scientific, EEUU) de ratón sin marcar para los genes Runx2, Alp y la polimerasa TaqMan MGB. Los números de copias de ARNm se calcularon para cada muestra utilizando el valor del umbral de ciclo (Ct). Como control, se amplificó el gen codificante para la gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH) en paralelo con los genes probados. El experimento se realizó por triplicado.

### **3.7 Análisis estadísticos**

Los datos derivados de los diferentes ensayos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar ( $\sigma$ ) de las diferentes medidas. Se eligió un método paramétrico o no paramétrico según la normalidad de los datos obtenidos. Aquellos datos que no siguieron una distribución normal ( $\sigma$  dos veces mayor que la media) se analizaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Mediante este método se analizaron los resultados derivados del efecto de la carga antibiótica liberada sobre el biofilm bacteriano, comparando el control con los diferentes tiempos estudiados. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa R 3.6.0 (R Foundation for Statistical Computing, Austria), en cambio, los resultados con una distribución normal se analizaron mediante la prueba t-student. Los resultados relacionados con bacterias se analizaron con el programa Origin (OriginLab, EEUU), mientras que los resultados celulares, se analizaron mediante el programa Graphpad Prism (Graphpad Software, EEUU). En todos los casos, se consideró significativo un nivel de significación estadística de  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 MSNs como nanosistemas dosificadores de antibióticos

En este apartado se discuten los resultados derivados del estudio de los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub> como dosificadores de diferentes antibióticos de elección (LVX, GM y RIF) y su posterior efecto sobre biofilms de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En primer lugar, nos centraremos sólo en las dosis liberadas desde cada nanosistema y para cada antibiótico. Para ello, se determinarán por un lado las curvas de actividad biológica a partir de las dosis activas de antibiótico a diferentes tiempos, el efecto de estas dosis sobre un biofilm preformado y la posible aparición o no de resistencias bacterianas. En segundo lugar, se estudiará el efecto directo del nanosistema completo con el fin de dilucidar la influencia del nanosistema en el tratamiento antimicrobiano. Finalmente, se realizarán estudios de biocompatibilidad *in vitro* de estos nanosistemas a diferentes dosis en presencia de osteoblastos. Esta sección 4.1 se divide en tres bloques que comprenden, en primer lugar, la caracterización completa de las MSNs y los nanosistemas con antibiótico (secciones 4.1.1, 4.1.2 y 4.1.3). En segundo lugar, se estudiará la efectividad antimicrobiana sobre bacterias de *E. coli* y *S. aureus* (sección 4.1.4). Finalmente se realizarán estudios *in vitro* de biocompatibilidad celular con preosteoblastos MC3T3-E1 (sección 4.1.5). Los resultados obtenidos en esta sección se recogen en el artículo de investigación *Impact of the antibiotic-cargo from MSNs on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms* publicado en la revista *Microporous and Mesoporous Materials* (2021) [159].

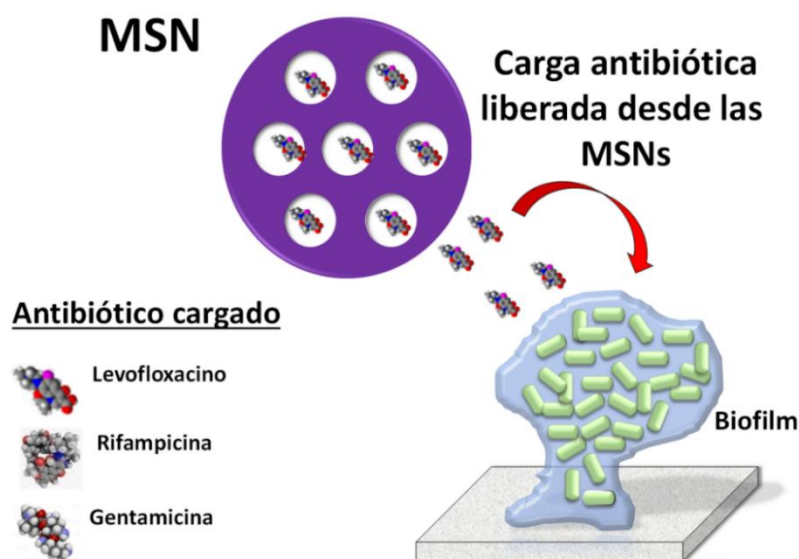
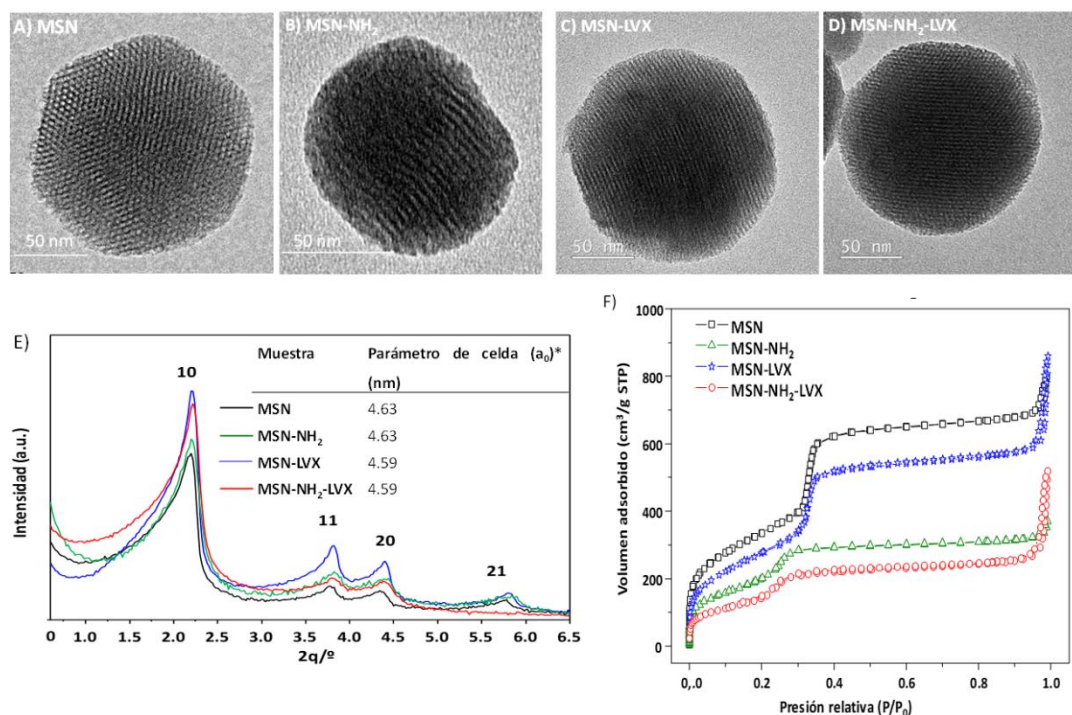


Fig. 4.1. Resumen gráfico del objetivo antibiofilm de los nanosistemas cargados con diferentes antibióticos.

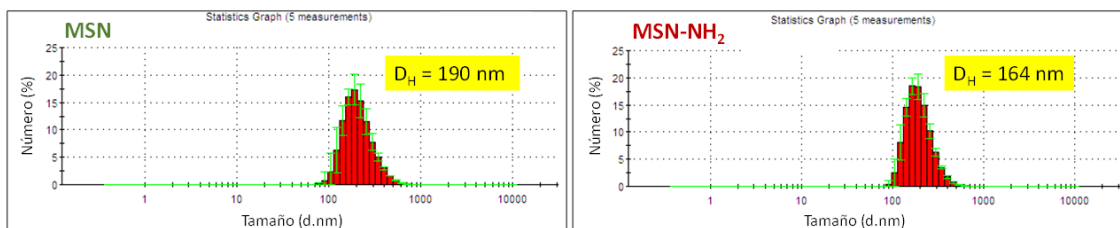
### 4.1.1 Caracterización de los nanosistemas basados en MSN

La caracterización físico-química de los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, antes y después de los procesos de funcionalización superficial y de carga de los antibióticos LVX, GM y RIF, se llevó a cabo utilizando las técnicas de XRD, TEM, DLS, porosimetría de adsorción de N<sub>2</sub>, FTIR, AQE y potencial-( $\zeta$ ) zeta, tal y como se describe en la *sección 3.2 del procedimiento experimental*. En cuanto a la caracterización estructural por XRD y TEM de los materiales de partida (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>), los resultados obtenidos muestran la obtención de nanopartículas quasiesféricas con un tamaño de aproximadamente 150-200 nm. En cuanto a la estructura mesoporosa, las imágenes TEM (**Fig. 4.2, A-D**) evidencian la presencia de un orden mesoporoso en forma de panal típico de la estructura MCM-41 con poros ordenados en el sistema 2D hexagonal. Dicha estructura y morfología no se ve afectada tras la funcionalización con grupos aminos (-NH<sub>2</sub>) lo cual se pone de manifiesto en la **Fig. 4.2 A y B** y en el parámetro de celda unidad  $a_0$  que se mantiene constante (**Fig. 4.2-E**). Después de la carga, ambas matrices mantienen tanto su morfología como su estructura mesoporosa (**Fig. 4.2 C y D**), habiendo una disminución en el parámetro de red  $a_0$ , posiblemente debido a la disminución del tamaño de poro tras la carga antibiótica (**Fig. 4.2-E**).



**Fig. 4.2.** Imágenes de TEM correspondientes a A) MSN, B) MSN-NH<sub>2</sub>, C) MSN-LVX y D) MSN-NH<sub>2</sub>-LVX. E) Diagramas de XRD de las MSNs (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>) antes y después de ser cargadas con LVX. Las reflexiones se han indexado asumiendo una estructura de poros 2D hexagonal (simetría  $p6mm$ ). Los parámetros de red de la celda unidad se muestran en una tabla a partir del espaciado interplanar  $d_{10}$  y calculado a partir de  $a_0 = 2d_{10}/\sqrt{3}$ . F) Isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de las MSNs antes y después de la carga con LVX.

Asimismo se ha determinado el tamaño hidrodinámico de las muestras antes y después de la funcionalización superficial mediante análisis DLS en agua milli-Q. Los resultados, reflejados en la **Fig. 4.3**, mostraron distribuciones de tamaño comprendidos entre 160 y 190 nm, independientemente de la funcionalización de la superficie y se corrobora con los resultados obtenidos por TEM mostrando nanopartículas de forma quasiesférica con un diámetro promedio de aprox. 150-200 nm (**Fig. 4.2, A y B**). Este hecho indica que el proceso de funcionalización no altera significativamente el tamaño de la nanopartícula.



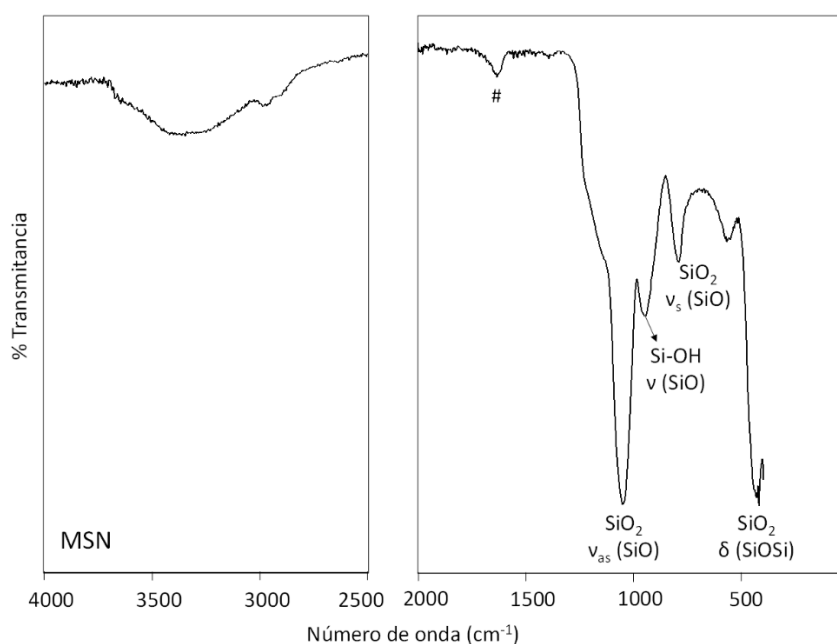
**Fig. 4.3.** Medidas del tamaño hidrodinámico de los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en agua milli-Q mediante DLS.

El estudio de las propiedades texturales de los diferentes nanosistemas (MSN y MSN-NH<sub>2</sub>), antes y después del proceso de carga antibiótica, se realizó mediante medidas de porosimetría de adsorción de N<sub>2</sub>. En todos los casos, se obtuvieron isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> típicas de materiales mesoporosos tipo MCM-41 con poros cilíndricos paralelos (**Fig. 4.2-F**) [78]. El tratamiento de los datos obtenidos permitió determinar los principales parámetros texturales, concretamente,  $S_{BET}$ ,  $V_p$  y  $D_p$ , cuyos resultados se recogen en la **Tabla 4.1**. Se observa que todos estos parámetros experimentan una disminución en la muestra MSN-NH<sub>2</sub> en comparación con las MSN. Esta disminución podría atribuirse al bloqueo parcial de las entradas de los poros por los grupos amino (-NH<sub>2</sub>), hecho ya descrito en diversas publicaciones científicas [140], [166], lo que avalaría, de nuevo, el éxito de la incorporación de grupos amino a la superficie de sílice [82]. Tras la carga de los antibióticos GM y RIF, los dos tipos de MSNs experimentaron una reducción en los valores de  $V_p$  y  $D_p$ , lo que confirmaría la incorporación de las moléculas de antibiótico en el interior de las cavidades mesoporosas (**Tabla 4.1**), tal y como mostraron los resultados de AQE. Este efecto fue más notable en el caso de las MSN-NH<sub>2</sub>, donde  $V_p$  experimentó una disminución del 94% y 65% después de la carga de GM y RIF, respectivamente. Por el contrario, después de la carga de LVX, ni  $V_p$  ni  $D_p$  experimentaron variaciones significativas en ninguno de los dos nanosistemas.

**Tabla 4.1.** Parámetros texturales de las diferentes MSNs sintetizadas en este trabajo, obtenidas mediante porosimetría de adsorción de N<sub>2</sub>.

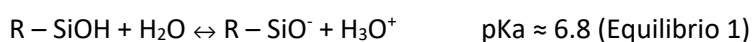
Muestra	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>P</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	D <sub>P</sub> (nm)
MSN	1237	1.1	2.8
MSN-NH <sub>2</sub>	786	0.5	2.3
MSN-LVX	1038	0.9	2.8
MSN-NH <sub>2</sub> -LVX	644	0.4	2.3
MSN-GM	397	0.2	2.2
MSN-NH <sub>2</sub> -GM	26	~0	-
MSN-RIF	655	0.5	2.5
MSN-NH <sub>2</sub> -RIF	25	~0	-

Dentro de la caracterización química de las MSNs, el estudio por espectroscopía de FTIR permitió detectar la presencia de sílice amorfa en las MSN, por la presencia de las bandas vibracionales entre 500-1090 cm<sup>-1</sup> correspondientes los enlaces Si-O y la banda a 950 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los grupos -SiOH (silanol) (**Fig. 4.4**) [167]. Además, la ausencia de bandas entre 1400-1700 cm<sup>-1</sup> y 2800-3000 cm<sup>-1</sup>, confirmaron la correcta extracción del surfactante del interior de los poros. También, se confirmó la presencia de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) en los nanosistemas MSN-NH<sub>2</sub> reflejado por la aparición de la banda de tensión νNH a 3368 cm<sup>-1</sup> y de flexión δNH a 1595 cm<sup>-1</sup> (datos no mostrados).

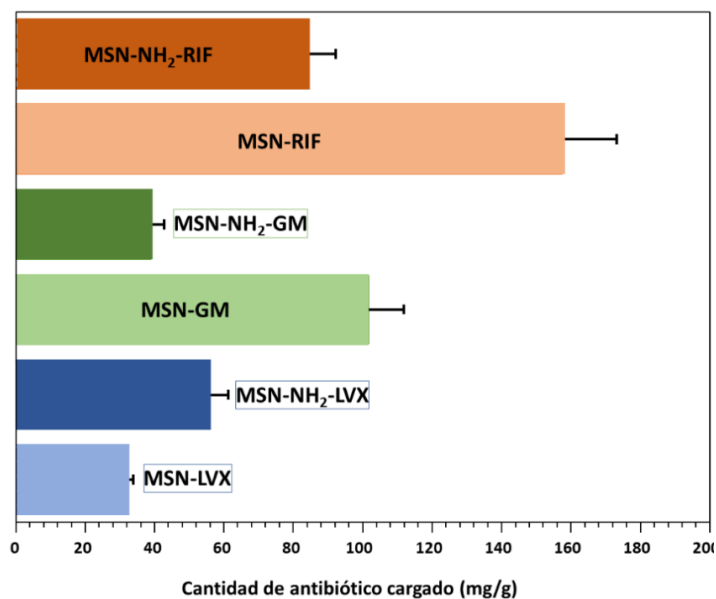


**Fig. 4.4.** Espectro de FTIR (regiones 4000-2500 cm<sup>-1</sup> y 2000-400 cm<sup>-1</sup>) del nanosistema MSN. # banda correspondiente al agua fisisorbida.

Las medidas de potencial-( $\zeta$ ) zeta proporcionaron valores de aproximadamente -35 mV y +35 mV para MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, respectivamente. Dado que el potencial- $\zeta$  (zeta) está directamente relacionado con el valor de carga superficial, el valor negativo de las MSN se debe a la presencia de grupos silanol desprotonados (-SiO<sup>-</sup>, pKa  $\approx$  6.8; *Equilibrio 1*) en la superficie de las MSN. Por otro lado, la evolución de valores negativos a positivos en el material MSN-NH<sub>2</sub> concuerda con la presencia de grupos amino protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, pKa  $\approx$  10.4; *Equilibrio 2*) en la superficie de estas nanopartículas [166]. Estos valores, en concordancia con los espectros de FTIR, evidencian la exitosa funcionalización superficial de las MSNs con grupos -NH<sub>2</sub>.



Asimismo, los resultados del análisis de AQE confirmaron el éxito de la funcionalización, mostrando un aumento en la cantidad de nitrógeno para las muestras MSN-NH<sub>2</sub>, con un porcentaje de funcionalización de aprox. el 60%. El AQE también permitió cuantificar la cantidad de antibiótico incorporado a los nanosistemas (**Fig. 4.5**). Los resultados obtenidos muestran diferencias en la carga antibiótica en función del antibiótico y la matriz, los cuales pueden explicarse en base a las diferentes interacciones matriz-droga que tienen lugar. Para explicar estos resultados, la **Fig. 3.3** de la *sección 3.1.3* muestra la estructura y principales propiedades químicas de los tres antibióticos utilizados. Para los nanosistemas sin funcionalizar (MSN), las cargas antibióticas de GM y RIF fueron mayores que para LVX. En el caso de la GM, en las condiciones de carga existe una gran interacción entre los grupos amino protonados de la molécula de GM (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y los grupos silanol desprotonados de la matriz (-SiO<sup>-</sup>), lo cual explicaría esta mayor carga. Al comparar la carga de RIF y LVX, se debe considerar la naturaleza anfótera de ambos antibióticos (**Fig. 3.3** de la *sección 3.1.3*). En este caso, las interacciones que tendrían lugar entre la matriz y ambos antibióticos tendrían que ser similares entre el grupo amino de la piperazina presente en ambas moléculas y los grupos silanol en la superficie de las MSN. Sin embargo, la mayor acidez del grupo hidroxilo (-OH) de la RIF (pKa 1.7) en comparación con la acidez del grupo carboxílico (-COOH) del LVX (pKa 5.59) promovería interacciones tipo enlace de hidrógeno más fuertes con el -SiOH de las MSN. Este hecho apoyaría la mayor carga de fármaco en el caso de MSN-RIF en comparación con el de MSN-LVX.



**Fig. 4.5.** Cantidad de antibiótico cargado en muestras de MSN y MSN-NH<sub>2</sub> determinada por análisis químico elemental

Con respecto a las muestras MSN-NH<sub>2</sub>, las cargas de antibiótico más altas se encontraron para RIF y LVX, debido a las interacciones atractivas entre los grupos amino de la matriz funcionalizada y los grupos ácidos presentes en estos dos antibióticos. Nuevamente, el carácter ácido más fuerte del grupo -OH en RIF en comparación con la acidez de -COOH en LVX (**Fig. 3.3** de la *sección 3.1.3*) produciría las cargas de antibiótico más altas en MSN-NH<sub>2</sub>-RIF. Sin embargo, este hecho, no explicaría, a primera vista, la brusca disminución de las propiedades texturales observadas en MSN-NH<sub>2</sub> en comparación con las MSN después de la carga de GM y RIF (**Tabla 4.1**). Estos resultados pueden entenderse teniendo en cuenta la propia ruta de funcionalización post-síntesis, que conduce a una unión predominante de los grupos orgánicos a la superficie externa de los mesoporos [82]. Por lo tanto, las moléculas de aminoglucósidos penetrarían en las cavidades mesoporosas para interactuar a través de enlaces de hidrógeno con los grupos silanol (-SiOH) presentes sin reaccionar principalmente en la superficie del poro interno de MSN-NH<sub>2</sub>. Por el contrario, LVX es una fluoroquinolona que exhibe carácter hidrófobo y ácido [168], que tiende a interactuar con los grupos aminopropilo básicos presentes principalmente en la superficie de los mesoporos externos de MSN-NH<sub>2</sub>. Estos resultados están de acuerdo con la preservación de los parámetros texturales, principalmente V<sub>p</sub> y D<sub>p</sub>, después de que MSN-NH<sub>2</sub> se someta al procedimiento de carga de LVX. A la vista de estos resultados, se puede concluir que las diferentes interacciones huésped-anfitrión son las fuerzas impulsoras que gobiernan la carga de antibióticos en las MSNs y también se prevé que desempeñen un papel clave en los perfiles de liberación de fármacos y su disponibilidad, como veremos a continuación.

#### 4.1.2 Evaluación de la estabilidad *in vitro* en condiciones fisiológicas

Dado que los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> se han diseñado para su utilización como nanosistemas dosificadores de diferentes fármacos en medios biológicos, es importante evaluar su interacción con el medio biológico y su estabilidad *in vitro* con el tiempo. A continuación, se muestran los resultados de los ensayos de estabilidad, descritos en la *sección 3.3*, en términos de formación de una corona proteica y degradación final del nanosistema determinados por medidas de DLS y TEM.

Los resultados de estabilidad coloidal de los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub> a partir de los valores de D<sub>H</sub> registrados por DLS, muestran un incremento del D<sub>H</sub> del 41% y 21%, respectivamente, tras 48 h en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (10% FCS) en comparación con los resultados obtenidos con el medio PBS (0% FCS). Esto es coherente con la conocida tendencia de este tipo de nanotransportadores de agregarse y experimentar una adsorción de proteínas inespecíficas (formación de una “corona de proteínas”) cuando se encuentran en un medio biológico complejo [151], [169]. Además, las mediciones del potencial-( $\zeta$ ) zeta de las MSN en diferentes medios, concretamente, agua, PBS y  $\alpha$ -MEM (10% FCS), mostraron valores de carga superficial sustancialmente menos negativos tras la incubación en  $\alpha$ -MEM (10% FCS), lo cual es coherente con la formación de una corona proteica. Por el contrario, el potencial-( $\zeta$ ) zeta de las MSN-NH<sub>2</sub> se volvió más negativo después de la incubación con  $\alpha$ -MEM (10% FCS), en concordancia con los datos previamente informados para nanopartículas cargadas positivamente [170], [171]. Dado que esta corona de proteínas definirá la identidad biológica de las MSNs y su interacción con las células [170], [171], puede afectar negativamente su eficacia y su destino final *in vivo*. Por ello, cuando se visualiza la aplicación clínica de estos nanosistemas dosificadores de fármacos, se debe pensar en adaptar las propiedades físico-químicas de la superficie de las MSNs mediante la modificación superficial con polietilenglicol (PEG) [172] o zwitterionización [173], las cuales han demostrado su capacidad para reducir la adsorción no específica de proteínas.

Los estudios mediante TEM de la morfología y la estructura mesoporosa de los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, antes y después de los ensayos de liberación del antibiótico en PBS 1x (*sección 4.1.3, vide infra*), mostraron, por una parte, la conservación de la morfología semiesférica y, por otra parte, la pérdida de la estructura mesoporosa interna tras largos tiempos de incubación en medio acuoso, independientemente del antibiótico liberado (**Fig. 4.6**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Paris *et al* [102], el cual demostró la pérdida total de la mesoestructura después de 9-12 días de incubación. De hecho, esta pérdida es debida al proceso de lixiviación de la sílice en especies de silicio libre en forma de

subproductos inofensivos del ácido ortosilícico que, después de ingresar al torrente sanguíneo o linfático, pueden ser fácilmente excretados por la orina.

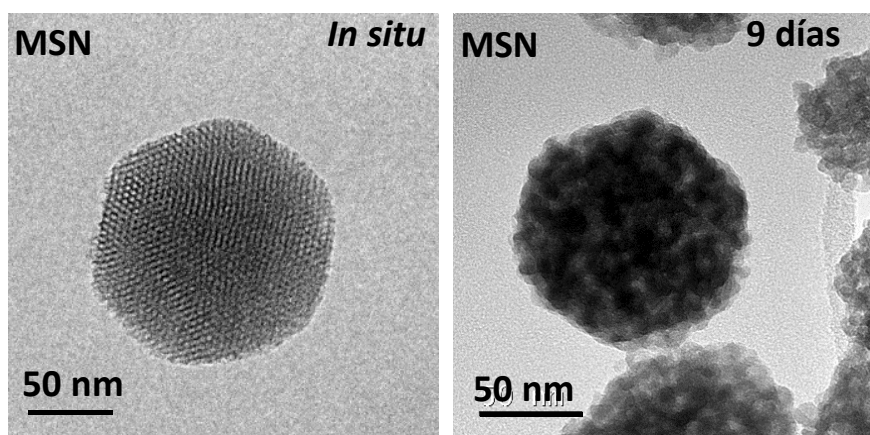


Fig. 4.6. Micrografías de TEM del nanosistema MSN antes y después de 9 días de incubación en PBS 1x en condiciones fisiológicas.

#### 4.1.3 Ensayos de liberación *in vitro* de los antibióticos

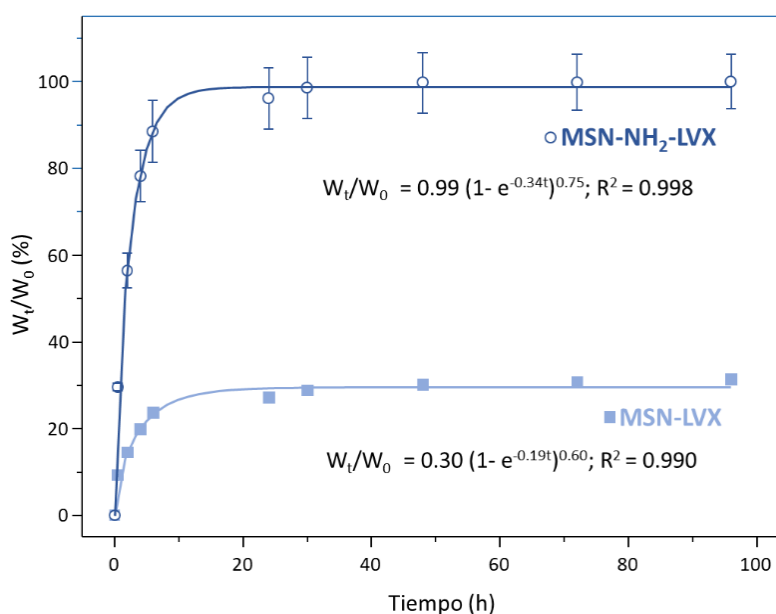
Tal y como se ha comentado en la *sección 4.1.1*, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las moléculas de antibiótico y la superficie de sílice de las nanopartículas gobiernan la carga de los antibióticos en las MSNs. Sin embargo, el empleo de PBS 1x en los ensayos de liberación a pH = 7.4, detallados en la *sección 3.4*, provoca un cambio en la naturaleza de estas interacciones, promoviendo la liberación de las moléculas de antibiótico al medio. Se puede suponer que la liberación se debe a la difusión a través de la matriz ordenada de mesoporos, como consecuencia de la adsorción de las moléculas de antibiótico en la parte interna de los mismos, confirmado por la reducción de los parámetros texturales de las MSNs después de la carga [174].

En este caso, los perfiles de liberación de los antibióticos LVX, GM y RIF liberados desde los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, muestran una liberación inicial rápida seguida de una fase estacionaria (*efecto burst*), que obedecen al modelo de difusión típico para este tipo de materiales mesoporosos. La cinética de esta liberación se puede expresar como una función de la concentración de antibiótico en los nanosistemas con el tiempo y puede representarse mediante el ajuste de los datos experimentales a cinéticas de primer orden mediante la introducción de un factor empírico de no idealidad,  $\delta$  (Ecuación 1) Esta cinética de liberación de primer orden se ha aplicado con éxito a la liberación de fármacos a partir de matrices porosas insolubles con estructura similar [116], [174]:

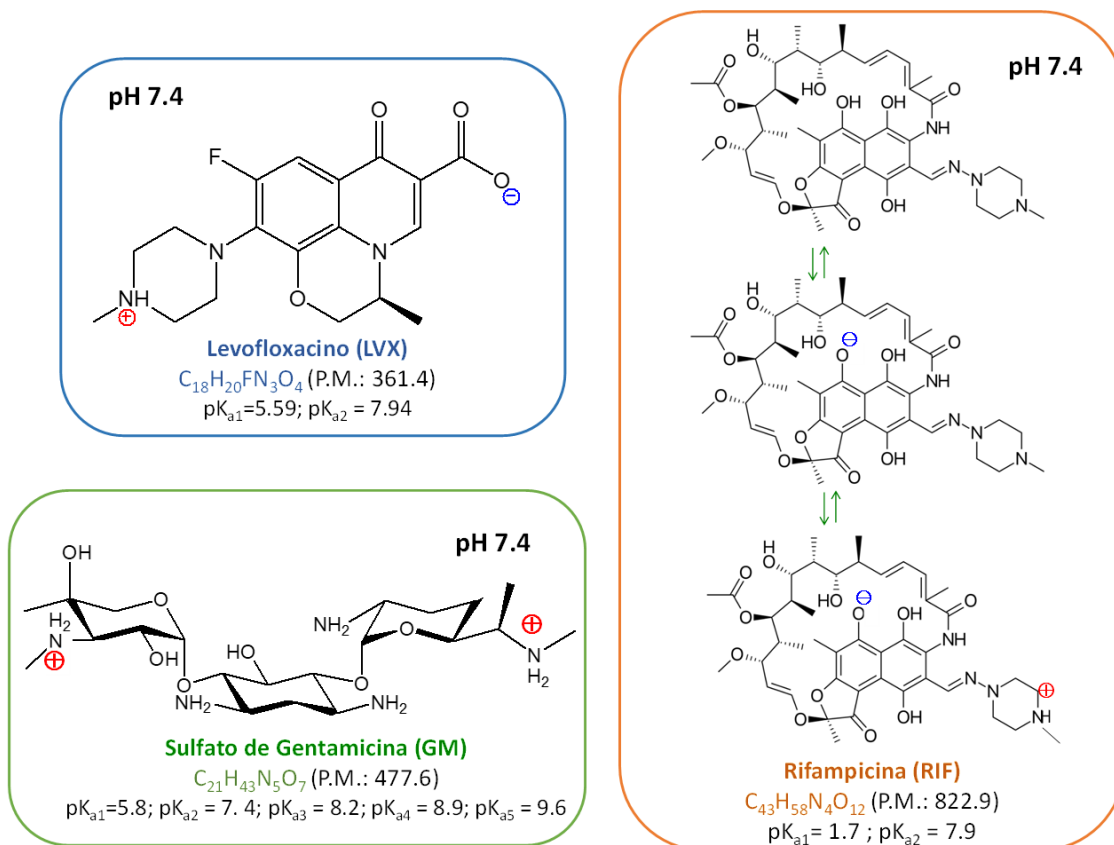
$$W_t/W_0 = B (1 - e^{-kt})^\delta \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $W_t$  es la cantidad de antibiótico liberado en el momento  $t$ ;  $W_0$  es la cantidad inicial de fármaco cargado;  $B$  es la liberación máxima de antibiótico;  $k$  es la constante cinética de liberación y  $\delta$  es un parámetro adimensional no ideal. En todos los casos, los valores de  $\delta$  están comprendidos entre 0 y 1, lo que indica que la liberación del fármaco se caracteriza por una liberación inicial rápida de las moléculas ubicadas en la parte más externa de los mesoporos [85].

Los resultados indican que la liberación de LVX a partir de las MSN es más lenta que la liberación desde MSN-NH<sub>2</sub>, con una retención parcial del antibiótico (**Fig. 4.7**). Este comportamiento concuerda con las fuertes interacciones de atracción entre los enlaces de hidrógeno de las moléculas de LVX (**Fig. 4.8**) y la gran cantidad de grupos silanol (-SiOH) presentes en las MSN, como se informó anteriormente en diferentes publicaciones [140], [166], [173]. Por el contrario, la liberación de LVX a partir de las MSN-NH<sub>2</sub> obedece a un modelo de difusión típico, en el que casi el total del fármaco se libera después de 100 h de ensayo. Esto puede explicarse por las interacciones repulsivas entre la molécula de antibiótico con los grupos amino protonados en MSN-NH<sub>2</sub> a pH = 7.4, lo que desencadena la rápida liberación de LVX al medio. Cabe destacar que este comportamiento aporta notables ventajas cuando el objetivo es diseñar terapias personalizadas y se necesita una dosis de choque en primera instancia, seguida de una liberación sostenida.

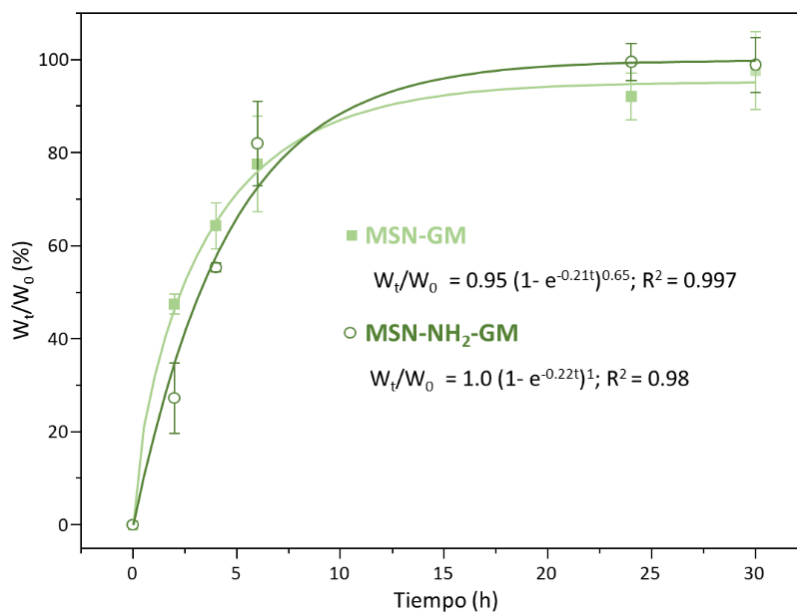


**Fig. 4.7.** Fracción acumulada de LVX liberado en función del tiempo desde MSN y MSN-NH<sub>2</sub>. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 1. Los datos son la media  $\pm$   $\sigma$ . El experimento se realizó por triplicado.



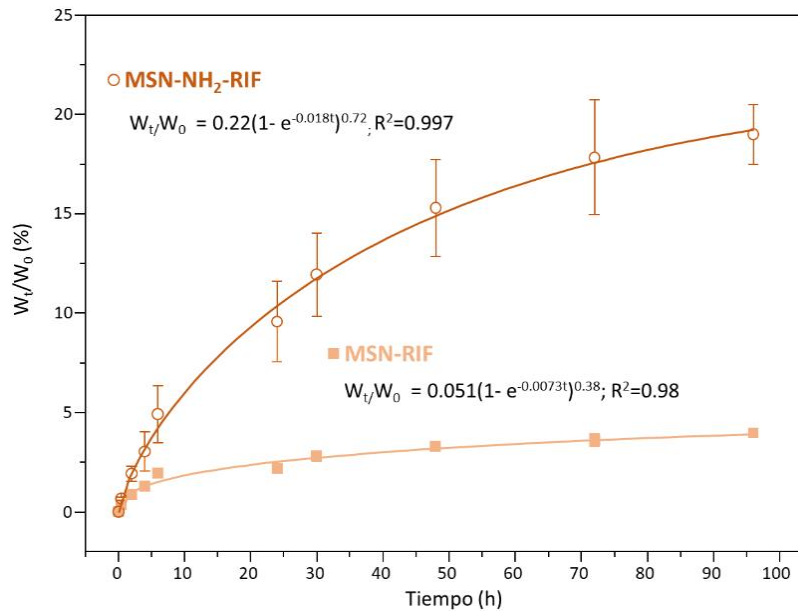
**Fig. 4.8.** Estructura de las especies relativas más abundantes a pH = 7.4 y principales propiedades químicas de los tres antibióticos, empleados en este trabajo, levofloxacin [175], gentamicina [176] y rifampicina [177], [178].

Con respecto a los perfiles de liberación de GM a partir de las MSN y las MSN-NH<sub>2</sub> (**Fig. 4.9**), se observa que casi el 100% del fármaco cargado se libera después de 30 h de ensayo desde ambos materiales. Ambas curvas de liberación muestran perfiles similares, lo que es consistente con la similitud de los valores de  $k$  obtenidos, de aprox.  $0.2 \text{ h}^{-1}$ . La molécula de GM está protonada a un pH fisiológico de 7.4 (**Fig. 4.8**) y, por lo tanto, se esperaría que las fuerzas repulsivas con grupos amino protonados en MSN-NH<sub>2</sub> desencadenaran una cinética de liberación más rápida en los nanomateriales funcionalizados en comparación con la MSN. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en las curvas de liberación de GM de ambas MSNs, lo que podría indicar que la alta hidrofilia y solubilidad de este antibiótico es la fuerza impulsora que gobierna la difusión de GM fuera de los mesoporos. Esto concuerda con los resultados de carga, que apuntaron al confinamiento de GM dentro de los mesoporos debido a la interacción con los grupos silanol (-SiOH) en ambas MSNs.



**Fig. 4.9.** Fracción acumulada de GM liberado en función del tiempo desde MSN y MSN-NH<sub>2</sub>. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 1. Los datos son la media  $\pm$   $\sigma$ . El experimento se realizó por triplicado.

Por último, en el caso de la RIF, se observaron cinéticas de liberación más sostenidas desde ambas MSNs, con una notable retención del fármaco (**Fig. 4.10**), la cual podría atribuirse a la baja solubilidad de la RIF en medio acuoso y al tamaño molecular relativamente alto de este antibiótico [179]. Los diferentes parámetros de liberación obtenidos, para la liberación de RIF desde ambas MSNs, podrían explicarse en base a la diferente naturaleza química de las interacciones entre las moléculas de antibiótico y los grupos funcionales presentes en las nanopartículas, de manera similar a lo comentado anteriormente para la molécula LVX (**Fig. 4.7**). Por lo tanto, el valor de la constante cinética de liberación más lenta ( $0,0073 \text{ h}^{-1}$ ) y la menor cantidad de fármaco liberado (aprox. 5%) para MSN-RIF estarían explicadas por las fuertes interacciones de enlace de hidrógeno entre las moléculas de RIF y el -SiOH que cubre la superficie de sílice. En el caso de MSN-NH<sub>2</sub>-RIF, el aumento de los valores de la constante cinética y la cantidad de fármaco liberado hasta  $0.018 \text{ h}^{-1}$  y 22%, respectivamente, podría atribuirse a fuerzas repulsivas entre las moléculas de RIF y los grupos amino cargados positivamente que cubren la superficie del material a  $\text{pH} = 7.4$ , que provocaría la salida de RIF al medio de liberación.



**Fig. 4.10.** Fracción acumulada de RIF liberado en función del tiempo desde MSN y MSN-NH<sub>2</sub>. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 1. Los datos son la media  $\pm$   $\sigma$ . El experimento se realizó por triplicado.

#### 4.1.4 Estudios de efectividad antimicrobiana

##### 4.1.4.1 Curvas de actividad biológica

Una vez analizadas las cinéticas de liberación y, determinada la fracción acumulada para los distintos antibióticos, este trabajo se ha centrado en la carga antibiótica liberada de LVX, GM y RIF en cada uno de los tiempos ensayados desde los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub> para determinar la dosis antibiótica activa, siguiendo el protocolo descrito en la *sección 3.5.1.1*. A continuación, se presentan las dosis antibióticas activas determinadas a partir de las cargas liberadas frente a bacterias planctónicas de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Además, las **Fig. 4.11 a 4.14** recogen los resultados de comparar las cargas antibióticas liberadas con las curvas de actividad biológica.

En todos los casos, las cargas liberadas y sus correspondientes dosis activas exhibieron patrones similares frente al tiempo, lo que indica que la actividad antimicrobiana de las dosis activas de antibiótico está relacionada con las cargas de fármaco liberado desde ambas matrices MSNs. En este sentido, se observó una liberación de aprox. 10 veces superior frente a las dosis activas, lo que apunta a una pérdida parcial de la actividad antimicrobiana del fármaco durante las diferentes etapas por las que atraviesa, desde el proceso de carga hasta la determinación de las dosis activas. No obstante, a pesar de esta pérdida parcial de actividad antibiótica, su eficacia antibacteriana es suficiente, lo que también se evidencia durante los

ensayos de actividad antibiofilm, que se discutirá, *vide infra*, en la *sección 4.1.4.2* de este apartado.

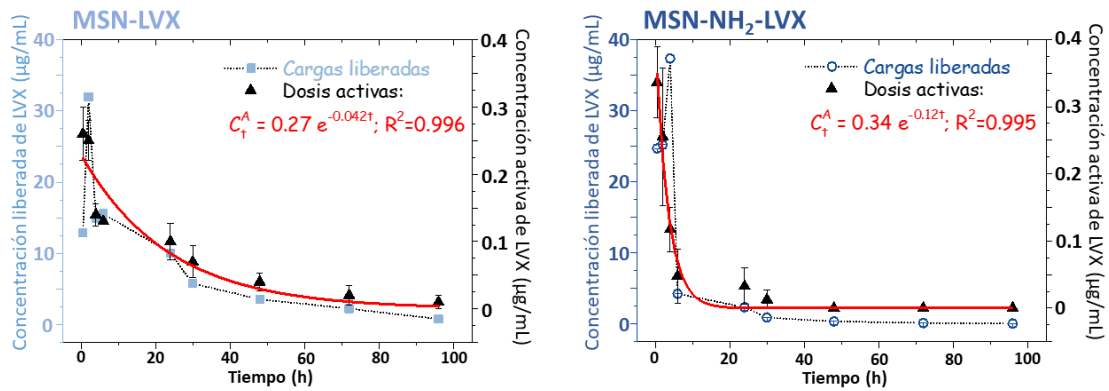
Con el fin de obtener las curvas de actividad biológica, los datos experimentales de las dosis activas se ajustaron a un modelo de decrecimiento exponencial de primer orden (Ecuación 2):

$$C_t^A = B e^{-mt} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $C_t^A$  es la concentración de fármaco activo tras un tiempo  $t$  de liberación;  $B$  es la concentración máxima de fármaco y  $m$  es la constante cinética de decrecimiento. Los parámetros resultantes derivados del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2 se incluyen en las **Fig. 4.11 a 4.14**.

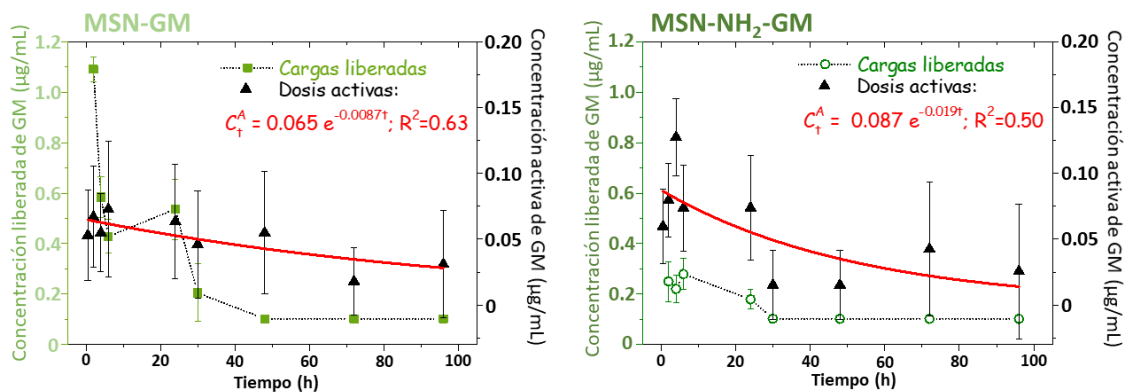
Los resultados del estudio de las dosis activas de LVX liberado a partir de las MSN frente a *E. coli* revelaron una concentración activa máxima inicial de 0.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 0.5 h de ensayo seguido de un descenso progresivo de la concentración activa de LVX con el tiempo, alcanzando valores de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 96 h de ensayo (**Fig. 4.11**). Este comportamiento apoya los perfiles de liberación de la carga a partir de las MSNs con una cinética tipo *burst* (**Fig. 4.7**, *sección 4.1.3*).

En el caso del LVX liberado a partir las MSN-NH<sub>2</sub>, la dosis máxima activa se detectó en la carga antibiótica liberada a las 0.5 h con una concentración activa de 0.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esta dosis activa fue mayor en el caso de las MSN-NH<sub>2</sub>, de acuerdo con la mayor carga de antibiótico de la muestra funcionalizada en comparación con la MSN (**Fig. 4.11**). Además, la disminución en la concentración activa de LVX con el tiempo fue más pronunciada al detectar < 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 48 h, el cual corresponde al límite de detección del test para este antibiótico y bacteria. Todos estos hallazgos concuerdan con los resultados derivados del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2, que proporcionó valores de constante de decrecimiento exponencial,  $m$ , de 0.042 h<sup>-1</sup> y 0.12 h<sup>-1</sup> para el LVX liberado a partir de MSN-LVX y MSN-NH<sub>2</sub>-LVX respectivamente. La disminución 3 veces más rápida en la concentración activa de LVX liberada desde las MSN-NH<sub>2</sub> puede atribuirse a la localización preferente de las moléculas de antibiótico en la superficie externa de los mesoporos en las nanopartículas funcionalizadas, como se ha comentado previamente (*sección 4.1.3*).



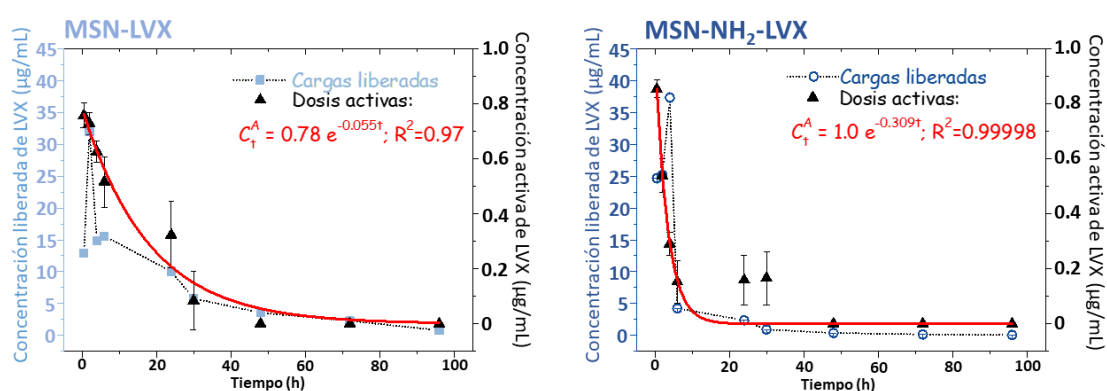
**Fig. 4.11.** Cargas liberadas (azul) y dosis activas (rojo) de LVX desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en función del tiempo. Las dosis activas se han testado sobre bacterias planctónicas de *E. coli*. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2. Se representa la media ± σ. El experimento se realizó por sextuplicado (n=6).

Las cargas de GM liberadas a cada uno de los tiempos ensayados a partir de MSN-GM y MSN-NH<sub>2</sub>-GM, exhibieron perfiles de decaimiento sostenidos, con dosis activas frente a *E. coli* en el rango de 0.1-1.2 µg/mL en ambos sistemas (**Fig. 4.12**). Esta oscilación de las dosis activas se detectó en cada una de las repeticiones, complicando la reproducibilidad de los resultados. Con fines comparativos, los datos experimentales también se ajustaron a la Ecuación 2. Aunque se obtuvo un ajuste deficiente (**Fig. 4.12**), los bajos valores de *m* resultantes explicarían la liberación de GM relativamente lenta de los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub>, de acuerdo con los resultados de la cinética de las cargas acumuladas (**Fig. 4.9**, sección 4.1.3). Estos resultados se explicarían por las fuertes interacciones de atracción a pH = 7.4 entre los grupos amino protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) de GM y los grupos silanol desprotonados (-SiO<sup>-</sup>) que prevalecen en los canales mesoporosos internos.



**Fig. 4.12.** Cargas liberadas y dosis activas de GM desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en función del tiempo. Las dosis activas se han testado sobre bacterias planctónicas de *E. coli*. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2. Se representa la media ± σ. El experimento se realizó por sextuplicado (n=6).

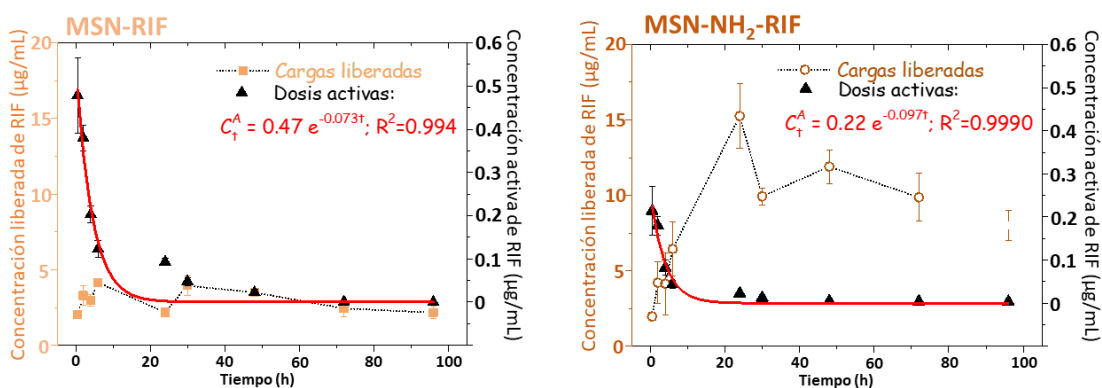
Las curvas de actividad biológica de las dosis activas de LVX y RIF liberados a partir de las MSNs frente a *S. aureus*, fueron similares en ambos antibióticos y matrices. La naturaleza zwitteriónica predominante de ambos antibióticos a pH fisiológico explicaría tal paralelismo. Sin embargo, los valores de concentración activa de LVX fueron, aproximadamente, 10 veces mayores que los de RIF, siendo la concentración activa máxima de LVX de aprox. 0.8 y 1.0 µg/mL para MSN-LVX y MSN-NH<sub>2</sub>-LVX, respectivamente (**Fig. 4.13**). La concentración activa de LVX fue similar en *S. aureus* y *E. coli* (**Fig. 4.11**), mostrando en ambos casos un decaimiento rápido inicial más pronunciado en MSN-NH<sub>2</sub>-LVX que en MSN-LVX. La concentración mínima activa de LVX detectada fue de 0.01 µg/mL, el cual corresponde al límite de detección del test para este antibiótico (**Fig. 4.13**).



**Fig. 4.13.** Cargas liberadas y dosis activas de LVX desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en función del tiempo. Las dosis activas se han testado sobre bacterias planctónicas de *S. aureus*. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2. Se representa la media ± σ. El experimento se realizó por sextuplicado.

Las dosis activas de RIF calculadas desde las cargas liberadas en cada uno de los tiempos fueron más bajas en comparación con las dosis de LVX frente a cultivos de bacterias planctónicas de *S. aureus*, de acuerdo con la cinética de liberación de RIF desde las MSNs (**Fig. 4.10**). Esto podría explicarse por la baja solubilidad de RIF en medio fisiológico [127], la cual, de hecho, es una de las propiedades clave que afectan a la biodisponibilidad del antibiótico para las bacterias [180]. La dosis máxima detectada de RIF durante las primeras horas fue mayor para las MSN frente a las MSN-NH<sub>2</sub>, con dosis máximas activas de 0.47 µg/mL para MSN-RIF y 0.22 µg/mL para MSN-NH<sub>2</sub>-RIF (**Fig. 4.14**). Esta diferencia concuerda con la carga 2 veces mayor de antibiótico en las MSN frente a las MSN-NH<sub>2</sub>. No hubo diferencias significativas en la disminución de la concentración activa liberada de RIF con el tiempo, lo que concuerda con los valores similares de  $m$ , 0.073 h<sup>-1</sup> y 0.097 h<sup>-1</sup> para MSN-RIF y MSN-NH<sub>2</sub>-RIF, respectivamente (**Fig. 4.14**). Este hecho apoyaría la ubicación predominante del antibiótico en el interior de las cavidades mesoporosas en ambos materiales, como se discutió anteriormente en las

propiedades texturales en la *sección 4.1.1*. Debido a la alta sensibilidad de *S. aureus* a la RIF, la concentración activa mínima detectada fue 0.001 µg/mL para MSN-RIF y 0.004 µg/mL para MSN-NH<sub>2</sub>-RIF (**Fig. 4.14**). Los resultados desde ambos antibióticos fueron fácilmente reproducibles.



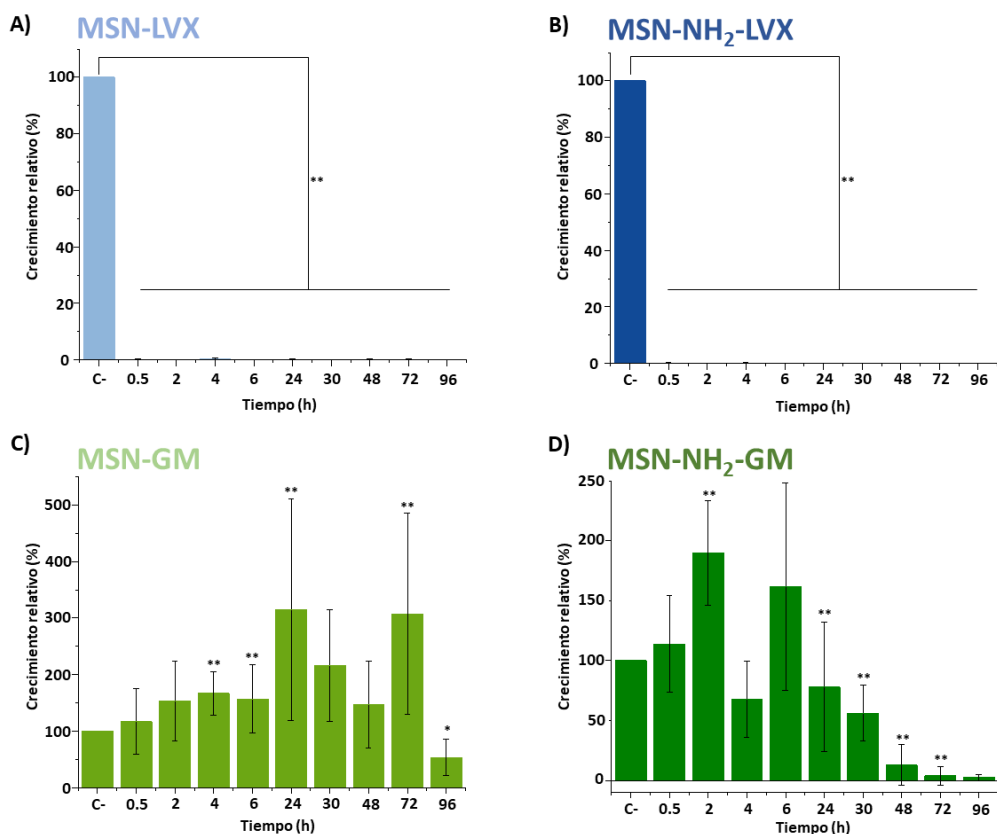
**Fig. 4.14.** Cargas liberadas y dosis activas de RIF desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en función del tiempo. Las dosis activas se han testado sobre bacterias planctónicas de *S. aureus*. Se muestran los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 2. Se representa la media ± σ. El experimento se realizó por sextuplicado.

#### 4.1.4.2 Actividad antibiofilm

Tras la determinación de las curvas de actividad biológica, se estudió el impacto de cada una de las dosis antibióticas sobre biofilms de *E. coli* y *S. aureus*. Por un lado, se evaluó; (a) el efecto antibiofilm de las dosis activas a partir de las cargas de antibiótico liberadas en cada uno de los tiempos ensayados, mediante el procedimiento descrito en la *sección 3.5.1.2* y, por otro, (b) se evaluó el efecto directo de las MSNs cargadas con antibiótico, siguiendo el protocolo de la *sección 3.5.2*.

##### a) Efecto de las cargas antibióticas liberadas sobre el biofilm bacteriano

Los resultados de este estudio mostraron, en el caso de *E. coli*, una reducción del biofilm estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para todas las cargas de LVX liberadas desde ambas MSNs (**Fig. 4.15, A y B**). No hubo relación entre la concentración activa liberada de LVX y el efecto sobre el biofilm, ya que, en general, el biofilm se redujo notablemente entre un 89.2% y un 99.8% en todos los tiempos estudiados. Por el contrario, la liberación lenta y sostenida de GM no provocó la reducción significativa del biofilm (**Fig. 4.15, C y D**), ya que las concentraciones activas liberadas en el rango de 0.1-1.2 µg/mL no fueron suficientes para erradicar el biofilm, de acuerdo a los resultados previos [181].

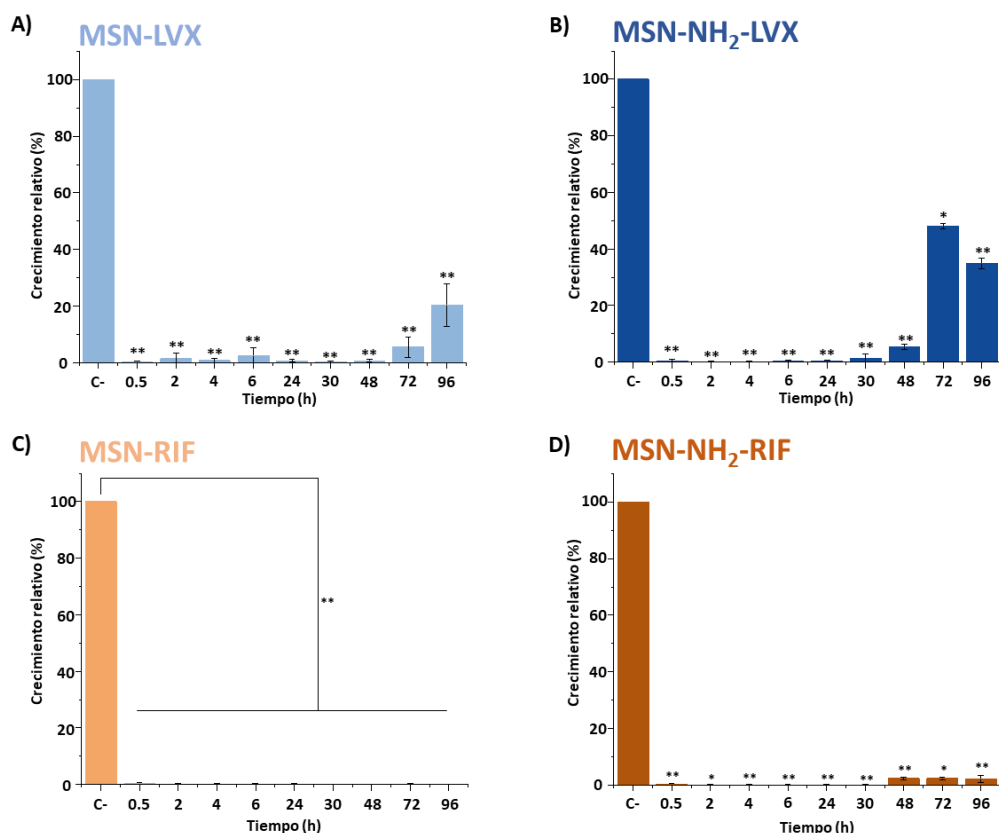


**Fig. 4.15.** Actividad antibiofilm *in vitro* de las dosis activas de LVX y GM procedentes de las cargas liberadas desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en cada uno de los tiempos de ensayo testados sobre biofilms de *E. coli*. Los datos se representan como la media  $\pm \sigma$ . (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control, \*\*  $p < 0.01$ , en comparación con el control (C-)). El experimento se realizó por sextuplicado.

En el caso de *S. aureus*, todas las dosis de LVX liberadas desde las MSNs redujeron notablemente el biofilm, aunque hubo diferencias en la duración de la actividad antibiofilm entre los nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub> (Fig. 4.16, A y B). En este sentido, la disminución más lenta de la concentración activa de LVX liberada desde MSN-LVX permitió mantener ese efecto en el tiempo, consiguiendo una reducción del 99.4% en la primera hora y manteniendo una reducción de hasta el 76.7% a las 96 h (Fig. 4.16-A). En cambio, la dosis activa de LVX liberado a las 96 h desde MSN-NH<sub>2</sub>-LVX mostró una ausencia de efecto sobre el biofilm. Tal disimilitud puede deberse a la diferencia en la constante cinética de liberación entre ambos nanosistemas, provocando una liberación más rápida del LVX desde MSN-NH<sub>2</sub>-LVX que desde las MSN, como se vio anteriormente (Fig. 4.7 y 4.13).

Las bajas concentraciones de RIF liberadas desde las MSNs lograron reducir significativamente el biofilm de *S. aureus* en todos los tiempos ensayados. En concreto, la concentración activa más baja de RIF detectada a las 96 h con un valor de aprox. 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  liberada desde las MSN redujo el biofilm un 99% (Fig. 4.16-C). En el caso de las MSN-NH<sub>2</sub>, la concentración activa

liberada fue capaz de reducir el biofilm de *S. aureus* hasta un 99% a las 30 h de liberación, manteniendo la reducción hasta un 97% a las 96 h de liberación (**Fig. 4.16-D**).



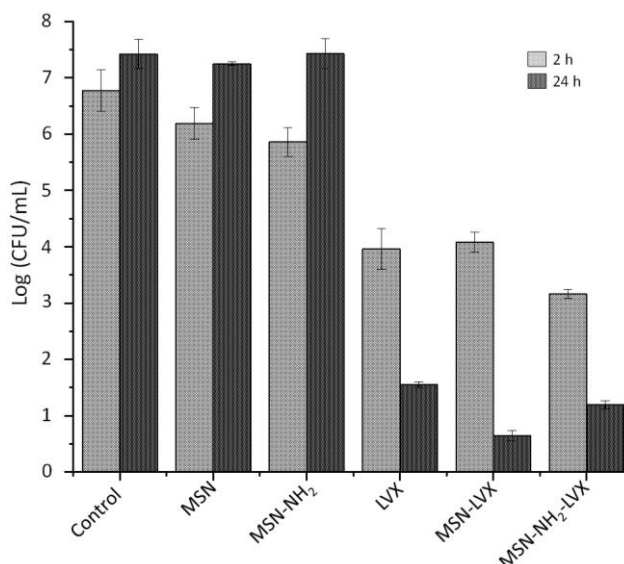
**Fig. 4.16.** Actividad antibiofilm *in vitro* de las dosis activas de LVX y RIF procedentes de las cargas liberadas desde los materiales MSN y MSN-NH<sub>2</sub> en cada uno de los tiempos de ensayo testados sobre biofilms de *S. aureus*. Los datos se representan como la media  $\pm \sigma$ . (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control, \*\*  $p < 0.01$ , en comparación con el control (C-)). El experimento se realizó por sextuplicado.

#### b) Efecto directo del nanosistema cargado sobre el biofilm bacteriano

Con el fin de investigar el papel de estas matrices como nanosistemas dosificadores de antibióticos a nivel local, se llevó a cabo un estudio con MSNs cargadas con LVX (MSN-LVX y MSN-NH<sub>2</sub>-LVX) sobre biofilms de *E. coli*. Los resultados derivados del ensayo se recogen en la **Fig. 4.17**, donde puede observarse un ligero efecto antimicrobiano sobre el biofilm de *E. coli* en contacto con las MSNs sin LVX, siendo este efecto más pronunciado en el caso de las MSN-NH<sub>2</sub>. Estos resultados concuerdan con resultados previos empleando MSNs funcionalizadas con grupos amino [140], que produjeron una mayor interacción con la pared bacteriana y/o la superficie del biofilm y desencadenaron un mínimo efecto sobre el mismo.

En el caso de los nanosistemas con antibiótico, los materiales MSN-NH<sub>2</sub>-LVX, presentaron la mayor reducción del biofilm tras 2 h en contacto en comparación con las MSN-LVX y el LVX añadido directamente sobre el biofilm (**Fig. 4.17**). Tras 24 en contacto, el efecto

antimicrobiano es más pronunciado en el caso de las MSN-LVX (**Fig. 4.17**). La pronunciada liberación del LVX desde las MSN-NH<sub>2</sub> en las primeras horas de liberación (**Fig. 4.7**) provoca una alta concentración de LVX biodisponible para el biofilm, lo cual explicaría el elevado efecto antibiofilm de las MSN-NH<sub>2</sub>-LVX tras 2 h. Esto puede compararse con la adición de LVX directamente sobre el biofilm, el cual permite tener la concentración de LVX total desde el comienzo del tratamiento. Sin embargo, con 24 h de contacto, el LVX biodisponible en estos dos casos es mucho menor, a diferencia del LVX liberado desde las MSN-LVX el cual presenta una liberación más lenta en las primeras horas (**Fig. 4.7**). Esta liberación más lenta permite liberar dosis activas durante más tiempo (**Fig. 4.11**), consiguiendo un mayor efecto antibiofilm tras 24 h. Estos resultados demuestran un efecto prolongado en el tiempo del LVX liberado desde las MSN en comparación con su adición directa sobre el biofilm al inicio del tratamiento.



**Fig. 4.17.** Efecto directo de los diferentes nanosistemas sobre biofilms de *E. coli*. Los histogramas representan el log (CFU/mL) después de la incubación con los diferentes nanosistemas en dos momentos probados (2 y 24 h). Control representa el control bacteriano sin ningún tratamiento. LVX representa el antibiótico añadido directamente en el cultivo de bacterias a la máxima concentración liberada por los nanosistemas a las 2 y 24 h. También se muestra el efecto de los nanosistemas sin antibióticos sobre biofilms de *E. coli*. Los datos se representan como la media  $\pm$   $\sigma$ . El experimento se realizó por triplicado.

#### 4.1.4.3 Sensibilidad bacteriana

La aparición de bacterias mutantes resistentes cuando una infección se trata en monoterapia es un acontecimiento frecuente [158]. De hecho, es bien conocida la facilidad de *S. aureus* para volverse resistente cuando se trata con RIF [182]. Aunque la aparición de mutantes de *E. coli* resistentes a LVX y GM es poco frecuente, fueron necesarios estudios de sensibilidad de *E. coli* contra LVX y GM y *S. aureus* contra LVX y RIF liberados desde las MSNs para detectar posibles cambios en la sensibilidad de estas bacterias tras el tratamiento. El procedimiento

experimental se describe en la *sección 3.5.1.3*. Los resultados del estudio de resistencias bacterianas al ser tratadas con las cargas antibióticas liberadas mostraron como *E. coli* procedente del biofilm mantuvo una sensibilidad similar al control (CMI = 0.032 mg/L) tras 24 h en contacto con la carga de LVX liberada a las 2, 24 y 96 h desde las MSN-LVX. Sin embargo, cuando se trató con LVX liberado de MSN-NH<sub>2</sub>-LVX, el valor de CMI varió entre 0.023 y 0.047 mg/L. En el caso de GM, *E. coli* mostró una sensibilidad reducida con un valor de CMI = 4 mg/L o un valor de CMI = 3 mg/L versus el control (CMI = 2 mg/L) cuando se trató con GM liberado de MSN-GM y MSN-NH<sub>2</sub>-GM respectivamente.

Por otro lado, *S. aureus* fue sensible al LVX liberado de las MSN-LVX a las 2, 24 y 96 h con un rango de CMI de 0.019 – 0.125 mg/L, valores próximos al control (CMI = 0.019 mg/L). La sensibilidad de *S. aureus* se redujo a valores de CMI entre 0.064 y 0.25 mg/L cuando se trató con LVX liberado de MSN-NH<sub>2</sub>-LVX. Nuestros resultados mostraron una alta sensibilidad de *S. aureus* frente a RIF liberada de MSN-RIF a las 2, 24 y 96 h, logrando valores de CMI = 0.002 mg/L frente al CMI = 0.004 mg/L del control. Se obtuvieron valores de CMI = 0.002, 0.004 y 0.006 mg/L frente al RIF liberado de MSN-NH<sub>2</sub>-RIF a las 2, 24 y 96 h, respectivamente. Estas pequeñas variaciones en la CMI podrían deberse al diferente tamaño del inóculo, las variaciones intrínsecas de la metodología, y no pueden explicarse como un desarrollo de mutaciones de resistencia porque, si aparece dicho mecanismo, la resistencia es mucho más pronunciada y la CMI aumenta por encima de concentraciones más altas.

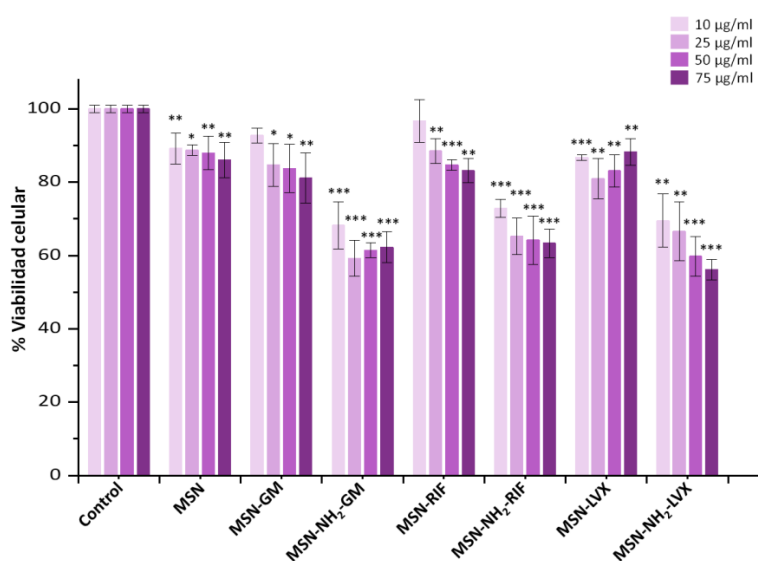
Estos resultados contrastan con un estudio realizado previamente [128], el cual mostró la aparición de mutantes resistentes de *S. aureus* tras el tratamiento con liberados de RIF desde matrices SBA-15. De acuerdo con los resultados de esta tesis, se determinó que la cantidad de antibiótico liberado desde las MSNs es capaz de eliminar un elevado número de bacterias y como consecuencia, disminuir la probabilidad de aparición de mutantes resistentes. Sin embargo, otras variables como el tamaño del inóculo, el tiempo de exposición y la potencial actividad antibacteriana intrínseca de las nanopartículas pueden tener también un papel importante, evitando la aparición de cepas resistentes.

#### **4.1.5 Estudios de la biocompatibilidad *in vitro***

Finalmente, se realizaron ensayos preliminares *in vitro* sobre células preosteoblásticas para estudiar la posible citotoxicidad de todos los nanosistemas a diferentes concentraciones (10-75 µg/ml), tal y como se describe en la *sección 3.6.1.1*. Los resultados mostraron la ausencia de toxicidad de las MSN sobre las células MC3T3-E1 tras 24 h de ensayo, incluso a la concentración más alta de nanopartículas estudiadas. Sin embargo, se observó una pequeña

reducción de la viabilidad, con valores por encima del 50% tras el tratamiento con las MSN-NH<sub>2</sub>, como se puede esperar de los nanosistemas modificados superficialmente con grupos amino (-NH<sub>2</sub>) [140]. Además, los nanosistemas cargados con antibióticos, mostraron una reducción estadísticamente significativa para todas las concentraciones con respecto a las muestras no cargadas, especialmente el sistema cargado con LVX, que reduce a la mitad la viabilidad de las células, lo que podría explicarse por la fuerte liberación inicial del antibiótico dentro de las células [183]. Este no es un comportamiento aislado, ya que la disminución de la viabilidad y la proliferación de células tipo osteoblastos cuando se tratan con estos tres antibióticos ya ha sido descrita en la literatura [184]–[186].

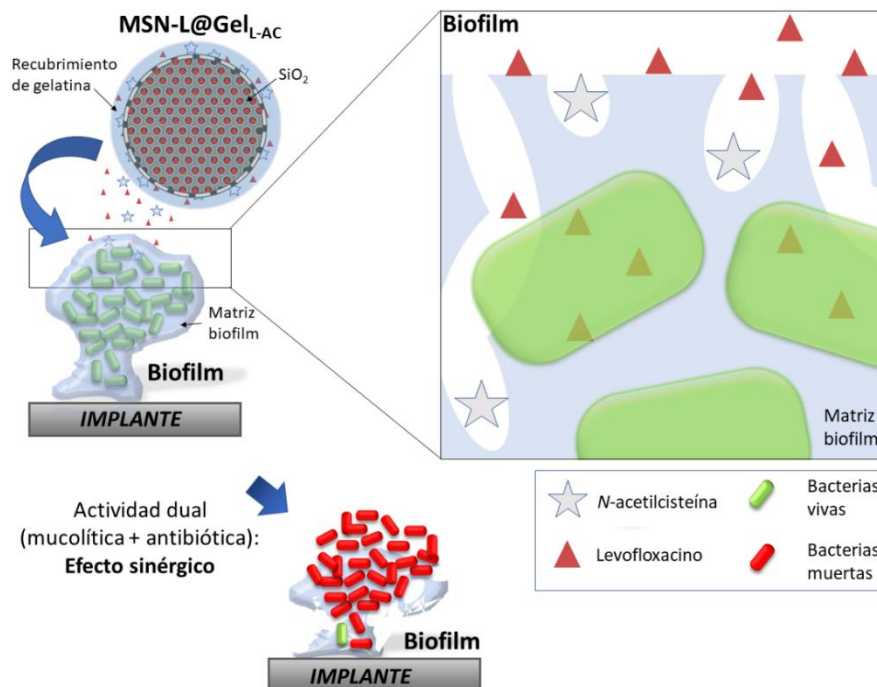
Para determinar si este primer efecto continúa, o si en cambio, las células se restauran con el tiempo, se estudió la viabilidad de las células 96 h después del tratamiento (**Fig. 4.18**). En general, comprobamos que la viabilidad a lo largo del tiempo se incrementó incluso en muestras modificadas con grupos amino (-NH<sub>2</sub>), así como en materiales cargados con antibióticos, con valores de viabilidad celular superiores al 60%, lo que demuestra la biocompatibilidad de estos nanosistemas cargados.



**Fig. 4.18.** Porcentaje de viabilidad celular de los preosteoblastos MC3T3-E1 tras 96 h después del tratamiento con los diferentes nanosistemas MSN y MSN-NH<sub>2</sub> con antibiótico empleando las concentraciones 10, 25, 50 y 75 µg/mL en medio de cultivo. Se representa la media ±  $\sigma$ . (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control, \*\*  $p < 0.01$ , en comparación con el control, \*\*\*  $p < 0.001$ ). El experimento se realizó por sextuplicado.

## 4.2 MSNs como nanosistemas multiterapia (MSN@Gels)

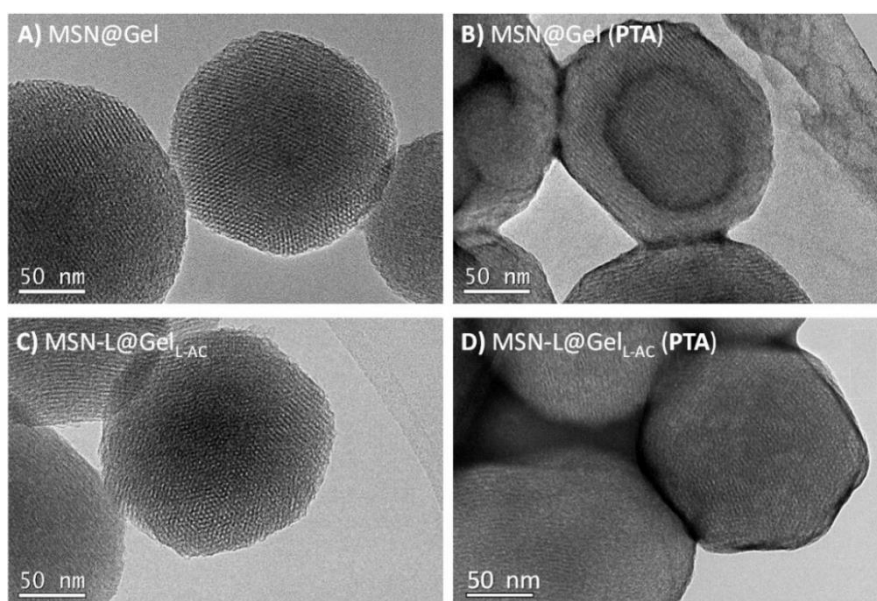
Esta sección aborda el diseño y caracterización de nanosistemas multiterapia basados en MSNs con objeto de combatir el biofilm bacteriano. Dichos nanosistemas llevan incorporados por una parte un antibiótico, levofloxacin (LVX), localizado en el interior de los mesoporos y una cubierta externa de gelatina donde se incorpora un agente mucolítico como la N-acetilcisteína (AC) o bien una combinación de AC y LVX para una mayor eficacia antimicrobiana. Estos nanosistemas se han denominado MSN@Gels referido al recubrimiento externo con gelatina. Dichos recubrimientos permiten la liberación temprana de los agentes antimicrobianos incorporados en el hidrogel junto con la difusión y liberación del antibiótico cargado en el interior de los mesoporos. Por tanto, los nanosistemas MSN@Gels combinan la acción disgregante del biofilm bacteriano de la AC con la acción antibiótica del LVX dando lugar a un efecto sinérgico para la erradicación del biofilm. Este capítulo comprende tres bloques principales. En primer lugar, se aborda la optimización y caracterización completa de estos nanosistemas multiterapia MSN@Gels (secciones 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3). En segundo lugar, se estudia la capacidad antibacteriana de los materiales MSN@Gels en contacto directo con biofilms de *E. coli* para determinar el efecto combinado de ambos fármacos (mucolítico-antibiótico) dentro de un mismo nanosistema multiterapia (sección 4.2.4). Finalmente, se muestran los estudios de citotoxicidad *in vitro* de estos nanosistemas en contacto con preosteoblastos MC3T3-E1 (sección 4.2.5).



**Fig. 4.19.** Resumen esquemático de la acción antibacteriana dual del nanosistema multiterapia desarrollado en esta tesis doctoral basados en los nanosistemas MSN@Gels.

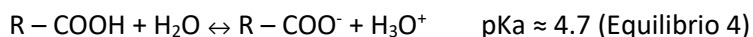
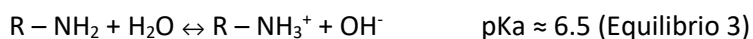
#### 4.2.1 Caracterización de los nanosistemas MSN@Gels

Se ha realizado una caracterización fisicoquímica completa de los nanosistemas MSN@Gels mediante diferentes técnicas como TEM, potencial-( $\zeta$ ) zeta, DLS, FTIR y TG, tal y como se ha descrito anteriormente (*sección 3.2* del procedimiento experimental). La **Fig. 4.20** muestra el estudio por TEM de estos nanosistemas en ausencia y presencia de los dos fármacos AC y LVX. Es importante remarcar que, con el fin de observar la cobertura de gelatina externa del recubrimiento de las MSN, se procedió a una tinción con PTA 1%, lo cual permite detectar la parte orgánica de estos nanosistemas con un mayor contraste. Las imágenes de TEM correspondientes al material sin teñir con PTA (**Fig. 4.20-A y C**) muestran nanopartículas semiesféricas de un tamaño aproximado de 150 nm con un ordenamiento mesoporoso típico de una estructura MCM-41 [78][79]. Estos resultados evidencian que los nanosistemas MSN@Gels mantienen su morfología y estructura mesoporosa después del recubrimiento externo con gelatina. La presencia de esta cobertura externa se hace evidente después de la tinción con PTA (**Fig. 4.20-B y D**), donde el recubrimiento de gelatina se observa como una zona más oscura alrededor de la nanopartícula. En este sentido fue posible observar cómo la muestra sin AC (MSN@Gel) presenta un recubrimiento más fino, permitiendo la visualización del ordenamiento mesoporoso de las MSN incluso tras la tinción con PTA (**Fig. 4.20-B**). Sin embargo, en presencia de AC (MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>) se observa un recubrimiento orgánico de mayor grosor, que incluso ocupa los huecos interpartícula, y que no permite apreciar con nitidez el ordenamiento mesoporoso una vez realizada la tinción con PTA (**Fig. 4.20-D**).



**Fig. 4.20.** Micrografías de TEM de los nanosistemas MSN@Gel y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>. Se muestran los nanosistemas sin teñir (A y C) y con la tinción por PTA (B y D) con el fin de detectar el recubrimiento orgánico.

Con el fin de obtener información acerca de la carga superficial y el tamaño hidrodinámico de los diferentes materiales MSN@Gels, se realizaron medidas de potencial-( $\zeta$ ) zeta y DLS a partir de suspensiones de dichos materiales (**Tabla 4.2**). La variación del valor de potencial-( $\zeta$ ) desde -18.2 mV para la muestra MSN hacia valores más positivos próximos a cero para los nanosistemas MSN@Gels, se debe a los grupos ionizables presentes en la gelatina (Equilibrios 3 y 4), y corroboran la efectividad del proceso de recubrimiento.

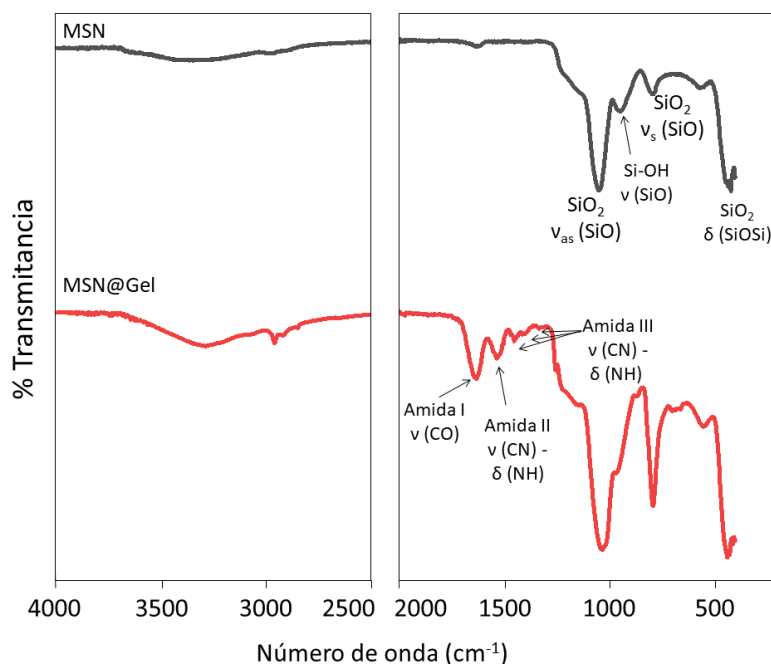


**Tabla 4.2.** Valores de potencial-( $\zeta$ ) zeta, máximo de distribución de tamaño y contenido en materia orgánica de los diferentes nanosistemas MSN@Gels en agua.

Muestra	Potencial-( $\zeta$ ) zeta (mV)	D <sub>H</sub> (nm)	Contenido orgánico (% peso)
MSN	-18.2 ± 0.8	190 ± 15	4.36
MSN-LVX	-19.4 ± 0.8	220 ± 18	6.28
MSN-L@Gel	1.8 ± 0.3	250 ± 19	32.82
MSN-L@Gel <sub>AC</sub>	0.0 ± 0.4	255 ± 20	29.17
MSN-L@Gel <sub>L-AC</sub>	-0.4 ± 0.2	259 ± 17	30.10

Las medidas de DLS, permitieron determinar distribuciones de tamaño hidrodinámico con un máximo de 190-200 nm para las muestras sin gelatina y de 250-259 nm para las muestras con gelatina (**Tabla 4.2**). El aumento del tamaño de los nanosistemas con gelatina en comparación con las MSN de partida confirma la presencia de la cubierta orgánica alrededor de las nanopartículas.

A continuación, se realizó la caracterización mediante FTIR de las MSN, antes y después del recubrimiento con gelatina. Los espectros de FTIR obtenidos de los diferentes materiales MSN@Gels, evidenciaron la presencia de gelatina con la aparición de nuevas bandas en la región entre 1200 –1700 cm<sup>-1</sup> (**Fig. 4.21**). Concretamente se evidencia en las bandas a 1633 y 1559 cm<sup>-1</sup> que pueden atribuirse a la amida I (tensión vCO), y las vibraciones de amida II (flexión  $\delta$ NH y tensión vCN), respectivamente. La banda de amida III (combinación en fase de tensión vCN y flexión  $\delta$ NH) está representada por un conjunto de tres señales débiles centradas en 1240 cm<sup>-1</sup> presentes en la gelatina [187].



**Fig. 4.21.** Espectro de FTIR (regiones 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$  y 2000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) de los nanosistemas MSN y MSN@Gels.

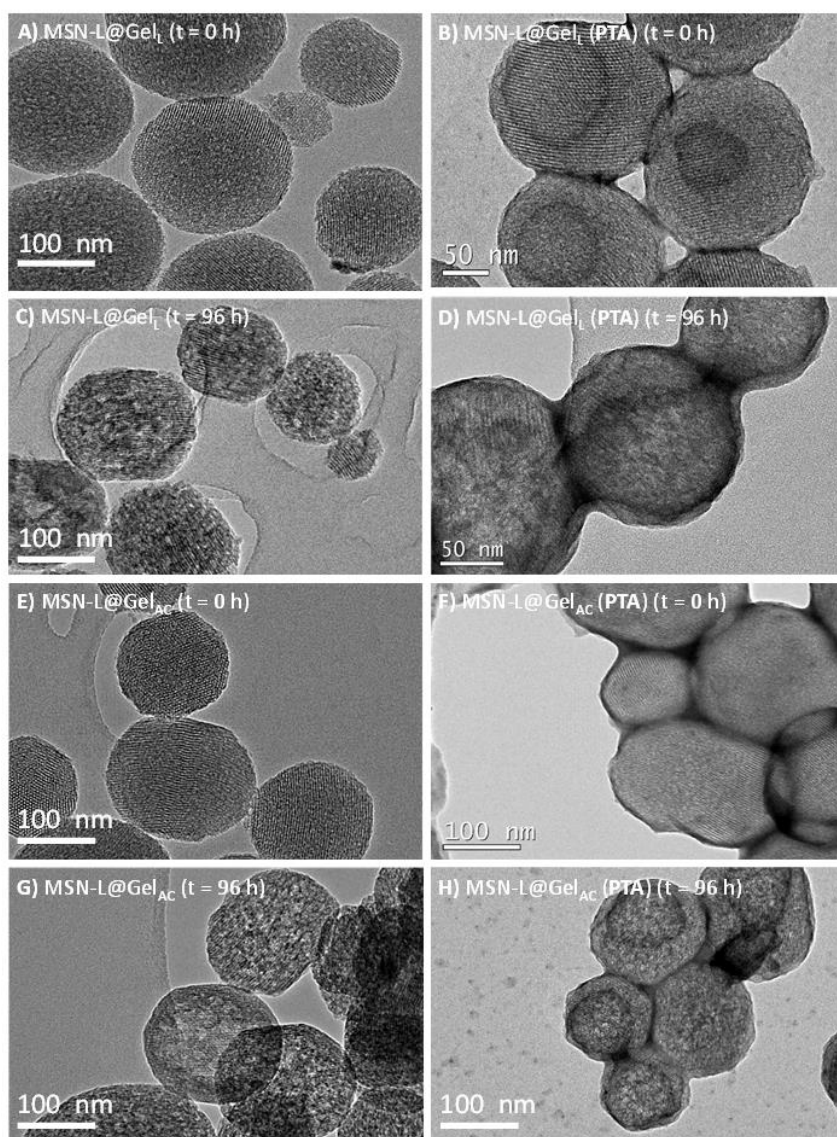
Finalmente, se determinó la cantidad de materia orgánica presente en los diferentes nanosistemas MSN@Gels. Los resultados, recogidos en la **Tabla 4.2** mostraron un porcentaje en peso de materia orgánica de aproximadamente un 30% en los materiales con gelatina, valores más de cinco veces superiores al contenido orgánico de los materiales de partida, lo cual confirma el éxito del proceso de recubrimiento.

La cantidad inicial de LVX presente en los distintos nanosistemas sin AC, MSN-L ( $30.0 \pm 0.2$  mg/g) y MSN-L@Gel-L ( $65.3 \pm 1.0$  mg/g), se determinó mediante AQE a partir del porcentaje de C y N. La cantidad de LVX en la muestra MSN-L@Gel-L es el doble que en la muestra MSN-L, lo cual se justifica debido a la presencia de LVX tanto en el interior de los mesoporos como en la cobertura externa de gelatina. En el caso de las muestras que incorporan además AC, (MSN-L@Gel<sub>AC</sub> y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>), debido al elevado contenido de materia orgánica, no fue posible realizar a determinación cuantitativa de LVX incorporado en los nanosistemas.

#### 4.2.2 Evaluación de la estabilidad *in vitro* en condiciones fisiológicas

Dado que los materiales MSN@Gels se diseñaron como nanosistemas multiterapia es importante estudiar su evolución en condiciones fisiológicas. Para ello, se realizaron estudios de estabilidad *in vitro* en PBS (pH=7.4) a 37°C durante 96 h y se evaluaron los cambios producidos por TEM tras dicho periodo de incubación. La **Fig. 4.22** muestra un resumen de estos resultados, donde se observa que, si bien la morfología semiesférica de los nanosistemas se mantiene constante tras 96 h de incubación, se aprecia una ligera degradación de la

estructura mesoporosa en todos los materiales estudiados (**Fig. 4.22-C y G**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para las MSN de sílice pura, *sección 4.1.2*, lo cual indica que la cobertura de gelatina no aísla a la matriz de sílice del medio y que, por tanto, permite la difusión de medio acuoso dentro del nanosistema [102], [159]. En cuanto al recubrimiento externo con gelatina, tras su tinción con PTA, se observa la permanencia de dicho recubrimiento tras 96 h (**Fig. 4.22-D y H**). Estos resultados son esperables teniendo en cuenta el pH (pH = 7.4) y la ausencia de enzimas proteolíticas en el medio de incubación que actúen sobre la degradación de la gelatina tal y como se descrito previamente en la literatura [188]–[190].

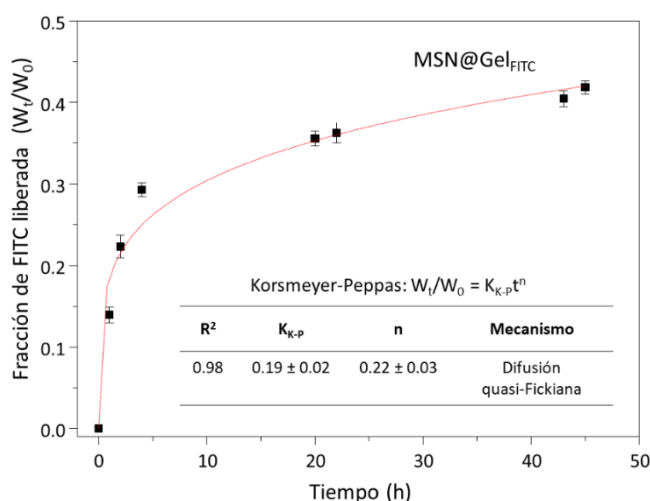


**Fig. 4.22.** Imágenes de TEM de los nanosistemas MSN@Gels antes (t = 0h) y después (t = 96h) de su incubación en condiciones fisiológicas (PBS, pH 7.4 a 37°C). El estudio se realizó con las muestras sin teñir, con el fin de ver la estructura mesoporosa de las nanopartículas, y teñidas con PTA 1%, para observar el recubrimiento de gelatina externo debido a la presencia de materia orgánica.

### 4.2.3 Ensayos de liberación *in vitro*

Una vez estudiadas las propiedades físico-químicas de los nanosistemas MSN@Gels, se procedió a estudiar las cinéticas de liberación de los fármacos cargados tanto en el recubrimiento de gelatina como en el interior de mesoporos de la matriz inorgánica.

Para investigar el mecanismo que gobierna la liberación de fármacos incorporados en el recubrimiento de gelatina se utilizó FITC como molécula modelo fluorescente (muestra MSN@Gel<sub>FITC</sub>) y se realizaron ensayos de liberación *in vitro* tal y como se describe en la sección experimental (sección 3.4). La utilización de esta molécula modelo fluorescente nos ha permitido dilucidar el mecanismo de liberación de la AC con mayor precisión, ya que en el caso de la AC su detección directa por técnicas espectroscópicas es muy compleja.



**Fig. 4.23.** Representación de la fracción liberada de FITC en función del tiempo y resultados del ajuste cinético al modelo de Korsmeier-Peppas (Ecuación 3).

La **Fig. 4.23** muestra la fracción de FITC liberada frente al tiempo. La cantidad de FITC liberada a cada tiempo se normalizó a la concentración total liberada a tiempo infinito ( $W_0$ ). Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Korsmeier-Peppas o “Power Law” (Ecuación 3) [191]:

$$W_t/W_0 = K_{K-P} \cdot t^n \quad (\text{Ecuación 3})$$

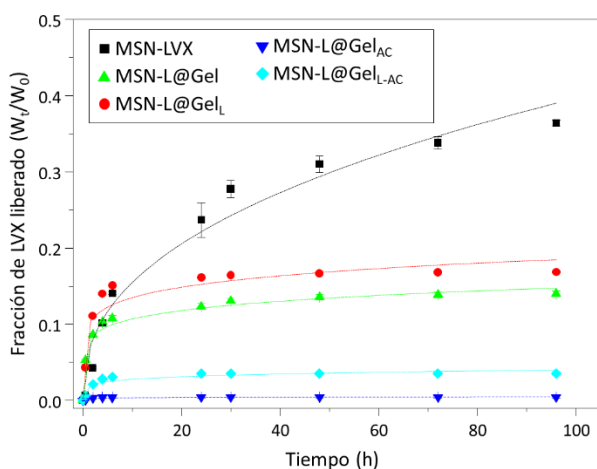
donde  $W_t/W_0$  es la fracción de fármaco liberado a tiempo  $t$ ;  $K_{K-P}$  es la constante de velocidad, que incorpora características estructurales y geométricas del sistema dosificador; y  $n$  es el exponente de liberación, que se determina utilizando la porción de la curva en la que  $W_t/W_0 < 0.6$ .

Se eligió este modelo cinético por ser el más utilizado para estudiar la liberación de fármacos desde hidrogeles [192][193], ya que la ecuación 3 proporciona mucha información al estar

relacionado el valor de  $n$  con el mecanismo de liberación implicado [191], [194], [195]. En el caso de matrices con geometría esférica,  $n < 0.43$  indica un mecanismo de difusión quasi-Fickiana y  $n = 0.43$  una difusión Fickiana. Esto significa que el fármaco puede difundir a través de la matriz del hidrogel porque es mucho más pequeño que el tamaño de la malla y difunde rápidamente. Si  $n > 0.85$ , se denomina transporte Caso II (cinética de orden cero) y la liberación es debida al hinchamiento del sistema. Cuando  $0.43 < n < 0.85$  corresponde a un transporte anómalo (no-Fickiano) y la liberación se debe a una combinación de difusión e hinchamiento del hidrogel.

Los parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 3 se muestran en la tabla insertada en la **Fig. 4.24**. El valor de  $n = 0.22$  se corresponde con un mecanismo de difusión quasi-Fickiana, lo que indica que las moléculas de FITC son capaces de difundir desde el interior de la matriz de gelatina en la que se encuentran embebidas hacia el medio de liberación, con una constante de velocidad de  $6 \times 10^{-2}$ .

Una vez estudiado el comportamiento del recubrimiento de gelatina como sistema dosificador de fármaco, se procedió a estudiar la liberación de LVX desde los distintos nanosistemas MSN@Gels frente al tiempo. Las cantidades iniciales de LVX ( $W_0$ ) contenida en los nanosistemas MSN@Gels se estimó a partir del análisis químico elemental tal y como se muestra en la *sección 4.2.1*. Dado que no fue posible determinar la cantidad de LVX inicial en los nanosistemas conteniendo AC, en este caso, se utilizaron como aproximación las cantidades de LVX determinadas para los sistemas más sencillos, sin AC. La **Fig. 4.25** muestra los perfiles de liberación obtenidos para los sistemas MSN@Gels y la **Tabla 4.3** recoge los resultados derivados del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 3.



**Fig. 4.24.** Fracción de LVX liberado en función del tiempo desde los nanosistemas MSN@Gels. Los datos son la media  $\pm \sigma$  (\*\*\*)  $p < 0.001$  en todos los casos, en comparación con el control MSN). Los experimentos se realizaron por triplicado.

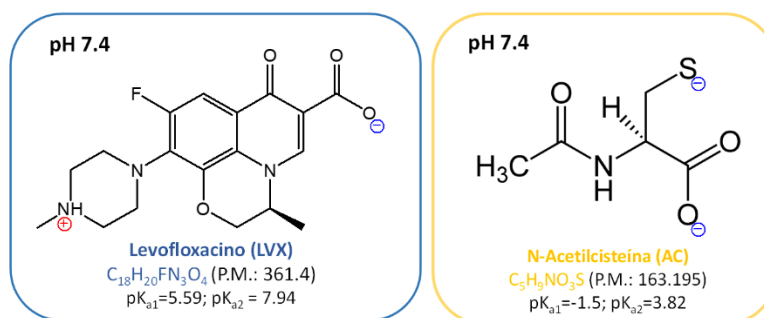
**Tabla 4.3.** Parámetros cinéticos de liberación de LVX desde los diferentes nanosistemas.

Nanosistema	LVX máx. lib. (µg/mg)	R <sup>2</sup>	Constante cinética $K_{K-P} \times 10^2$ (h <sup>-n</sup> )	Exponente de liberación $n$	Mecanismo de difusión
MSN-L	10.6 ± 0.6	0.97	6 ± 1	0.41 ± 0.04	Fickiano
MSN-L@Gel	5.1 ± 0.3	0.89	10 ± 1	0.14 ± 0.03	Quasi-Fickiano
MSN-L@Gel <sub>L</sub>	8.5 ± 0.1	0.87	14 ± 3	0.14 ± 0.02	Quasi -Fickiano
MSN-L@Gel <sub>AC</sub>	0.1 ± 0.01	0.83	0.3 ± 0.1	0.13 ± 0.04	Quasi -Fickiano
MSN-L@Gel <sub>L-AC</sub>	2.3 ± 0.07	0.87	1.9 ± 0.3	0.16 ± 0.04	Quasi -Fickiano

El coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) del modelo de Korsmeyer-Peppas para el LVX liberado desde el nanosistema MSN-L es mayor que el de los nanosistemas con gelatina. Esto confirma que el mecanismo de liberación desde las cavidades mesoporosas en ausencia de recubrimiento obedece un mecanismo de difusión Fickiana (cumple la primera ley de Fick), con un valor de  $n$  muy próximo a 0.43 y una constante cinética  $K_{K-P} = 6 \times 10^2$ . En los nanosistemas con gelatina, los valores de R<sup>2</sup> son ligeramente inferiores y con un valor de  $n$  en el rango de 0.13 a 0.16 lo que avala un mecanismo de difusión quasi-Fickiano. En todos los casos  $n < 0.43$ , tal y como se determinó para la liberación de FITC, lo cual indica que es la difusión de fármaco a través de la matriz de gelatina, y no el hinchamiento del hidrogel, la que gobierna la liberación al medio. Este mecanismo es común para todos los nanosistemas con gelatina, tanto para el LVX que se encuentra en el interior de los mesoporos (MSN-L@Gel y MSN-L@Gel<sub>AC</sub>), como para el LVX adicional embebido en la matriz de gelatina (MSN-L@Gel<sub>L</sub> y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>).

Los resultados de liberación de LVX muestran una retención parcial del antibiótico, siendo más acusada en los nanosistemas con gelatina (**Fig. 4.24**). La retención del LVX desde el nanosistema MSN-L, descrita en la *sección 4.1.3*, es consecuencia de las fuertes interacciones de atracción entre las moléculas de LVX y la gran cantidad de grupos silanol (-SiOH) presentes en las MSN [166][144]. En el caso de los nanosistemas MSN@Gels, se observó una mayor retención comparada con la observada en las MSN de sílice pura, siendo más acusada en el caso de las muestras que incorporan AC (**Tabla 4.3**). Por un lado, en ausencia de AC, la retención del LVX en los nanosistemas (MSN-L@Gel y MSN-L@Gel<sub>L</sub>) podría explicarse debido a las interacciones electrostáticas atractivas entre los grupos amino protonados presentes en la gelatina (Equilibrio 3, *sección 4.2.1*) y los grupos carboxilato del LVX a pH = 7.4 (**Fig. 4.25**). Por otro lado, en los nanosistemas conteniendo AC (MSN-L@Gel<sub>AC</sub> y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>), esta retención podría deberse a las interacciones electrostáticas atractivas entre los grupos amino

protonados presentes en la gelatina y los grupos sulfuro y carboxilato de la AC a pH = 7.4 (**Fig. 4.25**), las cuales dificultarían la difusión de las moléculas de LVX a través de la matriz del hidrogel y provocaría una mayor retención del mismo en estos nanosistemas.



**Fig. 4.25.** Estructura de la especie relativa más abundante a pH = 7.4 y principales propiedades químicas del antibiótico levofloxacin (LVX) y el agente mucolítico N-acetilcisteína (AC).

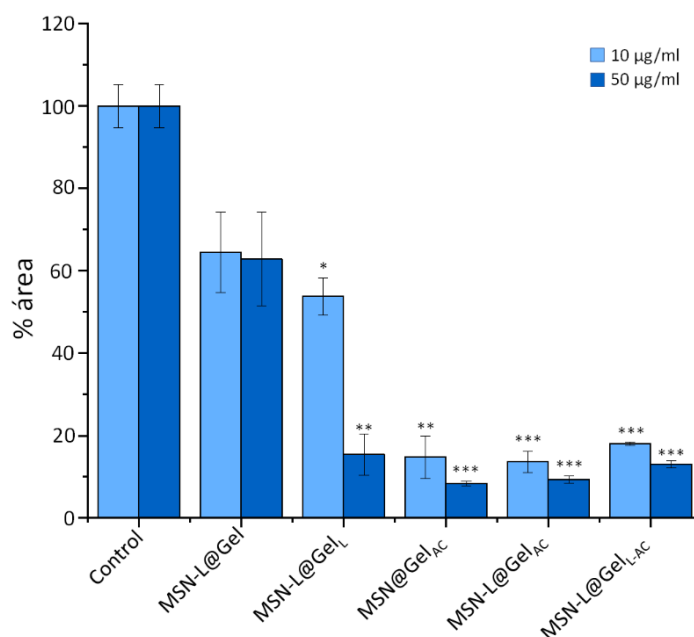
#### 4.2.4 Estudios de efectividad antibiofilm

Una vez caracterizados y comprobada la capacidad de los nanosistemas MSN@Gels para liberar los diferentes agentes terapéuticos albergados, se determinó su eficacia antimicrobiana directamente sobre biofilm. Dichos estudios se realizaron poniendo diferentes concentraciones de los nanosistemas en contacto directo sobre biofilms preformados de *E. coli*. Dado que la AC ejerce un efecto disgregante del biofilm y con el fin de visualizar este efecto, se han realizado estudios por microscopía confocal tiñendo la cubierta protectora del biofilm con calcoflúor (azul) y las bacterias vivas/muertas con el reactivo LIVE/DEAD® BacLight™ que tiñe las bacterias muertas (rojo) y vivas (verde). Por otra parte, se han realizado estudios cuantitativos de la eficacia antimicrobiana de los nanosistemas mediante recuento de CFU/mL, siguiendo el procedimiento descrito para cada experimento en la *sección 3.5.2*.

##### a) Efecto antibiofilm de los materiales MSN@Gels por microscopía confocal

La **Fig. 4.26** muestra los histogramas correspondientes al área azul ocupada representada por la matriz de mucopolisacárido protectora del biofilm bacteriano (que ha sido teñida con calcoflúor) [196]. Los resultados obtenidos muestran una reducción superior al 80% de la matriz de mucopolisacárido para los nanosistemas que contienen AC en su composición a una concentración de 10 µg/mL. Dicha reducción, se incrementa a un 90% cuando la concentración es de 50 µg/mL en presencia de AC. Estos resultados pueden explicarse en base a la acción mucolítica de la AC, presente en estas muestras. En este caso, la AC, al liberarse de los nanosistemas MSN@Gels, es capaz de fluidificar y disgregar la matriz protectora del biofilm bacteriano, como consecuencia de la rotura de los enlaces disulfuro entre glicoproteínas presentes en el biofilm [197]–[199].

Es importante remarcar, que para las muestras que contienen LVX en ausencia de AC (MSN-L@Gel y MSN-L@Gel<sub>L</sub>) existe también una reducción del biofilm, efecto que se ve incrementado al aumentar la cantidad de LVX liberado (**Fig. 4.24**). Dicha reducción podría atribuirse a la muerte celular de las bacterias más superficiales del biofilm por la acción del antibiótico liberado, lo cual provocaría la rotura y el desprendimiento parcial de pequeños fragmentos del biofilm [200].

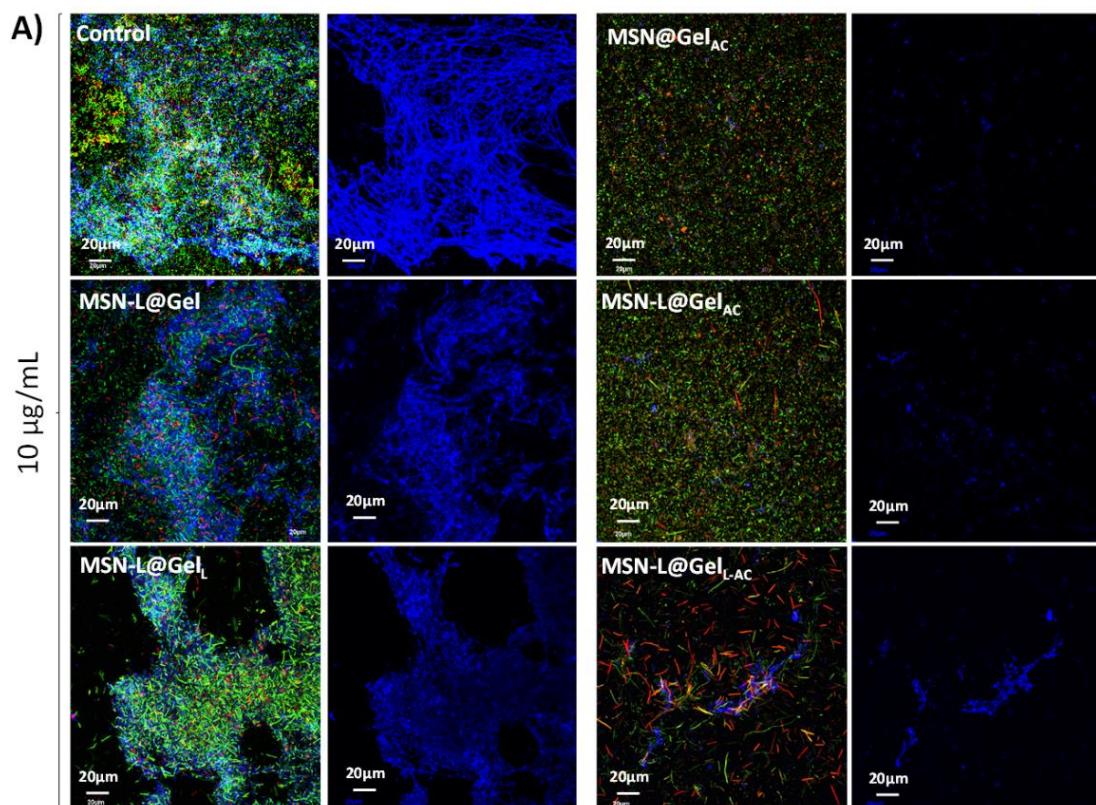


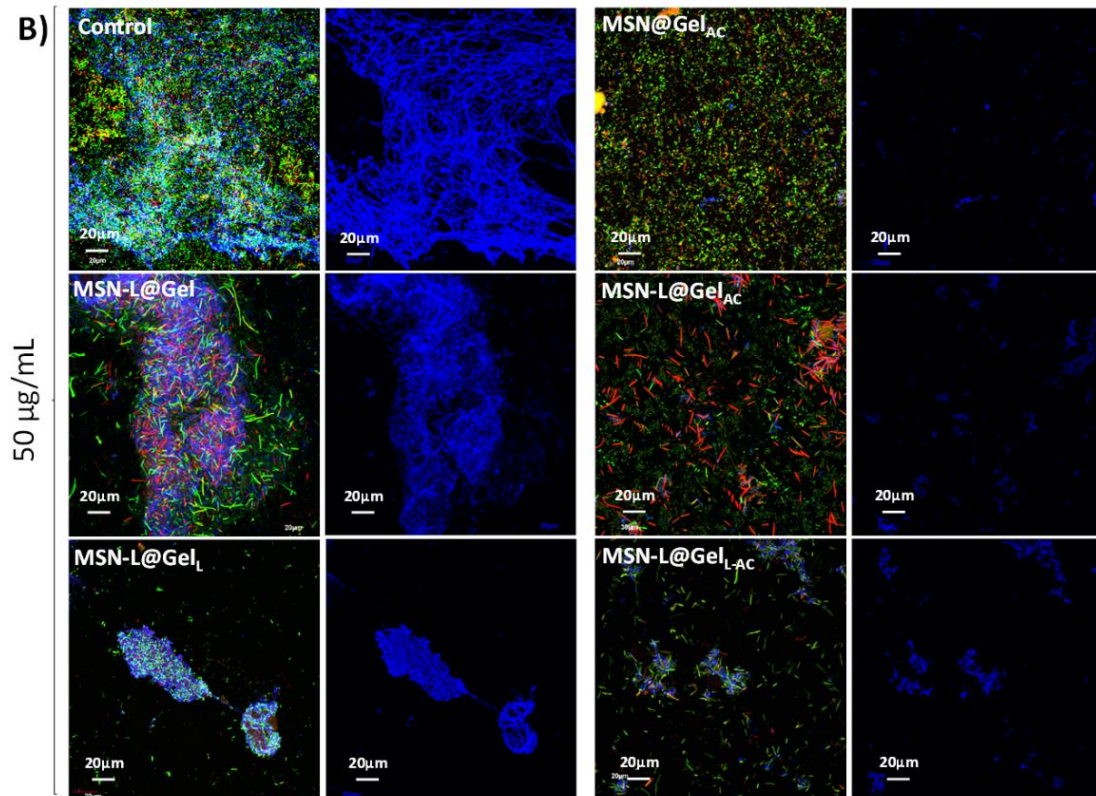
**Fig. 4.26.** Porcentaje de área ocupada por la matriz de mucopolisacáridos (azul) de los biofilms de *E. coli* tratados con los diferentes nanosistemas MSN@Gels a diferentes concentraciones 10 y 50 µg/mL, respectivamente, obtenidos por microscopia confocal. El área ocupada se ha calculado a partir de ocho imágenes de confocal de diferentes zonas del biofilm y tratadas con el programa Imagen J para calcular el porcentaje de zona ocupada. Los datos son la media  $\pm \sigma$  (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control, \*\*  $p < 0.01$ , en comparación con el control, \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el control). El experimento se realizó por triplicado.

Las imágenes de confocal mostrando por un lado el canal azul (capa de mucopolisacárido) y por otro lado los tres canales verde, rojo y azul (bacterias vivas, bacterias muertas y capa de mucopolisacárido, respectivamente), permitieron visualizar el efecto de la AC y el LVX de los diferentes nanosistemas sobre la matriz, la morfología y la viabilidad de las bacterias del biofilm de *E. coli* (**Fig. 4.27**). Para la muestra control se observa una estructura típica del biofilm formada en su totalidad por un manto de células vivas (verdes) con una pequeña proporción de bacterias muertas localizadas en las partes más profundas del biofilm (rojo) y una cubierta externa de mucopolisacárido (azul) formando un entramado protector. Tras el tratamiento con los diferentes nanosistemas, a la concentración de 10 µg/mL, se observan diferencias entre las muestras que contienen AC de las que no (**Fig 4.27-A**). En buen acuerdo

con la **Fig. 4.26**, en las imágenes de confocal de la zona azul, se observa una notable reducción de la matriz con casi su desaparición para las muestras que contienen AC (MSN@Gel<sub>AC</sub>, MSN-L@Gel<sub>AC</sub> y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>). Es importante resaltar que para la muestra MSN@Gel<sub>AC</sub> existe una total desaparición de la zona azul, sin afectar al manto formado por bacterias vivas (verdes). Estos resultados ponen de manifiesto, que la AC sólo ejerce efecto disgregante y no antimicrobiano ya que no existe muerte celular. Por el contrario, en ausencia de AC (MSN-L@Gel, MSN-L@Gel<sub>L</sub>) si bien se observa una disminución del manto verde con la LVX, la capa de mucopolisacárido (azul) permanece prácticamente inalterada.

En el caso de la muestra conteniendo ambos agentes (AC y LVX), el efecto antibiofilm es más acusado para la muestra MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub> debido a la mayor cantidad de LVX liberado desde esta muestra y la actuación mucolítica de la AC sobre la matriz facilitando la penetración del antibiótico en el biofilm [201]. Este resultado demuestra el efecto sinérgico entre el LVX y la AC liberados de forma combinada desde la misma nanoplataforma.





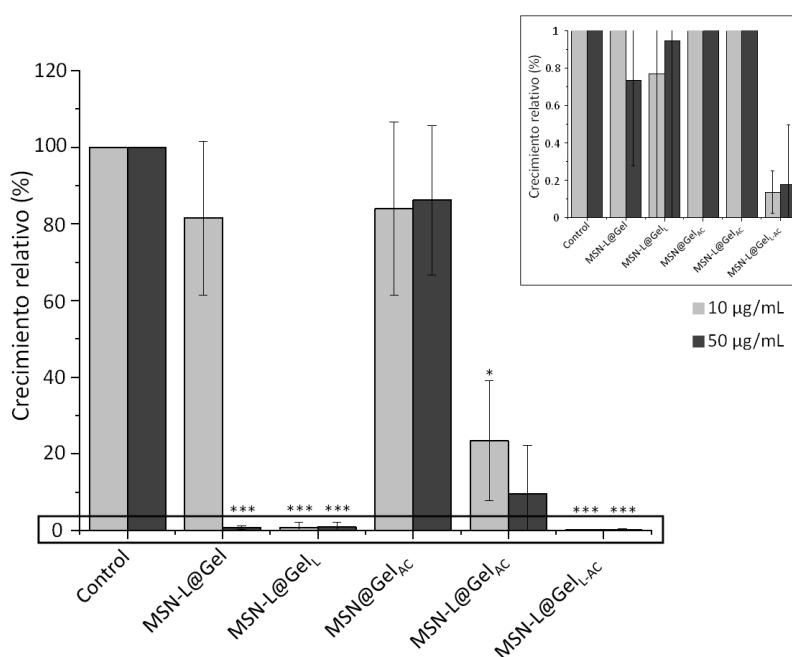
**Fig. 4.27.** Imágenes de microscopía confocal del biofilm de *E. coli* tras el tratamiento con A) 10 µg/mL o B) 50 µg/mL de los materiales MSN@Gels. Se muestran dos columnas para cada muestra, a la izquierda los tres canales azul, verde y rojo, (matriz, bacterias vivas y bacterias muertas) y a la derecha el canal azul (matriz), con el fin de ver sólo el efecto disgregador sobre la matriz del biofilm.

Cuando aumentamos la dosis de los nanosistemas a 50 µg/mL (**Fig. 4.27-B**), también se observan diferencias entre las muestras en presencia o ausencia de AC. Las muestras que contienen AC (MSN@Gel<sub>AC</sub>, MSN-L@Gel<sub>AC</sub> y MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>) presentan una notable reducción de la matriz representada por la zona azul. Por el contrario, se observan grandes bloques de matriz en las muestras sin AC (MSN-L@Gel y MSN-L@Gel<sub>L</sub>). Cabe remarcar que, en estos nanosistemas, a pesar de la presencia de matriz se observa una notable reducción del manto formado por bacterias. Esto podría atribuirse a la muerte celular de las bacterias debido a la acción del antibiótico liberado que es mayor al emplear más dosis de nanopartículas provocando un mayor desprendimiento parcial del biofilm.

De nuevo, cuando la muestra combina ambos agentes (LVX+AC), se observa un efecto sinérgico entre ambos fármacos que se ve más acusado en el caso que la cantidad de LVX sea mayor (MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>).

**b) Efecto antibiofilm de los materiales MSN@Gels por cuantificación de CFU/mL**

Paralelamente se realizó un estudio cuantitativo de la eficacia antibiofilm mediante el recuento de las CFU/mL, con el fin de determinar la reducción de los biofilms de *E. coli* tras el tratamiento con 10 y 50 µg/mL de cada una de las muestras MSN@Gels. En la **Fig 4.28** se representa el crecimiento relativo de las bacterias presentes en el biofilm de *E. coli* tratado con los diferentes nanosistemas MSN@Gels. Los resultados mostraron una reducción del 80% del biofilm tras el tratamiento con 10 µg/mL del nanosistema MSN-L@Gel<sub>AC</sub>. Dicha reducción se incrementó hasta un 99% con el nanosistema MSN-L@Gel<sub>L</sub>, debido a la presencia de LVX en ambos compartimentos, los mesoporos y el recubrimiento, lo cual aumenta la concentración de LVX liberado (**Fig. 4.24**). Este resultado verifica la ventaja de incorporar el antibiótico en el compartimento de gelatina. Con el nanosistema MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>, la reducción aumentó hasta un 99.8 % (**Fig. 4.28**), gracias a la liberación combinada del LVX y la AC, actuando sobre la matriz y las bacterias de manera sinérgica, en buen acuerdo con los resultados derivados del estudio mediante microscopía confocal (**Fig. 4.27**).



**Fig. 4.28.** Porcentaje de crecimiento relativo derivado de la actividad antibiofilm *in vitro* de los diferentes materiales MSN@Gels sobre biofilms de *E. coli*, empleados a 10 y 50 µg/mL. El cuadro superior es una ampliación de los porcentajes hasta el 1%. Se representan los datos como la media  $\pm \sigma$  (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control, \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el control). El experimento se realizó por cuadruplicado.

Tras el tratamiento del biofilm con 50 µg/mL de los diferentes nanosistemas MSN@Gels, se observó una mayor reducción del biofilm en aquellos sistemas que contienen LVX (**Fig 4.28**). Esto es debido al efecto del LVX, el cual como se observó mediante microscopía confocal, es

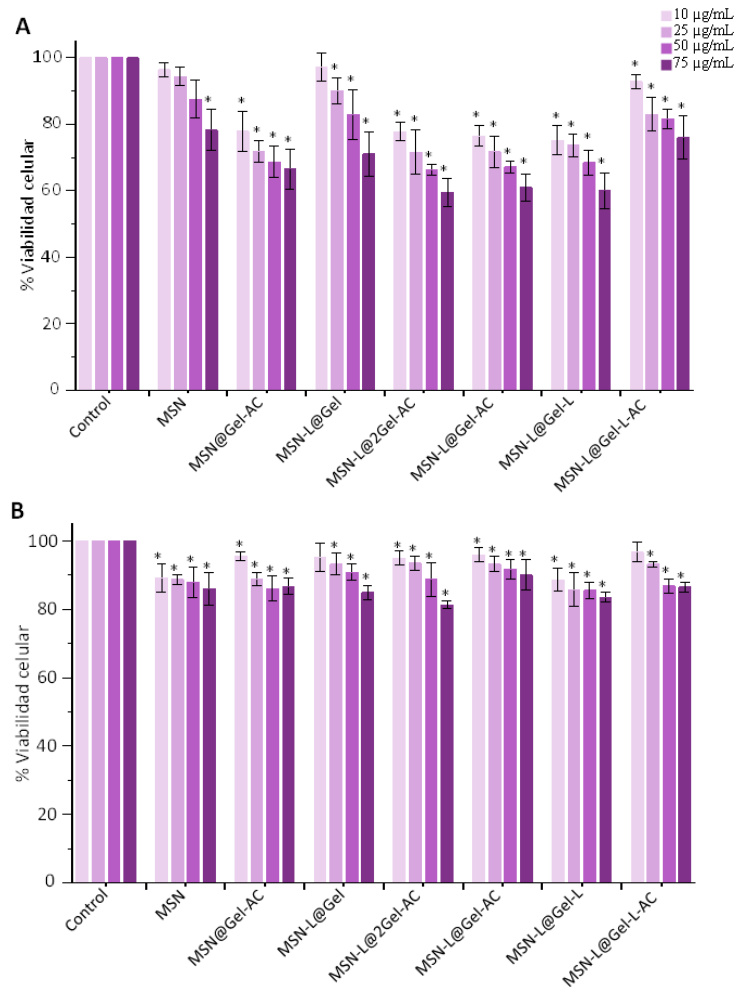
capaz de provocar el desprendimiento parcial del biofilm en ausencia de AC (**Fig. 4.26 y 4.27-B**).

Los resultados cuantitativos derivados de la determinación de CFUs/mL, en concordancia con el estudio realizado por microscopía confocal, la liberación combinada de LVX y AC provoca la mayor reducción del biofilm con un porcentaje de reducción del 99.8 % alcanzada por el nanosistema MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub> (**Fig. 4.28**), gracias al efecto sinérgico entre el LVX y la AC. El porcentaje de reducción del biofilm del nanosistema MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>, fue similar en ambas concentraciones, 10 y 50 µg/mL (**Fig. 4.28**), lo cual permitiría utilizar una menor dosis de material para conseguir el mismo efecto antimicrobiano.

#### **4.2.5 Estudios de la biocompatibilidad *in vitro***

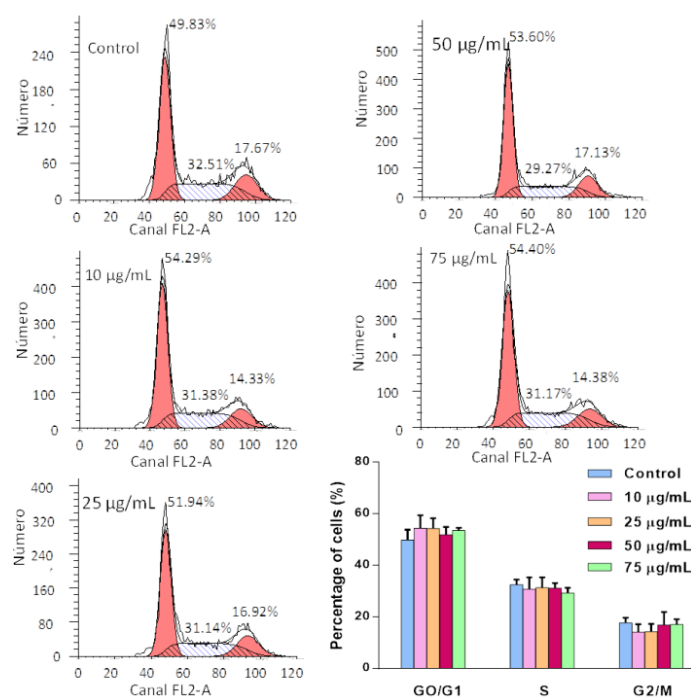
Teniendo en cuenta que los nanosistemas MSN@Gels se han diseñado para el tratamiento de la infección ósea, es necesario evaluar su biocompatibilidad *in vitro*, estudio previo indispensable a cualquier ensayo *in vivo*. Se realizaron ensayos preliminares *in vitro* de citotoxicidad celular sobre células preosteoblásticas MC3T3-E1, utilizando los diferentes nanosistemas MSN@Gels a diferentes concentraciones, tal y como se describe en la *sección 3.6.1.1*. Los resultados mostraron una buena biocompatibilidad tras 24 horas en contacto a las concentraciones de 10, 25 y 50 µg/mL, observándose una pequeña reducción por encima del 60% de viabilidad para la concentración de 75 µg/mL (**Fig. 4.29-A**). Estos resultados pueden explicarse debido a la conocida inocuidad de la gelatina y la acción antioxidante de la AC, capaz de eliminar la especies ROS relacionadas con el estrés oxidativo intracelular [202][203].

Posteriormente, se comprobó la viabilidad de las células tratadas tras 72 h de recuperación en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con FCS, glutamina y antibiótico. Los resultados mostraron una recuperación de la viabilidad con valores por encima del 80% en todos los casos y concentraciones testadas (**Fig. 4.29-B**). Estos resultados están de acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos para las MSNs sin gelatina (*sección 4.1.5*), donde se demuestra una vez más la biocompatibilidad de los materiales basados en MSNs con células preosteoblásticas. En comparación, el nivel de viabilidad celular ha sido ligeramente superior en las células tratadas con los materiales MSN@Gels, especialmente en presencia de AC debido a la acción antioxidante de la AC, capaz de reducir el daño por estrés oxidativo en las células tratadas y, como consecuencia, promover la proliferación celular, demostrando la ventaja de incorporar AC en los materiales.



**Fig. 4.29.** Viabilidad celular (%) de los preosteoblastos MC3T3-E1 tras A) 24 h y B) 72 h después del tratamiento con los diferentes materiales MSN@Gels, empleando las concentraciones 10, 25, 50 y 75 µg/mL en medio de cultivo. Se representa la media  $\pm$   $\sigma$ . (\*  $p < 0.05$ , en comparación con el control). El experimento se realizó por triplicado.

Paralelamente, se realizó un estudio del ciclo celular de los preosteoblastos en contacto con el material MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>, con el fin de estudiar posibles cambios en el ciclo normal de la célula tras el tratamiento con el nanosistema. El ensayo se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo los pasos descritos en la *sección 3.6.1.2* sobre la muestra completa MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>. Los resultados derivados del estudio indican que no se vio afectado el proceso de duplicación del material genético (fase G1 y S), la fase preparatoria a la división (Fase G2) ni la división celular (fase M) tras el contacto con alguno de los componentes del material MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub>, ya que no se observaron cambios en ninguna de las concentraciones empleadas en comparación con el control (**Fig. 4.30**). Estos resultados corroboran la biocompatibilidad de los materiales basados en MSNs sobre células preosteoblásticas.



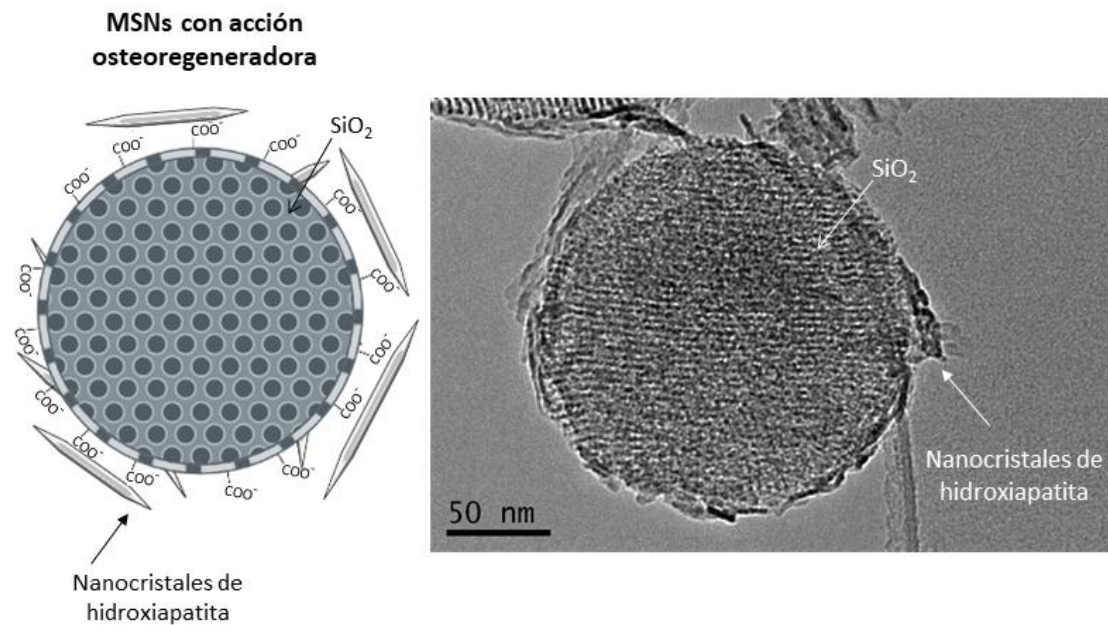
**Fig. 4.30.** Distribuciones representativas del ciclo celular de la línea celular MC3T3-E1 tras el tratamiento con el sistema MSN-L@Gel<sub>L-AC</sub> a las concentraciones 10, 25, 50 y 75 µg/mL, analizado mediante citometría de flujo. El panel inferior derecho muestra la cuantificación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. Se representa la media ± σ. El experimento se realizó por triplicado.

Como conclusión de este capítulo (sección 4.2), se han diseñado nanosistemas multitierapia biocompatibles basados en MSNs para combatir el biofilm bacteriano. Estos nanosistemas se caracterizan por presentar LVX en el interior de los mesoporos de las MSN y una cubierta externa de gelatina alrededor de la nanopartícula capaz de albergar y liberar un agente mucolítico (AC) o una combinación de AC + antibiótico. Estos nanosistemas multitierapia se presentan como potentes *nanoantibióticos* combinando el efecto de ambos fármacos desde un mismo nanosistema. La acción combinada y sinérgica entre la AC y el LVX permite erradicar completamente el biofilm de una manera muy eficaz.

### 4.3 MSNs como nanosistemas multifuncionales (MSN@HA)

En este apartado se discuten los resultados obtenidos en el diseño de nanosistemas multifuncionales basados en MSNs que favorezcan la regeneración ósea al mismo tiempo que combatan la infección (MSN@HA). Para ello, se ha sintetizado un nanosistema MSNs en cuya superficie se han incorporado nanocristales de hidroxapatita (HA). Estos cristales de HA tienen la propiedad de promover la regeneración ósea al ser el componente mineral del hueso (**Fig. 4.31**).

En esta sección **4.3** se muestra (1) el diseño, síntesis y caracterización de un nanosistema multifuncional (MSN@HA) y (2) su capacidad osteogénica mediante estudios *in vitro* con células preosteoblásticas.

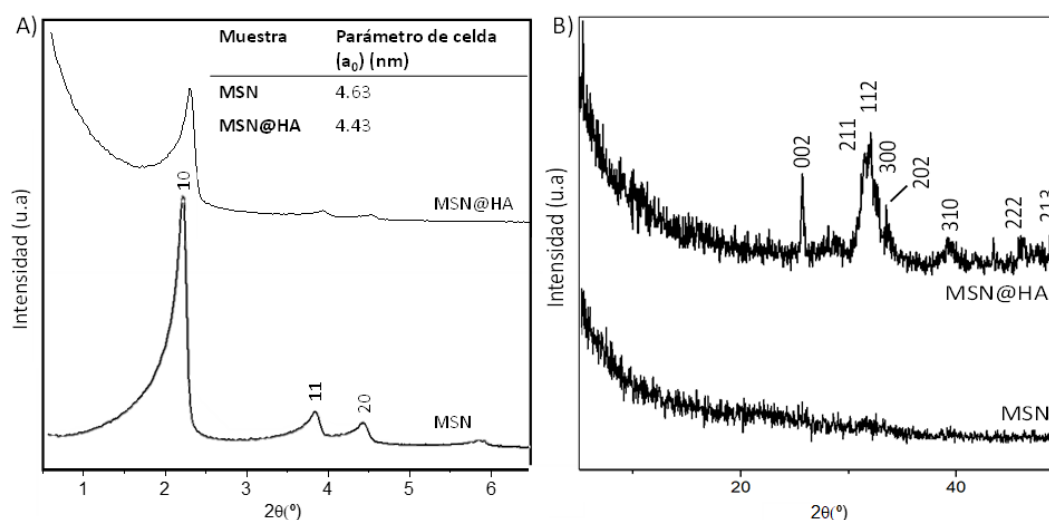


**Fig. 4.31.** Resumen gráfico del objetivo de los materiales MSN@HA como nanosistemas multifuncionales.

### 4.3.1 Caracterización de los materiales MSN@HA

La síntesis del nanosistema MSN@HA se ha realizado mediante un proceso biomimético sobre las MSN previa carboxilación de la superficie. Una vez sintetizadas las MSNs se procedió a la funcionalización post-síntesis con grupos carboxilo (-COOH) los cuales favorecen la nucleación y precipitación de fosfatos de calcio (CaP) en su superficie en un medio básico (ver *sección experimental 3.1.5*) [148].

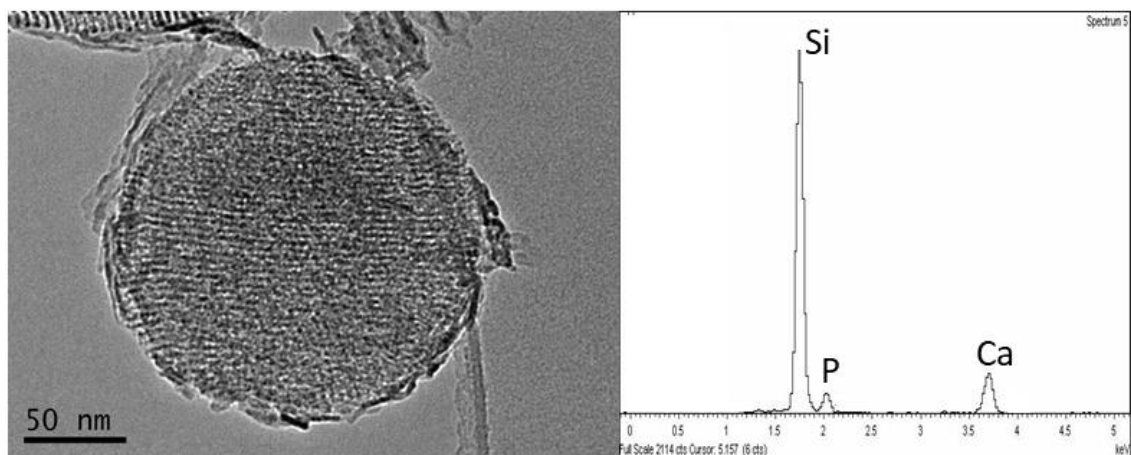
La caracterización estructural y morfológica del nanosistema se realizó por XRD y TEM. Los resultados de XRD a bajo ángulo mostraron un patrón de difracción característico de una estructura MCM-41 con poros ordenados en el sistema 2D hexagonal correspondiente a las MSN de partida (**Fig. 4.32-A**). La ligera disminución en el valor del parámetro de celda en la muestra MSN@HA podría atribuirse a un aumento del espesor de la pared del poro. Con el fin de evaluar la efectividad del proceso biomimético durante la síntesis del nanosistema MSN@HA, se realizaron medidas de XRD a alto ángulo (**Fig. 4.32-B**). Los resultados en la muestra MSN evidencian la naturaleza amorfa de las MSNs de partida. Sin embargo, el perfil de difracción de la muestra MSN@HA es típico de una hidroxiapatita nanocrystalina, semejante al componente mineral del hueso [204].



**Fig. 4.32.** A) Diagramas de XRD a bajo ángulo de los nanosistemas MSN y MSN@HA. Las reflexiones se han indexado asumiendo una estructura de poros 2D hexagonal (grupo planar  $p6mm$ ). Los parámetros de red de la celda unidad se muestran en una tabla a partir del espaciado interplanar  $d_{10}$  y calculado a partir de  $a_0=2d_{10}/\sqrt{3}$ . B) Diagramas de XRD a alto ángulo de los materiales MSN y MSN@HA.

El estudio del nanosistema MSN@HA mediante TEM corroboró la conservación de la morfología y el ordenamiento mesoporoso de las MSN tras ser sometidas al proceso de mineralización biomimético (**Fig. 4.33**). Además, la imagen de TEM mostró la presencia de

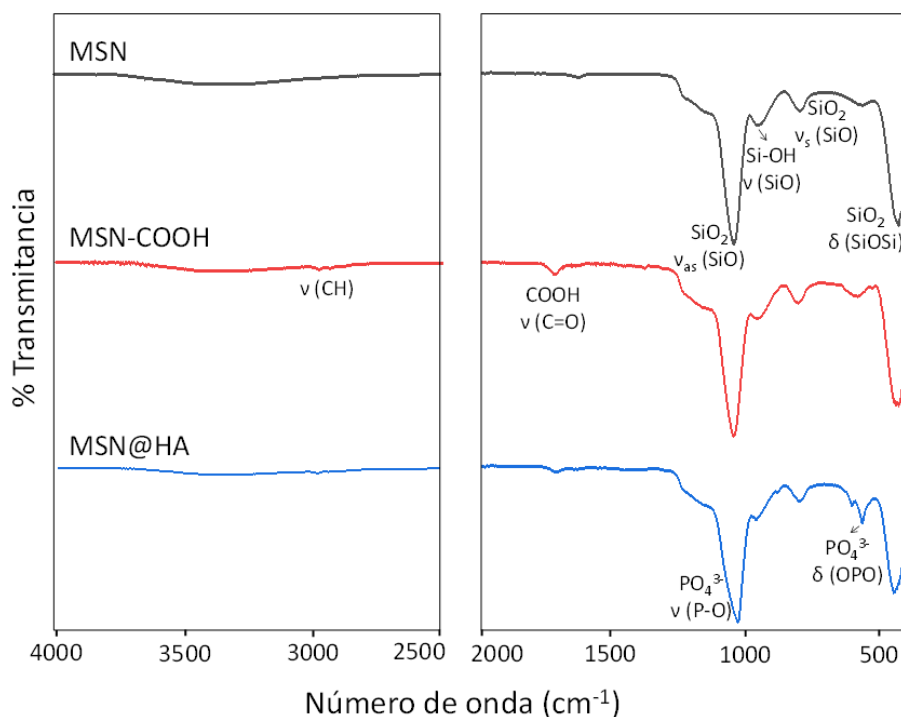
nanocristales de HA en forma de aguja en contacto íntimo con la superficie de las MSN (**Fig. 4.33**).



**Fig. 4.33.** Imagen de TEM y EDS del nanosistema MSN@HA

Los estudios por EDS del nanosistema revelan un alto porcentaje, de aprox. el 85%, de sílice correspondiente a la MSN así como la presencia de Ca y P con un porcentaje total de aprox. el 15% en el nanosistema MSN@HA (**Fig. 4.33**). La relación molar Ca/P obtenida es de 1.60, el cual es similar al determinado para la HA ( $\text{Ca}/\text{P}_{\text{HA}} = 1.67$ ) [205], confirmando la composición del recubrimiento como nanocristales de CaP tipo hidroxiapatita deficiente en calcio.

La incorporación de los distintos grupos funcionales en la superficie de las MSNs en las diferentes etapas del proceso de síntesis de las MSN@HA se estudió por FTIR. El espectro de la muestra MSN-COOH mostró, además de las bandas características de la sílice amorfa (ver *sección 4.1.1*), la banda situada en  $1650\text{ cm}^{-1}$  perteneciente a la tensión  $\nu\text{CO}$  del grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), que dan constancia de la presencia de estos grupos funcionales en el nanosistema (**Fig. 4.34**). En el nanosistema MSN@HA también puede observarse la banda característica del grupo fosfato en entorno cristalino ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), concretamente la banda de tensión  $\nu\text{PO}$  del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  alrededor de  $1000\text{ cm}^{-1}$  en la misma región que la  $\nu\text{SiO}_2$ , y un doblete característico de la vibración de flexión  $\delta\text{OPO}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  en entorno cristalino a  $600$  y  $575\text{ cm}^{-1}$  de la fase apatita (**Fig. 4.34**) [153].



**Fig. 4.34.** Espectros de FTIR (regiones 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$  y 2000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondiente a los nanosistemas MSN, MSN-COOH y MSN@HA.

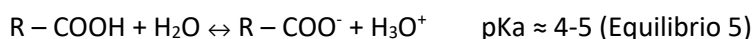
Los estudios mediante TG permitieron determinar el contenido de materia orgánica en las muestras estudiadas. Los resultados, recogidos en la **Tabla 4.4**, mostraron un aumento en el porcentaje de peso en los nanosistemas MSN-COOH y MSN@HA en comparación con las MSN de partida, debido a la funcionalización orgánica. Sin embargo, aunque esta funcionalización se mantiene en la muestra MSN@HA tras la nucleación de HA, aumenta la cantidad de materia inorgánica en el nanosistema y explicaría la disminución en el valor del porcentaje de materia orgánica.

**Tabla 4.4.** Contenido en materia orgánica y valores de máximo de distribución de tamaño y potencial-( $\zeta$ ) zeta de los nanosistemas MSN, MSN-COOH y MSN@HA.

	Materia orgánica (% peso)	$D_H$ (nm)	Potencial-( $\zeta$ ) zeta (mV)	Adsorción de nitrógeno		
				$S_{BET}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_P$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	$D_P$ (nm)
<b>MSN</b>	8.4	220	-29.4	1237	1.1	2.8
<b>MSN-COOH</b>	20.6	220	-36.3	935	0.8	2.5
<b>MSN@HA</b>	16.1	255	-14.2	1022	1.3	2.5

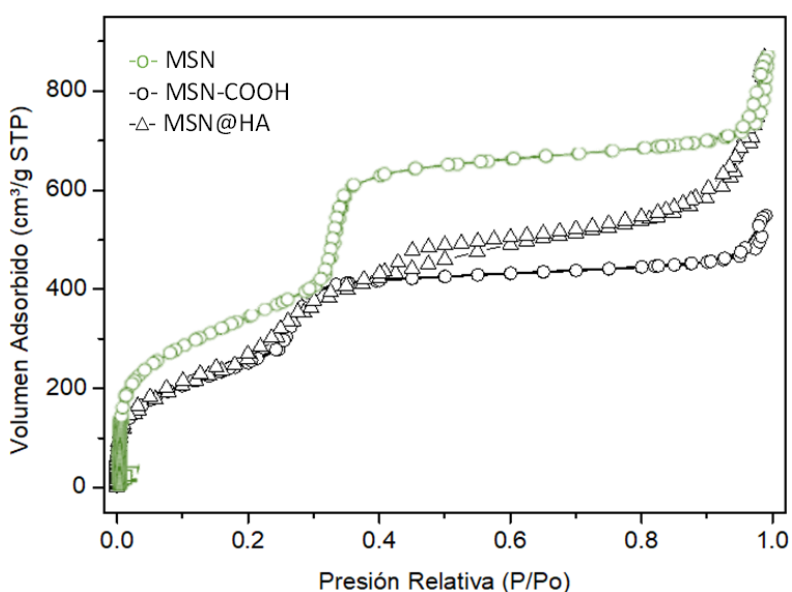
La evolución de la carga superficial de los nanosistemas se evaluó mediante medidas de potencial-( $\zeta$ ) zeta en agua. Los resultados mostraron un cambio a valores más negativos desde

MSN a MSN-COOH tras la funcionalización con grupos carboxilo (-COOH) (**Tabla 4.4**), como consecuencia de la desprotonación de los grupos carboxilo (-COO<sup>-</sup>) en la superficie de las MSN-COOH en agua (*Equilibrio 5*). Estos valores se volvieron más positivos en el nanosistema MSN@HA (**Tabla 4.4**), tras la incorporación de la HA, confirmando la nucleación de este CaP sobre los grupos carboxilo (-COOH).



De los resultados del estudio mediante DLS, cabe resaltar el aumento en el tamaño hidrodinámico del nanosistema MSN@HA, que confirma la estructura núcleo@corteza con el recubrimiento de los nanocristales de HA sobre la superficie de estas MSNs (**Tabla 4.4**).

Con el fin de evaluar la capacidad del nanosistema para albergar diferentes agentes antimicrobianos, se ha realizado un estudio de las propiedades texturales mediante porosimetría de adsorción de N<sub>2</sub>. Los estudios muestran isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> (tipo IV) propias de los materiales mesoporosos tipo MCM-41 con poros cilíndricos paralelos libres (**Fig. 4.35 y Fig. 4.2-F**). Este resultado indica que el recubrimiento con nanocristales de HA no impide el paso de N<sub>2</sub> al interior de los poros y, por tanto, los poros quedan libres para que el material pueda ejercer como sistema liberador de fármacos. Los parámetros texturales calculados para los nanosistemas MSN-COOH y MSN@HA indicaron valores de S<sub>BET</sub>, V<sub>P</sub> y D<sub>P</sub> similares a los obtenidos para las MSN de partida, con ligeras variaciones atribuibles al proceso de funcionalización y posterior recubrimiento con HA (**Tabla 4.4**).

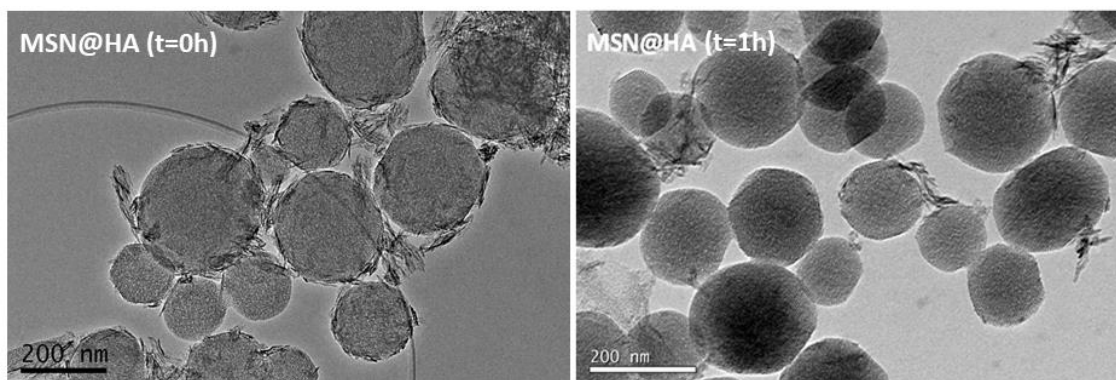


**Fig. 4.35.** Isotherma de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de los nanosistemas MSN, MSN-COOH y MSN@HA.

### 4.3.2 Efecto sobre las células preosteoblásticas

Una vez caracterizado el nanosistema MSN@HA con estructura núcleo@corteza cuya superficie está formada por cristales de hidroxiapatita nanocrystalina similar al componente mineral del hueso, se pretende evaluar su efecto en células osteoblásticas en cuanto a su capacidad de regeneración. Para ello, dichos nanosistemas deberían ser internalizados por las células preosteoblásticas y fomentar su diferenciación celular. Estudios previos han demostrado que la internalización de las MSNs se produce mediante endocitosis [206]. Durante este proceso, las MSNs se ven recubiertas por un lisosoma cuyo interior presenta un pH ácido de 5.5 [207]. Por lo tanto, es importante conocer la estabilidad del nanosistema MSN@HA a pH ácido.

Tras la incubación del nanosistema MSN@HA en tampón acetato pH = 5.5, se observó una disminución en el grado de recubrimiento con HA de estas MSNs (**Fig. 4.36**), como consecuencia del incremento en la solubilidad de la HA debido a la disminución del pH [208]. Dicha disolución se reflejó en los resultados de EDS, donde se observó una disminución de aprox. el 10% en el porcentaje atómico total de Ca y P y una disminución en la relación molar Ca/P con un valor de 1.37 comparado con el valor inicial de 1.60 de las MSN@HA de partida (**Fig. 4.36**).

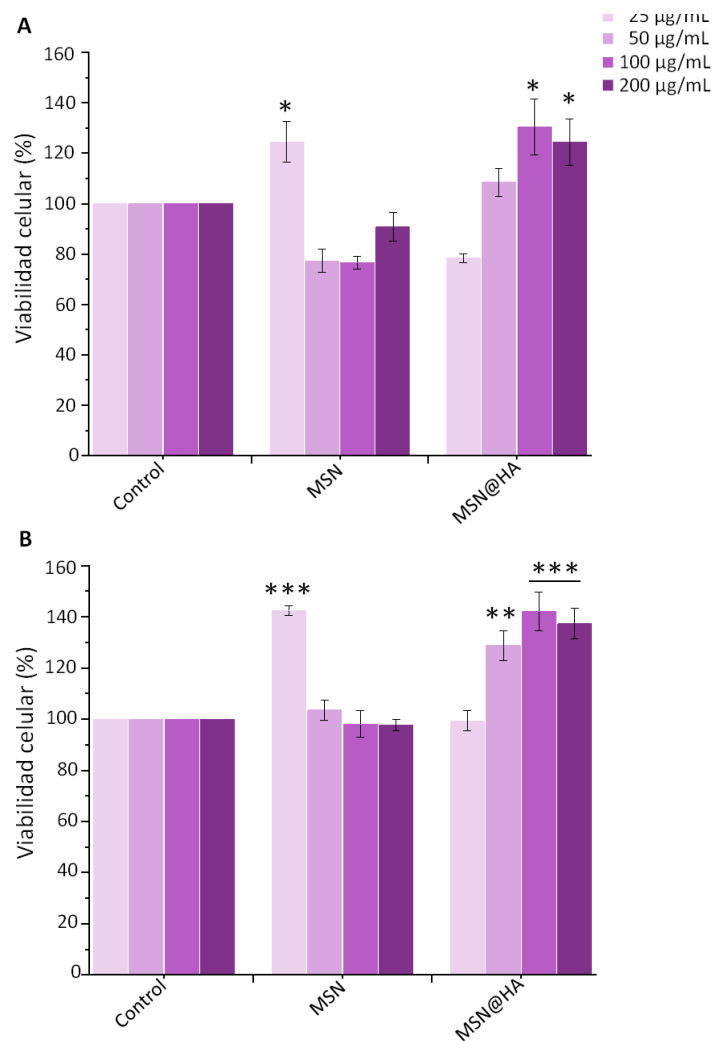


**Fig. 4.36.** Micrografías de TEM resultantes del ensayo de estabilidad del recubrimiento de CaP a pH = 5.5 sobre el material MSN@HA.

Finalmente, se evaluó la capacidad osteorregeneradora del material MSN@HA sobre células preosteoblásticas de ratón de la línea celular MC3T3-E1. En primer lugar, se determinó la citotoxicidad de los diferentes materiales MSN@HA y, a continuación, se realizaron diferentes ensayos con el fin de determinar su potencial para crear una respuesta bioactiva sobre los preosteoblastos, analizando desde la capacidad de internalización de los materiales hasta su capacidad para inducir la diferenciación osteoblástica.

### 4.3.2.1 Viabilidad celular

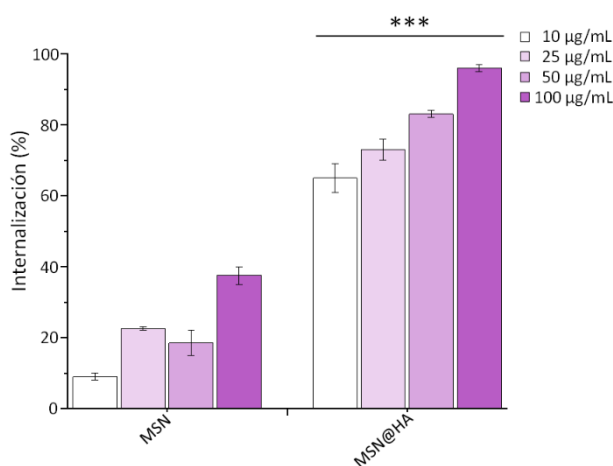
El estudio de la viabilidad celular se realizó empleando diferentes concentraciones de los materiales (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en contacto con preosteoblastos. Los resultados de la viabilidad celular, medidos a las 24 h de incubación en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM, mostraron valores de viabilidad superiores al 80% en todas las muestras y concentraciones ensayadas (**Fig. 4.37-A**). Los resultados de viabilidad a las 48 h mostraron resultados significativos ( $p < 0.001$ ), con un aumento de los valores de viabilidad de casi el 100% en todos los nanosistemas (**Fig. 4.37-B**). Estos resultados muestran la biocompatibilidad del nanosistema MSN@HA hasta concentraciones de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual es esperable dado que tanto las MSN como la HA son biocompatibles (en el caso de la HA es uno de los componentes de la matriz ósea) [209].



**Fig. 4.37.** Viabilidad celular (%) de los preosteoblastos MC3T3-E1 tras A) 24 h y B) 48 h después del tratamiento con los diferentes nanosistemas, empleando las concentraciones 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM. Se representa la media  $\pm \sigma$ . (\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  en comparación con el control). El experimento se realizó por triplicado.

#### 4.3.2.2 Evaluación de la internalización

Se llevó a cabo un estudio de internalización del material MSN@HA mediante citometría de flujo empleando diferentes concentraciones de nanosistema (10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tal y como se describe en la *sección 3.6.2*. El fin de este estudio fue analizar la capacidad de los preosteoblastos para incorporar los nanosistemas MSN@HA en su interior. En los resultados, representados en la **Fig. 4.38**, se observó un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) de la internalización de las MSN recubiertas con nanocristales de HA en todas las concentraciones testadas en comparación con las MSN sin recubrimiento. Se registró un porcentaje de internalización superior al 60% en todas las concentraciones testadas, destacando un porcentaje de internalización de casi el 100% empleando 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del nanosistema MSN@HA. Estos resultados muestran una notable mejoría en la capacidad de internalización de las MSN en presencia de los nanocristales de HA. La internalización de las nanopartículas está influenciada por diferentes factores como el tamaño, la forma o la carga superficial del nanosistema. Diferentes estudios han determinado un tamaño óptimo entre 150-200 nm para favorecer la internalización en las células sin producir citotoxicidad [210]–[213]. Además, una carga superficial positiva también favorecería la internalización de las nanopartículas [213]–[215]. En este caso, el nanosistema MSN@HA presenta un tamaño óptimo para su internalización, de aprox 250 nm, determinado mediante TEM, y, una carga superficial de -14.2 mV frente al valor de -29.4mV de las MSN de sílice pura, determinada por potencial-( $\zeta$ ) (**Tabla 4.4**). El cumplimiento de estos factores explicaría el aumento en los porcentajes de internalización del nanosistema MSN@HA en células preosteoblásticas.

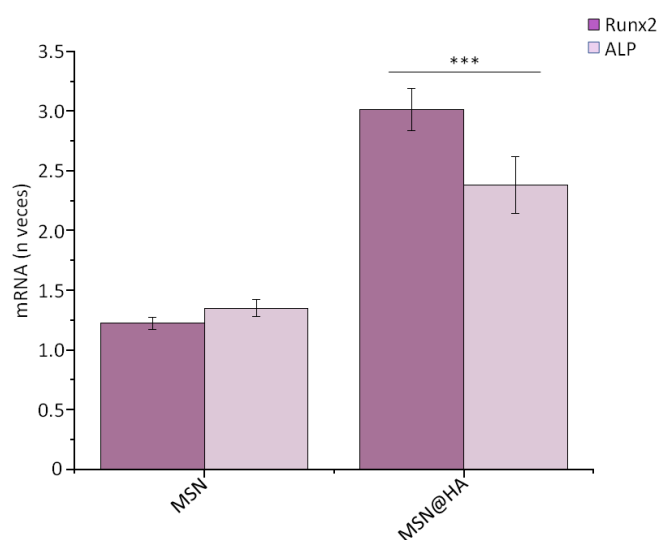


**Fig. 4.38.** Internalización (%) del material MSN@HA sobre preosteoblastos empleando las concentraciones 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de cultivo. Se representa la media  $\pm \sigma$ . (\*\*\*)  $p < 0.001$  en comparación con el grupo MSN).

El experimento se realizó por triplicado.

#### 4.3.2.3 Diferenciación osteoblástica

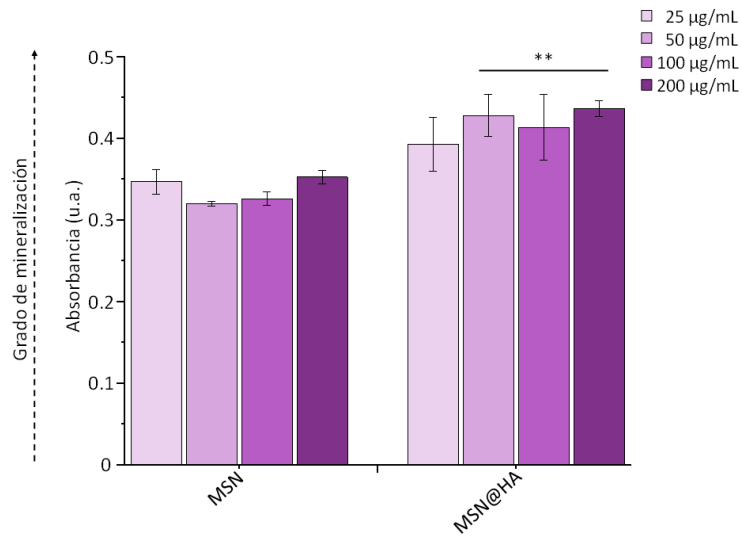
La evaluación de la capacidad del nanosistema MSN@HA para inducir la diferenciación osteoblástica se realizó a partir del estudio de la expresión relativa de los genes Runx2 y ALP, implicados en la diferenciación. Este estudio se realizó mediante PCR a tiempo real, empleando 100 µg/mL del nanosistema MSN@HA. Los resultados de la expresión génica mostraron resultados significativos ( $p < 0.001$ ), con un aumento de 2.5 veces en los valores de expresión del gen Runx2 y de 1.3 veces en los valores del gen ALP con el nanosistema MSN@HA (**Fig. 4.39**). Estos resultados muestran el inicio de la diferenciación de los preosteoblastos a osteoblastos inmaduros en presencia de HA tras 5 días en contacto, ya que el proceso de diferenciación está regulado inicialmente por Runx2, un factor de transcripción que puede utilizarse como un marcador temprano de diferenciación [216][217]. El proceso de diferenciación continua con la fase de mineralización regulada por el factor ALP, el cual se considera un marcador de diferenciación tardío [218], pero con tan solo 5 días de contacto, la diferenciación se encontraría en las primeras fases y explicaría la menor expresión del gen ALP frente a Runx2 en contacto con el nanosistema MSN@HA.



**Fig. 4.39.** Niveles de expresión génica de los genes RunX2 y ALP implicados en la diferenciación osteoblástica determinado por PCR a tiempo real tras el contacto de los preosteoblastos MC3T3-E1 con 100 µg/mL del material MSN@HA. (\*\*\*)  $p < 0.001$  en comparación con el grupo MSN).

Paralelamente, se llevó a cabo un estudio de mineralización de los preosteoblastos mediante la tinción de los depósitos de calcio en las células tratadas con el nanosistema MSN@HA a las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg/mL, tal y como se muestra en la *sección 3.6.2.2*. Los resultados, recogidos en la **Fig. 4.40**, mostraron resultados significativos ( $p < 0.01$ ), con un aumento de aprox. un 100% en la absorbancia de las muestras tratadas con las

concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que revela la presencia de depósitos de calcio en los preosteoblastos, asociados al proceso de mineralización ósea [219].



**Fig. 4.40.** Grado de mineralización de los nanosistemas MSN y MSN@HA sobre preosteoblastos empleando las concentraciones 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de cultivo. Se representa la media  $\pm \sigma$ . (\*\*  $p < 0.01$  en comparación con el grupo MSN). El experimento se realizó por triplicado.

Los ensayos celulares con el material MSN@HA, no solo han demostrado su biocompatibilidad con células preosteoblásticas, sino también que son capaces de promover su capacidad osteogénica. Por lo tanto, dichos nanosistemas son prometedores para ser utilizados como punto de partida para el futuro desarrollo de nanosistemas multifuncionales para el tratamiento de la infección ósea.



## 5. Conclusiones

Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral se pueden agrupar en tres grandes bloques.

- 1- El estudio de las MSNs como **nanosistemas dosificadores de antibióticos** ha demostrado su capacidad para vehicular antibióticos de diferente naturaleza y liberarlos de manera controlada. La determinación de las curvas de actividad biológica permitió evaluar la actividad antimicrobiana de la carga de antibiótico liberada desde las MSNs frente a biofilms de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Las MSNs cargadas con gentamicina exhibieron una cinética de liberación sostenida, la cual no fue suficiente para la completa erradicación del biofilm. Sin embargo, los perfiles cinéticos de liberación de dosis activas de levofloxacino y rifampicina caracterizados por un efecto *burst* inicial, liberación masiva de fármaco, seguido de una liberación más sostenida permitieron reducir el biofilm bacteriano en hasta un 99,9%, efecto que se prolonga en el tiempo durante 72 h. Los resultados también demuestran que estos nanosistemas son biocompatibles y eficientes a largo plazo sin la aparición de resistencias bacterianas.
- 2- El estudio de las MSNs como **nanosistemas multicomponente** capaces de albergar y liberar la combinación de un antibiótico y un agente mucolítico, desde distintos compartimentos (matriz mesoporosa y recubrimiento externo de gelatina) ha permitido desarrollar una terapia combinada con efecto sinérgico frente a biofilms de *E. coli*. La acción combinada de la N-acetilcisteína (mucolítico) y un antibiótico (levofloxacino) desde un mismo nanosistema, ha permitido conseguir una reducción del biofilm bacteriano del 99.9% tras 24 h de tratamiento.
- 3- El estudio de las MSNs como **nanosistemas multifunción** basados en la incorporación en su superficie de nanocristales de hidroxiapatita, ha demostrado un aumento en la internalización y expresión génica de los genes relacionados con la diferenciación en células preosteoblásticas, demostrando su capacidad osteoregeneradora.

Las tres estrategias propuestas en esta Tesis Doctoral han permitido desarrollar nuevos *nanoantibióticos* para el desarrollo de nanomedicinas prometedoras para el tratamiento local de la infección bacteriana ósea.



# Anexo I. Productos comerciales

**ABCR:** (3-aminopropil)triethoxisilano, APTES 99%; 3-(triethoxisilil)propilsuccínico, TESPA 94%.

**AbD Serotec:** Alamar Blue®.

**BD Biosciences:** medio Triptosa Soja, TSB; medio antibiótico Difco™ 2.

**BioMérieux:** tiras *E-test*; placas de medio Müller Hinton.

**Fluka:** Fosfato de calcio

**Invitrogen:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; Suero Fetal Bovino, FCS, TRIzol.

**Panreac:** etanol absoluto 99.5%.

**Sigma-Aldrich:** bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CTAB; hidróxido de sodio, NaOH 99%; tetraetilortosilicato, TEOS 98%; nitrato de amonio,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  99.5%; tolueno anhidro 99.8%; levofloxacino  $\geq 98.0\%$ ; sulfato de gentamicina; rifampicina  $\geq 97.0\%$ ; dimetilsulfóxido, DMSO 99.9%; gelatina; sal sódica de fluoresceína, FITC; tampón fosfato, PBS 1x; glucosa; medio triptona soja agar, TSA; yoduro de propidio; Calcofluor White Stain; azul de tiazolil tetrazolio bromuro; tripsina-EDTA; cloruro de cetilpiridinio.

**Thermo Fisher Scientific:** RNasa A; azul tripán; kit de ARN a ADNc de alta capacidad; cebadores para Runx2 y Alp; polimerasa TaqMan MGB.

## Anexo II. Técnicas de caracterización

En este anexo se describen las diferentes técnicas empleadas en esta tesis para la caracterización física, química y de las propiedades texturales de los *nanoantibióticos* sintetizados. La información presentada se ha obtenido de los manuales de instrucciones, así como de los diferentes fabricantes.

### Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X se basa en el uso de radiación electromagnética para estudiar la periodicidad estructural a escala atómica de diferentes materiales, empleando un rango de longitudes de onda entre 1-100 Å. 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. Este patrón es la representación de la intensidad de los rayos X dispersados frente al ángulo  $2\theta$ . A partir de los picos trazados se puede calcular la distancia reticular usando la ley de Bragg (Ecuación A1)

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{Sen}\theta \quad (\text{A1})$$

donde  $n$  es el orden de difracción,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $d_{hkl}$  es la distancia entre planos de la red y  $\theta$  es el ángulo de la radiación incidente.

Esta técnica es muy útil cuando se usa a bajos ángulos ( $0.2^\circ$  a  $10^\circ 2\theta$ ) para la caracterización de la estructura mesoporosa ordenada de las MSNs. Aunque la sílice que compone las nanopartículas es amorfa a escala atómica, esta técnica permite distinguir la topología de los poros y la distancia promedio poro-poro.

Además, la estructura mesoporosa característica de los materiales tipo MCM-41 en forma de panal de abeja (simetría  $p6mm$ ) se traduce en 4 reflexiones que pueden ser indexadas, asumiendo una celda unidad hexagonal como:  $10$ ,  $11$ ,  $20$  y  $21$ . La difracción de rayos X permite estudiar el grado de ordenamiento estructural mediante la medida de la relación de intensidades de las señales de difracción  $10$  y  $11$ . Según esta relación, cuanto mayor es la relación  $I_{11}/I_{10}$ , mayor es el orden de la estructura analizada. En este sentido, es posible determinar la distancia interplanar  $d_{10}$  (distancia entre los centros de dos poros contiguos en una dirección) y, consecuentemente, el valor de la celda unidad de la estructura porosa  $a_0$  mediante la ecuación (Ecuación A2):

$$a_0 = \frac{2}{\sqrt{3}} d_{10} \quad (\text{A2})$$

La técnica de XRD con bajo ángulo es una técnica habitual para verificar la estructura mesoporosa de las MSNs tras su síntesis, mediante la obtención de su patrón de difracción y calcular sus parámetros de celda correspondientes.

Mediante XRD también es posible detectar estructuras cristalinas a escala atómica empleando altos ángulos ( $5,0^\circ$  a  $80,0^\circ$   $2\theta$ ). Esto es muy útil para el estudio de compuestos como la hidroxiapatita utilizada en estudios de regeneración ósea.

### **Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El estudio de la morfología de las MSNs mediante TEM permite obtener información sobre la orientación y el tamaño de los poros, la homogeneidad de la muestra y la estabilidad de la mesoestructura en solución acuosa. Esto es posible gracias a la transmisión de un haz de electrones que se transmite a través de una delgada muestra. Parte de estos electrones son dispersados por la muestra y recogidos en una cámara CCD (charge-coupled device) encargada de formar la imagen. La cantidad de electrones dispersados establecerá el contraste de la imagen, en este sentido, en las regiones más gruesas de la muestra (como las paredes de sílice) la imagen será más oscura en comparación con las partes más delgadas.

Una de las ventajas que presenta esta técnica es la capacidad para definir los detalles de una muestra en el intervalo de 0.1 nm, lo cual permite una caracterización profunda de la superficie del material y es muy útil en estudios de estabilidad.

### **Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)**

La espectroscopía por EDS se utiliza conjuntamente con la microscopía electrónica para identificar y cuantificar los elementos presentes en el área que está siendo analizada en el microscopio. La técnica de EDS se basa en irradiar con un haz de electrones el área analizada y recoger en un espectroscopio de rayos X, la radiación devuelta por la muestra. Esta radiación está compuesta por fotones y directamente relacionada con un elemento concreto. De esta forma, midiendo la energía y el número de fotones es posible determinar, respectivamente, el elemento y la cantidad relativa de cada uno de los elementos presentes en la muestra. Esta técnica presenta la ventaja de detectar los elementos de la tabla periódica en presencia de cantidades muy pequeñas, como la presencia de HA alrededor de las MSNs.

### **Porosimetría de adsorción de N<sub>2</sub>**

Las medidas de adsorción y desorción de gases son muy útiles en la caracterización de las MSNs para determinar los principales parámetros texturales de estos nanomateriales. Cabe

destacar los parámetros como: el área superficial ( $S_{\text{BET}}$ ,  $\text{m}^2/\text{g}$ ) que representa la extensión geométrica de la superficie de las paredes de los poros por gramo de MSN; el volumen de poro ( $V_p$ ,  $\text{cm}^3/\text{g}$ ), que representa el volumen total de poros por gramo de MSN; y el diámetro de poro ( $D_p$ ). Es frecuente el uso del método Brunauer-Emmett-Teller (BET) para la obtención de la superficie específica, y el método Barret-Joyner-Halenda (BJH), para el volumen y distribución del tamaño de poro.

Esta técnica se basa en un proceso de adsorción-desorción que muestra la cantidad de gas adsorbido (por gramo de adsorbente, normalmente  $\text{N}_2$ ) 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. Este proceso queda reflejado en una isoterma donde puede observarse al inicio del proceso un aumento lineal entre  $P/P_0$  y el volumen de adsorción debido al llenado de los poros mediante la formación de multicapas de gas en el interior del cilindro. A continuación, se produce la condensación capilar dentro de los mesoporos, que se traduce como un incremento del volumen adsorbido. El valor de la presión relativa al que se produce el salto determina el tamaño de poro medio. En la última zona se vuelve a observar un aumento lineal progresivo, correspondiente a la adsorción multicapa en la superficie externa del material, produciéndose la condensación en los espacios entre partículas. Finalmente se produce el proceso de desorción, que queda representado como la vuelta de la isoterma a bajas presiones.

La caracterización mediante porosimetría de  $\text{N}_2$  permite, además del estudio de los parámetros texturales, el estudio de los procesos de funcionalización superficial y procesos de carga de fármacos. Esto es posible al comparar las áreas superficiales y el volumen de poro entre los materiales tratados y no tratados, ya que en caso de éxito los materiales tratados sufrirán una reducción en los diferentes parámetros descritos.

### **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

La espectroscopía de FTIR suele emplearse para la detección de grupos funcionales presentes en la superficie de las MSNs incluido el interior de sus poros. Se basa en irradiar la muestra con un haz infrarrojo para excitar los enlaces presentes en la muestra. De esta forma se obtiene un espectro de bandas de tensión ( $\nu$ ) y flexión ( $\delta$ ) en función de la vibración del enlace. Las vibraciones de tensión producen cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, mientras que los de flexión recogen cambios en el ángulo que forman dos enlaces. Mediante esta técnica es posible estudiar la presencia de restos de

surfactante en el interior de los poros de las MSNs tras el proceso de extracción, y permite confirmar los diferentes recubrimientos realizados sobre las MSNs.

#### **Análisis químico elemental (AQE)**

La técnica de análisis químico elemental se basa en la combustión del material analizado. El proceso se lleva a cabo en presencia de oxígeno puro, empleando una temperatura aprox. de 1000°C con el fin de convertir las moléculas orgánicas en gases simples (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, etc). A continuación, los gases se presurizan, se separan mediante una columna cromatográfica y se detectan a partir de sus diferentes conductividades térmicas. El resultado es la obtención del contenido total de carbono, hidrógeno y azufre presente en la muestra.

Esta técnica es útil para verificar la correcta extracción del surfactante del interior de los poros, así como determinar el grado de funcionalización superficial en las MSNs. Además, permite calcular la cantidad de fármaco cargado en los poros a partir de los valores de carbono obtenidos tras el proceso de carga.

#### **Dispersión dinámica de luz (DLS)**

La caracterización por DLS permite medir el tamaño y la distribución de tamaños de partículas, emulsiones o moléculas dispersas en un líquido. Tras incidir una luz láser sobre la muestra, la luz se dispersa en diferentes intensidades según el tamaño de la partícula. A continuación, los equipos de DLS estudian las fluctuaciones de intensidad para determinar, de manera automática, la velocidad del movimiento Browniano y el tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein (Ecuación A3), el cual indica que a menor tamaño de partícula mayor es la velocidad a la que se mueve.

$$D = \frac{k T}{3\pi\eta r} \quad (A3)$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\eta$  la viscosidad del líquido de la disolución.

Es una técnica muy útil para descartar la presencia de agregados de nanopartículas tras la síntesis y para estudiar cambios en los tamaños de las MSNs tras los diferentes recubrimientos.

#### **Potencial-( $\zeta$ ) zeta**

El valor de potencial-( $\zeta$ ) zeta proporciona información sobre la estabilidad de un sistema coloidal, en otras palabras, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas. En este sentido, un valor altamente positivo o negativo de potencial-( $\zeta$ ) zeta indica

la tendencia de las partículas a repelerse entre sí. En cambio, un valor bajo de potencial-( $\zeta$ ) zeta indica la tendencia de las partículas a agregarse. Las MSNs presentan valores de potencial-( $\zeta$ ) zeta alrededor de +30 y -30 mV, el cual se considera generalmente como el límite entre una suspensión estable e inestable.

Es una técnica ventajosa para estudiar la estabilidad coloidal de las MSNs tras las diferentes funcionalizaciones.

### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Los análisis mediante termogravimetría proporcionan, de manera cuantitativa, la cantidad de materia orgánica presente en la muestra. Esta técnica se basa en medir la ganancia o pérdida de peso de un material en función de la temperatura, en una atmósfera controlada de aire, helio o argón. Las medidas de los diferentes materiales de esta tesis se han realizado entre los 100 y 600 °C para descartar la pérdida de peso debido al agua, y asegurar la completa combustión de la muestra utilizando un flujo constante de aire a 100 mL/min. La caracterización por TGA permite verificar la presencia de materia orgánica en los materiales MSN@Gels y MSN@HA, así como estudiar las variaciones en peso correspondiente a materia orgánica entre los diferentes nanosistemas estudiados.

# Bibliografía

- [1] H. M. Kremers *et al.*, “Prevalence of total hip and knee replacement in the United States,” *J. Bone Jt. Surg. - Am. Vol.*, vol. 97, no. 17, pp. 1386–1397, **2014**, doi: 10.2106/JBJS.N.01141.
- [2] J. Ariza *et al.*, “Infecciones relacionadas con las prótesis articulares,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 26, no. 6, pp. 380–390, **2008**, doi: 10.1157/13123843.
- [3] S. Kurtz *et al.*, “Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030,” *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 89, no. 4, pp. 780–785, **2007**, doi: 10.2106/JBJS.F.00222.
- [4] T. N. Peel *et al.*, “Microbiological Aetiology, Epidemiology, and Clinical Profile of Prosthetic Joint Infections: Are Current Antibiotic Prophylaxis Guidelines Effective?,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 5, **2012**, doi: 10.1128/AAC.06246-11.
- [5] “WHO | High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows.” [Online]. Available: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>. [Accessed: 21-May-2020].
- [6] K. Saeed *et al.*, “2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related musculoskeletal infections,” *J. Orthop. Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 1007–1017, **2019**, doi: 10.1002/jor.24229.
- [7] E. M. Schwarz *et al.*, “2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions,” *J. Orthop. Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 997–1006, **2019**, doi: 10.1002/jor.24293.
- [8] S. Rosas *et al.*, “Season of the year influences infection rates following total hip arthroplasty,” *World J. Orthop.*, vol. 8, no. 12, pp. 895–901, **2017**, doi: 10.5312/wjo.v8.i12.895.
- [9] Y. Abu-Amer *et al.*, “Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, **2007**, doi: 10.1186/AR2170.
- [10] M. C. Birt *et al.*, “Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies,” *J. Orthop.*, vol. 14, no. 1, pp. 45–52, **2017**, doi: 10.1016/j.jor.2016.10.004.

- [11] A. J. Tande and R. Patel, "Prosthetic Joint Infection," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 302–345, **2014**, doi: 10.1128/CMR.00111-13.
- [12] Y. J. Lee *et al.*, "The imaging of osteomyelitis," *Quant. Imaging Med. Surg.*, vol. 6, no. 2, pp. 184–198, **2016**, doi: 10.21037/qims.2016.04.01.
- [13] O. A. Gafur *et al.*, "The Impact of the Current Epidemiology of Pediatric Musculoskeletal Infection on Evaluation and Treatment Guidelines," *J. Pediatr. Orthop.*, vol. 28, no. 7, pp. 777–785, **2008**, doi: 10.1097/BPO.0b013e318186eb4b.
- [14] S. L. Kaplan, "Recent lessons for the management of bone and joint infections," *J. Infect.*, vol. 68, no. SUPPL1, pp. S51–S56, **2014**, doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.014.
- [15] P. Hsieh *et al.*, "Gram-Negative Prosthetic Joint Infections: Risk Factors and Outcome of Treatment," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 7, pp. 1036–1043, **2009**, doi: 10.1086/605593.
- [16] J. Lora-Tamayo *et al.*, "A Large Multicenter Study of Methicillin–Susceptible and Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections Managed With Implant Retention," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 56, no. 2, pp. 182–194, **2013**, doi: 10.1093/cid/cis746.
- [17] T. Peel *et al.*, "Management of Prosthetic Infection According to Organism," in *Arthroplasty - Update*, InTech, **2013**. DOI: 10.5772/53244.
- [18] L. Hall-Stoodley *et al.*, "Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, **2004**, doi: 10.1038/nrmicro821.
- [19] J. W. Costerton *et al.*, "Microbial Biofilms - Annual Review of Microbiology," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 49, pp. 711–45, **1995**, doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- [20] J. Wingender *et al.*, "What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?," in *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer Berlin Heidelberg, **1999**, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1).
- [21] H. C. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 9, pp. 623–633, **2010**, doi: 10.1038/nrmicro2415.
- [22] J. J. Aguilera-correa *et al.*, "Inorganic and Polymeric Nanoparticles for Human Viral and Bacterial Infections Prevention and Treatment," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 137, pp. 1–26, **2021**. <https://doi.org/10.3390/nano11010137>.

- [23] M. Otto, "Staphylococcal Biofilms," *Microbiol. Spectr.*, vol. 6, no. 4, **2018**.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>.
- [24] C. R. Arciola *et al.*, "Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 16, no. 7, pp. 397–409, **2018**, doi: 10.1038/s41579-018-0019-y.
- [25] D. López *et al.*, "Biofilms," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 7, pp. 1–12, **2010**, doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
- [26] P. D. P. Lew and P. F. A. Waldvogel, "Osteomyelitis," in *Lancet*, vol. 364, no. 9431, pp. 369–379, **2004**, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
- [27] H. Kawamura *et al.*, "Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 10–15, **2011**, doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00821.x.
- [28] H. C. Flemming *et al.*, "Biofilms: An emergent form of bacterial life," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 9, pp. 563–575, **2016**, doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- [29] S. J. McConoughey *et al.*, "Biofilms in periprosthetic orthopedic infections," *Future Microbiol.*, vol. 9, no. 8, pp. 987–1007, **2014**, doi: 10.2217/fmb.14.64.
- [30] G. Cierny, "Surgical treatment of osteomyelitis," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 127, no. SUPPL. 1 S, pp. 190–204, **2011**, doi: 10.1097/PRS.0b013e3182025070.
- [31] J. Garrido-Gómez *et al.*, "Descriptive analysis of the economic costs of periprosthetic joint infection of the knee for the public health system of Andalusia," *J. Arthroplasty*, vol. 28, no. 7, pp. 1057–1060, **2013**, doi: 10.1016/j.arth.2013.02.012.
- [32] R. Singh *et al.*, "Side effects of antibiotics during bacterial infection: Mitochondria, the main target in host cell," *Mitochondrion*, vol. 16, pp. 50–54, **2014**, doi: 10.1016/j.mito.2013.10.005.
- [33] M. Silva *et al.*, "Results of direct exchange or debridement of the infected total knee arthroplasty," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 404, pp. 125–131, **2002**, doi: 10.1097/00003086-200211000-00022.
- [34] J. Singer *et al.*, "High rate of infection control with one-stage revision of septic knee prostheses excluding MRSA and MRSE," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 470, no. 5, pp.

1461–1471, **2012**, doi: 10.1007/s11999-011-2174-6.

- [35] S. Bengtson and K. Knutson, “the infected knee arthroplasty: A 6-year follow-up of 357 cases,” *Acta Orthop.*, vol. 62, no. 4, pp. 301–311, **1991**, doi: 10.3109/17453679108994458.
- [36] C. L. Romanò *et al.*, “Two-stage revision of septic knee prosthesis with articulating knee spacers yields better infection eradication rate than one-stage or two-stage revision with static spacers,” *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 20, no. 12, pp. 2445–2453, **2012**, doi: 10.1007/s00167-012-1885-x.
- [37] J. Cobo *et al.*, “Early prosthetic joint infection: Outcomes with debridement and implant retention followed by antibiotic therapy,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, no. 11, pp. 1632–1637, **2011**, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03333.x.
- [38] L. H. Barros *et al.*, “Early Debridement, antibiotics and implant retention (DAIR) in patients with suspected acute infection after hip or knee arthroplasty - safe, effective and without negative functional impact,” *J. Bone Jt. Infect.*, vol. 4, no. 6, pp. 300–305, **2019**, doi: 10.7150/jbji.39168.
- [39] D. R. Osmon *et al.*, “Executive Summary: Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 56, no. 1, pp. 1–10, **2013**, doi: 10.1093/CID/CIS966.
- [40] P. C. Matthews *et al.*, “Diagnosis and management of prosthetic joint infection,” *BMJ*, vol. 338, no. 7707, pp. 1378–1383, **2009**, doi: 10.1136/BMJ.B1773.
- [41] J. Esteban and J. Cordero-Ampuero, “Treatment of prosthetic osteoarticular infections,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 12, no. 6, pp. 899–912, **2011**, doi: 10.1517/14656566.2011.543676.
- [42] J. Esteban *et al.*, “Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 488–492, **2008**, doi: 10.1128/JCM.01762-07.
- [43] L. Prieto-Borja *et al.*, “Evaluation of the use of sonication of retrieved implants for the diagnosis of prosthetic joint infection in a routine setting,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 37, no. 4, pp. 715–722, **2018**, doi: 10.1007/s10096-017-3164-8.
- [44] A. Trampuz *et al.*, “Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 7, pp. 654–663, **2007**, doi:

10.1056/NEJMoa061588.

- [45] S. Tani *et al.*, "Superiority of the sonication method against conventional periprosthetic tissue cultures for diagnosis of prosthetic joint infections," *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 28, no. 1, pp. 51–57, **2018**, doi: 10.1007/s00590-017-2012-y.
- [46] Y. Achermann *et al.*, "Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 1208–1214, **2010**, doi: 10.1128/JCM.00006-10.
- [47] L. G. Harris *et al.*, "Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 33, no. 9, pp. 568–574, **2010**, doi: 10.1177/039139881003300902.
- [48] B. P. Chalmers *et al.*, "Two-Stage Revision Total Hip Arthroplasty With a Specific Articulating Antibiotic Spacer Design: Reliable Periprosthetic Joint Infection Eradication and Functional Improvement," *J. Arthroplasty*, vol. 33, no. 12, pp. 3746–3753, **2018**, doi: 10.1016/j.arth.2018.08.016.
- [49] N. Capuano *et al.*, "One-stage exchange with antibacterial hydrogel coated implants provides similar results to two-stage revision, without the coating, for the treatment of peri-prosthetic infection," *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 26, no. 11, pp. 3362–3367, **2018**, doi: 10.1007/s00167-018-4896-4.
- [50] M. Vert *et al.*, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, **2012**, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- [51] "Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology | FDA." [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>. [Accessed: 21-Oct-2021].
- [52] B. Y. S. Kim *et al.*, "Nanomedicine," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 25, pp. 2434–2443, **2010**, doi: 10.1056/NEJMra0912273.
- [53] C. Oerlemans *et al.*, "Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 12, pp. 2569–2589, **2010**, doi: 10.1007/S11095-010-0233-4.
- [54] G. Bozzuto and A. Molinari, "Liposomes as nanomedical devices," *Int. J. Nanomedicine*,

vol. 10, p. 975, **2015**, doi: 10.2147/IJN.S68861.

- [55] A. Kumari *et al.*, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, **2010**, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2009.09.001.
- [56] E. C. Dreaden *et al.*, "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2740–2779, **2012**, doi: 10.1039/C1CS15237H.
- [57] S. C. Ray *et al.*, "Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 43, pp. 18546–18551, **2009**, doi: 10.1021/JP905912N.
- [58] M. Manzano and M. Vallet-Regí, "Mesoporous silica nanoparticles in nanomedicine applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 1–14, **2018**, doi: 10.1007/S10856-018-6069-X.
- [59] M. Colilla and M. Vallet-Regí, "Targeted stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for bacterial infection treatment," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, pp. 1–32, **2020**, doi: 10.3390/ijms21228605.
- [60] M. Vallet-Regí *et al.*, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights," *Molecules*, vol. 23, no. 1, p. 47, **2017**, doi: 10.3390/molecules23010047.
- [61] A. Baeza *et al.*, "Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for antitumor therapy: Our contribution," *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 5, pp. 803–813, **2016**, doi: 10.1039/c6bm00039h.
- [62] M. Vallet-Regí *et al.*, "Nanomaterials as Promising Alternative in the Infection Treatment," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 15, p. 3806, **2019**, doi: 10.3390/IJMS20153806.
- [63] M. Mazaheri *et al.*, "Nanomedicine applications in orthopedic medicine: State of the art," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 6039–6054, **2015**, doi: 10.2147/IJN.S73737.
- [64] M. Vallet-Regí *et al.*, "Biomaterials against Bone Infection," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 13, p. 2000310, **2020**, doi: 10.1002/adhm.202000310.
- [65] M. Colilla *et al.*, "Synthesis and characterization of zwitterionic SBA-15 nanostructured materials," *Chem. Mater.*, vol. 22, no. 23, pp. 6459–6466, **2010**, doi: 10.1021/cm102827y.
- [66] M. Colilla *et al.*, "The Role of Zwitterionic Materials in the Fight against Proteins and

- Bacteria," *Medicines*, vol. 5, no. 4, p. 125, **2018**, doi: 10.3390/medicines5040125.
- [67] I. Izquierdo-Barba *et al.*, "Inhibition of bacterial adhesion on biocompatible zwitterionic SBA-15 mesoporous materials," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2977–2985, **2011**, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.005.
- [68] M. Colilla *et al.*, "A novel zwitterionic bioceramic with dual antibacterial capability," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 34, pp. 5639–5651, **2014**, doi: 10.1039/c4tb00690a.
- [69] M. Rai *et al.*, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, **2009**, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [70] K. Gold *et al.*, "Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles," *Adv. Ther.*, vol. 1, no. 3, p. 1700033, **2018**, doi: 10.1002/ADTP.201700033.
- [71] A. Raghunath and E. Perumal, "Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 49, no. 2, pp. 137–152, **2017**, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2016.11.011.
- [72] M. Vallet-Regí, "Our contributions to applications of mesoporous silica nanoparticles," *Acta Biomater.*, vol. 137, pp. 44-52, **2021**, doi: 10.1016/j.actbio.2021.10.011.
- [73] M. Colilla, "Silica-based Ceramics: Mesoporous Silica," in *Bioceramics with Clinical Applications*, Ed. John Wiley & Sons, Ltd, **2014**.
- [74] R. J. Argauer, "Crystalline zeolite zsm-5 and method of preparing the same," vol. 993, no. 630, p. 472, **1969** (Patent).
- [75] M. E. Davis *et al.*, "VPI-5: The first molecular sieve with pores larger than 10 Ångstroms," *Zeolites*, vol. 8, no. 5, pp. 362–366, **1988**, doi: 10.1016/S0144-2449(88)80172-6.
- [76] T. Yanagisawa *et al.*, "The preparation of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 63, no. 4, pp. 988–992, **1990**, doi: 10.1246/bcsj.63.988.
- [77] S. Inagaki *et al.*, "Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 0, no. 8, pp. 680–682, **1993**, doi: 10.1039/C39930000680.
- [78] C. T. Kresge *et al.*, "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," *Nature*, vol. 359, no. 6397, pp. 710–712, **1992**, doi:

10.1038/359710a0.

- [79] J. S. Beck *et al.*, "A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 27, pp. 10834–10843, **1992**, doi: 10.1021/JA00053A020.
- [80] J. C. Vartuli *et al.*, "Synthesis of Mesoporous Materials: Liquid-Crystal Templating versus Intercalation of Layered Silicates," *Chem. Mater.*, vol. 6, no. 11, pp. 2070–2077, **2002**, doi: 10.1021/CM00047A029.
- [81] J. S. Beck and N. S. Princeton, "Method for synthesizing mesoporous crystalline material," **1990** (Patent).
- [82] F. Hoffmann *et al.*, "Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 45, no. 20, pp. 3216–3251, **2006**, doi: 10.1002/anie.200503075.
- [83] M. Gisbert-Garzarán and M. Vallet-Regí, "Influence of the Surface Functionalization on the Fate and Performance of Mesoporous Silica Nanoparticles," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5, p. 916, **2020**, doi: 10.3390/nano10050916.
- [84] W. Stöber *et al.*, "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 62–69, **1968**, doi: 10.1016/0021-9797(68)90272-5.
- [85] M. Grün *et al.*, "The synthesis of micrometer- and submicrometer-size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41," *Adv. Mater.*, vol. 9, no. 3, pp. 254–257, **1997**, doi: 10.1002/adma.19970090317.
- [86] S. H. Wu and H. P. Lin, "Synthesis of mesoporous silica nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 9, pp. 3862–3875, **2013**, doi: 10.1039/c3cs35405a.
- [87] N. Knežević and J. O. Durand, "Large pore mesoporous silica nanomaterials for application in delivery of biomolecules," *Nanoscale*, vol. 7, no. 6, pp. 2199–2209, **2015**, doi: 10.1039/c4nr06114d.
- [88] Montserrat Colilla *et al.*, "Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices," *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 114–134, **2013**, doi: 10.1039/C2BM00085G.
- [89] F. Tang *et al.*, "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug

- Delivery,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, **2012**, doi: 10.1002/ADMA.201104763.
- [90] T. Asefa and Z. Tao, “Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 11, pp. 2265–2284, **2012**, doi: 10.1021/TX300166U.
- [91] J. Lu *et al.*, “Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals,” *Small*, vol. 6, no. 16, pp. 1794–1805, **2010**, doi: 10.1002/SMLL.201000538.
- [92] R. M. Sábio *et al.*, “Exploiting mesoporous silica nanoparticles as versatile drug carriers for several routes of administration,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 312, **2021**, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110774.
- [93] R. García-Álvarez and M. Vallet-Regí, “Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, p. 888, **2021**, doi: 10.3390/NANO11040888.
- [94] J. L. Paris *et al.*, “From proof-of-concept material to PEGylated and modularly targeted ultrasound-responsive mesoporous silica nanoparticles,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, no. 18, pp. 2785–2794, **2018**, doi: 10.1039/c8tb00444g.
- [95] R. Gref *et al.*, “‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 301–313, **2000**, doi: 10.1016/S0927-7765(99)00156-3.
- [96] B. Pelaz *et al.*, “Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 6996–7008, **2015**, doi: 10.1021/ACSNANO.5B01326.
- [97] Q. He *et al.*, “In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation,” *Small*, vol. 7, no. 2, pp. 271–280, **2011**, doi: 10.1002/SMLL.201001459.
- [98] R. García-Álvarez *et al.*, “In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 3, pp. 1256–1264, **2018**, doi: 10.1039/C7NR08322J.
- [99] H. H. Gustafson *et al.*, “Nanoparticle uptake: The phagocyte problem,” *Nano Today*, vol.

10, no. 4, pp. 487–510, **2015**, doi: 10.1016/J.NANTOD.2015.06.006.

- [100] R. R. Arvizo *et al.*, “Modulating Pharmacokinetics, Tumor Uptake and Biodistribution by Engineered Nanoparticles,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e24374, **2011**, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0024374.
- [101] M. Lindén, “Biodistribution and Excretion of Intravenously Injected Mesoporous Silica Nanoparticles: Implications for Drug Delivery Efficiency and Safety,” *Enzymes*, vol. 43, pp. 155–180, **2018**, doi: 10.1016/BS.ENZ.2018.07.007.
- [102] J. L. Paris *et al.*, “Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review,” *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 15, pp. 8761–8771, **2017**, doi: 10.1007/s10853-017-0787-1.
- [103] Gisbert-Garzarán *et al.*, “Mesoporous Silica Nanoparticles for the Treatment of Complex Bone Diseases: Bone Cancer, Bone Infection and Osteoporosis,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 1, p. 83, **2020**, doi: 10.3390/pharmaceutics12010083.
- [104] M. Yu and J. Zheng, “Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 6655–6674, **2015**, doi: 10.1021/ACSNANO.5B01320/SUPPL\_FILE/NN5B01320\_SI\_001.PDF.
- [105] X. Huang *et al.*, “The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 7, pp. 5390–5399, **2011**, doi: 10.1021/NN200365A/SUPPL\_FILE/NN200365A\_SI\_001.PDF.
- [106] M. Martínez-Carmona *et al.*, “Mesoporous silica materials as drug delivery: ‘the nightmare’ of bacterial infection,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, pp. 1–29, **2018**, doi: 10.3390/pharmaceutics10040279.
- [107] M. Martínez-Carmona *et al.*, “Concanavalin A-targeted mesoporous silica nanoparticles for infection treatment,” *Acta Biomater.*, vol. 96, pp. 547–556, **2019**, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.001.
- [108] Q. Yu *et al.*, “Supramolecular Assemblies of Heterogeneous Mesoporous Silica Nanoparticles to Co-deliver Antimicrobial Peptides and Antibiotics for Synergistic Eradication of Pathogenic Biofilms,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 5, pp. 5926–5937, **2020**, doi: 10.1021/ACSNANO.0C01336.
- [109] A. Baeza *et al.*, “Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 2, pp. 319–337, **2015**,

doi: 10.1517/17425247.2014.953051.

- [110] D. Jin *et al.*, "Controlled drug delivery from mesoporous silica using a pH-response release system," *New J. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1616–1620, **2012**, doi: 10.1039/C2NJ20976D.
- [111] J. L. Paris *et al.*, "Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers," *ACS Nano*, vol. 9, no. 11, pp. 11023–11033, **2015**, doi: 10.1021/acsnano.5b04378.
- [112] M. Martínez-Carmona *et al.*, "A novel visible light responsive nanosystem for cancer treatment," *Nanoscale*, vol. 9, no. 41, pp. 15967–15973, **2017**, doi: 10.1039/C7NR05050J.
- [113] J.-W. Xu *et al.*, "Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: an overview," *Nanoscale*, vol. 11, no. 18, pp. 8680–8691, **2019**, doi: 10.1039/C9NR01833F.
- [114] F. M. Martín-Saavedra *et al.*, "Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 12, pp. 4522–4531, **2010**, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2010.06.030.
- [115] S. Palantavida *et al.*, "Ultrabright NIR fluorescent mesoporous silica nanoparticles," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 20, pp. 3107–3114, **2014**, doi: 10.1039/C4TB00287C.
- [116] A. Nieto *et al.*, "Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 116, no. 1–3, pp. 4–13, **2008**, doi: 10.1016/j.micromeso.2008.03.025.
- [117] M. Vallet-Regí *et al.*, "A new property of MCM-41: Drug delivery system," *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 2, pp. 308–311, **2001**, doi: 10.1021/cm0011559.
- [118] M. Vallet-Regí *et al.*, "Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery," *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 370, no. 1963, pp. 1400–1421, **2012**, doi: 10.1098/rsta.2011.0258.
- [119] M. Manzano *et al.*, "Drug delivery from ordered mesoporous matrices," *Expert Op. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 12, pp. 1383–1400, **2009**, doi: 10.1517/17425240903304024.
- [120] S. B. Hartono *et al.*, "Functionalized large pore mesoporous silica nanoparticles for gene delivery featuring controlled release and co-delivery," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 6, pp. 718–726, **2014**, doi: 10.1039/C3TB21015D.

- [121] B. G. Cha *et al.*, “Extra-Large Pore Mesoporous Silica Nanoparticles Enabling Co-Delivery of High Amounts of Protein Antigen and Toll-like Receptor 9 Agonist for Enhanced Cancer Vaccine Efficacy,” *ACS Cent. Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 484–492, **2018**, doi: 10.1021/ACSCENTSCI.8B00035.
- [122] M. Manzano and M. Vallet-Regí, “Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 2, pp. 3–5, **2020**, doi: 10.1002/adfm.201902634.
- [123] A. Bernardos *et al.*, “Mesoporous Silica-Based Materials with Bactericidal Properties,” *Small*, vol. 15, no. 24, p. 1900669, **2019**, doi: 10.1002/smll.201900669.
- [124] W. Gao *et al.*, “Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 127, pp. 46–57, **2018**, doi: 10.1016/j.addr.2017.09.015.
- [125] A. J. Huh and Y. J. Kwon, “‘Nanoantibiotics’: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era,” *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 128–145, **2011**, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002.
- [126] A. Bassegoda *et al.*, “Strategies to prevent the occurrence of resistance against antibiotics by using advanced materials,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 5, pp. 2075–2089, **2018**, doi: 10.1007/s00253-018-8776-0.
- [127] D. Molina-Manso *et al.*, “Usefulness of SBA-15 mesoporous ceramics as a delivery system for vancomycin, rifampicin and linezolid: A preliminary report,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 40, no. 3, pp. 252–256, **2012**, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.013.
- [128] A. Aguilar-Colomer *et al.*, “Antibacterial effect of antibiotic-loaded SBA-15 on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 70, no. 3, pp. 259–263, **2017**, doi: 10.1038/ja.2016.154.
- [129] J. J. Aguilera-Correa *et al.*, “Arabic gum plus colistin coated moxifloxacin-loaded nanoparticles for the treatment of bone infection caused by *Escherichia coli*,” *Acta Biomater.*, vol. 137, **2021**, doi: 10.1016/j.actbio.2021.10.014.
- [130] María Vallet-Regí *et al.*, “Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications,” *J. Mater. Chem.*, vol. 16, no. 1, pp. 26–31, **2006**, doi: 10.1039/B509744D.
- [131] J. G. Macías *et al.*, “Introducción: Fisiopatología del remodelado óseo,” in *Formadores de hueso*, pp. 13–25, **2015**.

- [132] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants," *J. Mater. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 94–117, **1998**, doi: 10.1557/JMR.1998.0015.
- [133] V. P. Orlovskii *et al.*, "Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics," *Inorg. Mater.* vol. 38, no. 10, pp. 973–984, **2002**, doi: 10.1023/A:1020585800572.
- [134] M. M. Pereira and L. L. Hench, "Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates," *J. Sol-Gel Sci. Technol.* vol. 7, no. 1, pp. 59–68, **1996**, doi: 10.1007/BF00401884.
- [135] I. Izquierdo-Barba *et al.*, "Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials," *Solid State Sci.*, vol. 7, no. 8, pp. 983–989, **2005**, doi: 10.1016/J.SOLIDSTATESCIENCES.2005.04.003.
- [136] P. Li *et al.*, "Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 75, no. 8, pp. 2094–2097, **1992**, doi: 10.1111/J.1151-2916.1992.TB04470.X.
- [137] K. Nakanishi and N. Soga, "Phase Separation in Gelling Silica–Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly(sodium styrenesulfonate)," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 10, pp. 2518–2530, **1991**, doi: 10.1111/J.1151-2916.1991.TB06794.X.
- [138] P. Horcajada *et al.*, "Bioactivity in ordered mesoporous materials," *Solid State Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 1295–1300, **2004**, doi: 10.1016/J.SOLIDSTATESCIENCES.2004.07.026.
- [139] S. D. Puckett *et al.*, "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment," *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 706–713, **2010**, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.081.
- [140] D. Pedraza *et al.*, "Amine-functionalized mesoporous silica nanoparticles: A new nanoantibiotic for bone infection treatment," *Biomed. Glas.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–12, **2018**, doi: 10.1515/bglass-2018-0001.
- [141] M. Vallet-Regí *et al.*, "Mesoporous materials for drug delivery," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, **2007**, doi: 10.1002/anie.200604488.
- [142] F. de Juan and E. Ruiz-Hitzky, "Selective Functionalization of Mesoporous Silica," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 6, pp. 430–432, **2000**, doi: 10.1002/(SICI)1521-4095(200003)12:6<430::AID-ADMA430>3.0.CO;2-3.

- [143] L. T. Zhuravlev, "Concentration of Hydroxyl Groups on the Surface of Amorphous Silicas," *Langmuir*, vol. 3, no. 3, pp. 316–318, **1987**, doi: 10.1021/la00075a004.
- [144] M. Cicuéndez *et al.*, "Biocompatibility and levofloxacin delivery of mesoporous materials," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 84, no. 1, pp. 115–124, **2013**, doi: 10.1016/j.ejpb.2012.11.029.
- [145] M. Martínez-Carmona *et al.*, "Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 56, pp. 50923–50932, **2016**, doi: 10.1039/c6ra07763c.
- [146] R. García-Alvarez *et al.*, "3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm," *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 113–126, **2017**, doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.028.
- [147] M. Xie *et al.*, "A multifunctional mesoporous silica nanocomposite for targeted delivery, controlled release of doxorubicin and bioimaging," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 110, pp. 138–147, **2013**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.009.
- [148] C. X. Zhao *et al.*, "Magnetic mesoporous silica nanoparticles end-capped with hydroxyapatite for pH-responsive drug release," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 37, pp. 4828–4833, **2013**, doi: 10.1039/c3tb20641f.
- [149] S. Brunauer *et al.*, "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2, pp. 309–319, **1938**, doi: 10.1021/ja01269a023.
- [150] S. Lowell *et al.*, "Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size and density," in *Particle Technology Series*, **2012**.
- [151] A. M. Clemments *et al.*, "Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 55, pp. 29134–29138, **2014**, doi: 10.1039/c4ra03277b.
- [152] V. Nairi *et al.*, "Interactions between bovine serum albumin and mesoporous silica nanoparticles functionalized with biopolymers," *Chem. Eng. J.*, vol. 340, pp. 42–50, **2018**, doi: 10.1016/j.cej.2018.01.011.
- [153] Z. Chen *et al.*, "Biomimetic inspired surface engineering of nanocarriers for pH-responsive, targeted drug delivery," *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 1364–1371, **2013**, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.060.

- [154] A. L. Doadrio *et al.*, "Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 97, no. 1, pp. 125–132, **2004**, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.03.005.
- [155] J. J. Aguilera-Correa *et al.*, "Antibiotic release from F-doped nanotubular oxide layer on Ti6Al4V alloy to decrease bacterial viability," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 8, **2018**, doi: 10.1007/s10856-018-6119-4.
- [156] S. Stepanović *et al.*, "Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci," *APMIS*, vol. 115, no. 8, pp. 891–899, **2007**, doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x.
- [157] J. R. Postgate, "Chapter XVIII Viable counts and Viability," *Methods Microbiol.*, vol. 1, no. C, pp. 611–628, **1969**, doi: 10.1016/S0580-9517(08)70149-1.
- [158] O. Zusman *et al.*, "Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 2, pp. 29–39, **2017**, doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw377>.
- [159] A. Aguilar-Colomer *et al.*, "Impact of the antibiotic-cargo from MSNs on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 311, p. 110681, **2021**, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110681.
- [160] M. V. Cabañas *et al.*, "Features of aminopropyl modified mesoporous silica nanoparticles. Implications on the active targeting capability," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 220, pp. 260–269, **2018**, doi: 10.1016/j.matchemphys.2018.09.005.
- [161] R. R. Castillo *et al.*, "Building Block Based Construction of Membrane-Organelle Double Targeted Nanosystem for Two-Drug Delivery," *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, no. 11, pp. 3677–3685, **2018**, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00603.
- [162] L. M. Lopez-Sánchez *et al.*, "CoCl<sub>2</sub>, a Mimic of Hypoxia, Induces Formation of Polyploid Giant Cells with Stem Characteristics in Colon Cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e99143, **2014**, doi: 10.1371/journal.pone.0099143.
- [163] M. Martínez-Carmona *et al.*, "Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment," *Acta Biomater.*, vol. 65, pp. 393–404, **2018**, doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.007.
- [164] D. Lozano *et al.*, "Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and

- differentiation," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 797–803, **2010**, doi: 10.1016/j.actbio.2009.08.033.
- [165] P. Mora-Raimundo *et al.*, "Nanoparticles to Knockdown Osteoporosis-Related Gene and Promote Osteogenic Marker Expression for Osteoporosis Treatment," *ACS Nano*, **2019**, doi: 10.1021/acsnano.9b00241.
- [166] B. González *et al.*, "Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment," *Acta Biomater.*, vol. 68, pp. 261–271, **2018**, doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.041.
- [167] A. Beganskiene *et al.*, "FTIR, TEM and NMR Investigations of Stöber Silica Nanoparticles," *Mater. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 287–290, **2004**.
- [168] J. A. Roberts and J. Lipman, "Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient," *Crit. Care Med.*, vol. 37, no. 3, pp. 840–851, **2009**, doi: 10.1097/CCM.0b013e3181961bff.
- [169] M. P. Monopoli *et al.*, "Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 8, pp. 2525–2534, **2011**, doi: 10.1021/ja107583h.
- [170] Y. Qiu *et al.*, "Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods," *Biomaterials*, vol. 31, no. 30, pp. 7606–7619, **2010**, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.051.
- [171] A. Kurtz-Chalot *et al.*, "Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 16–24, **2017**, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.028.
- [172] Q. He *et al.*, "The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1085–1092, **2010**, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.046.
- [173] N. Encinas *et al.*, "Mixed-charge pseudo-zwitterionic mesoporous silica nanoparticles with low-fouling and reduced cell uptake properties," *Acta Biomater.*, vol. 84, pp. 317–327, **2019**, doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.012.
- [174] F. Balas *et al.*, "L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 3, pp. 514–522, **2008**, doi: 10.1016/j.actbio.2007.11.009.

- [175] B. Singh *et al.*, "Rapid color test identification system for screening of counterfeit fluoroquinolones," *Eur. J. Adv. Chem. Res.*, vol. 6, pp. 377–384, **2009**, <https://doi.org/10.1155/2009/870286>.
- [176] W. Lesniak *et al.*, "An isocratic separation of underivatized gentamicin components, <sup>1</sup>H NMR assignment and protonation pattern," *Carbohydr. Res.*, vol. 338, no. 24, pp. 2853–2862, **2003**, doi: 10.1016/j.carres.2003.08.005.
- [177] G. Gallo and P. Radaelli, "Analytical Profiles of Drug Substances: K. Florey," *Acad. Press*, vol. 5, pp. 467–513, **1972**.
- [178] M. F. Khan *et al.*, "Theoretically Guided Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Rifampicin in a Mixture of Isoniazid and Pyrazinamide by UV Spectrophotometer," *Front. Chem.*, vol. 5, p. 27, **2017**, doi: 10.3389/fchem.2017.00027.
- [179] H. Ç. Arca *et al.*, "Rifampin Stability and Solution Concentration Enhancement Through Amorphous Solid Dispersion in Cellulose ω-Carboxyalkanoate Matrices," *J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. 1, pp. 127–138, **2018**, doi: 10.1016/j.xphs.2017.05.036.
- [180] S. Q. Henwood *et al.*, "Solubility and dissolution properties of generic rifampicin raw materials," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 26, no. 4, pp. 403–408, **2000**, doi: 10.1081/DDC-100101246.
- [181] H. Van De Belt *et al.*, "Staphylococcus aureus biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements," *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1607–1611, **2001**, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00313-6.
- [182] F.-J. Schmitz *et al.*, "Development of Resistance to Ciprofloxacin, Rifampin, and Mupirocin in Methicillin-Susceptible and-Resistant Staphylococcus aureus Isolates," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 11, **2000**, <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.3229-3231.2000>.
- [183] L. Wang *et al.*, "Cytotoxic effects of the quinolone levofloxacin on rabbit meniscus cells," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 34, no. 8, pp. 870–877, **2014**, doi: 10.1002/jat.2903.
- [184] N. Duewelhenke *et al.*, "Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 1, pp. 54–63, **2007**, doi: 10.1128/AAC.00729-05.
- [185] S. Isefuku *et al.*, "Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells," *J. Orthop.*

- Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 950–954, **2001**, doi: 10.1016/S0736-0266(01)00022-5.
- [186] S. Isefuku *et al.*, “Gentamicin May Have an Adverse Effect on Osteogenesis,” *J. Orthop. Trauma*, vol. 17, no. 3, pp. 212–216, **2003**.
- [187] C. Tengroth *et al.*, “Cross-Linking of Gelatin Capsules with Formaldehyde and Other Aldehydes: An FTIR Spectroscopy Study,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 10, no. 3, pp. 405–412, **2005**, doi: 10.1081/pdt-200065693.
- [188] M. Yamamoto *et al.*, “Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 12, no. 1, pp. 77–88, **2001**, doi: 10.1163/156856201744461.
- [189] Y. Tabata and Y. Ikada, “Protein release from gelatin matrices,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 287–301, **1998**, doi: 10.1016/S0169-409X(97)00125-7.
- [190] M. Ozeki *et al.*, “Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation,” *J. Drug Target.*, vol. 9, no. 6, pp. 461–471, **2001**, doi: 10.3109/10611860108998780.
- [191] R. W. Korsmeyer *et al.*, “Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–35, **1983**, doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.
- [192] D. Caccavo, “An overview on the mathematical modeling of hydrogels’ behavior for drug delivery systems,” *Int. J. Pharm.*, vol. 560, pp. 175–190, **2019**, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.076.
- [193] M. Vigata *et al.*, “Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 12, pp. 1–45, **2020**, doi: 10.3390/pharmaceutics12121188.
- [194] N. A. Peppas, “Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers,” *Pharm. Acta Helv.*, vol. 60, no. 4, pp. 110–111, **1985**.
- [195] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs,” *J. Control. Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, **1987**, doi: 10.1016/0168-3659(87)90034-4.
- [196] I. Izquierdo-Barba *et al.*, “Nanocolumnar coatings with selective behavior towards

- osteoblast and *Staphylococcus aureus* proliferation,” *Acta Biomater.*, vol. 15, pp. 20–28, **2015**, doi: 10.1016/j.actbio.2014.12.023.
- [197] S. Dinicola *et al.*, “N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 18, pp. 2942–2948, **2014**.
- [198] M. Foox and M. Zilberman, “Drug delivery from gelatin-based systems,” *Expert Op. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 9, pp. 1547–1563, **2015**, doi: 10.1517/17425247.2015.1037272.
- [199] S. Y. Ooi *et al.*, “Cellulose nanocrystals extracted from rice husks as a reinforcing material in gelatin hydrogels for use in controlled drug delivery systems,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 93, pp. 227–234, **2016**, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.082.
- [200] P. S. Stewart, “Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 5, pp. 1052–1058, **1994**, doi: 10.1128/AAC.38.5.1052.
- [201] M.-C. Muñoz-Egea *et al.*, “Effect of Antibiotics and Antibiofilm Agents in the Ultrastructure and Development of Biofilms Developed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria,” *Microb. Drug Resist.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–6, **2016**, doi: 10.1089/mdr.2015.0124.
- [202] C.-H. Lin *et al.*, “Antioxidant N -Acetylcysteine and Glutathione Increase the Viability and Proliferation of MG63 Cells Encapsulated in the Gelatin Methacrylate/VA-086/Blue Light Hydrogel System,” *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 22, no. 8, pp. 792–800, **2016**, doi: 10.1089/ten.tec.2016.0025.
- [203] H. Zhang *et al.*, “Antibacterial activity and biocompatibility of nanoporous titanium doped with silver nanoparticles and coated with n-acetyl cysteine,” *J. Hard Tissue Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 351–358, **2018**, doi: 10.2485/jhtb.27.351.
- [204] M. Vallet-Regí and J. M. González-Calbet, “Calcium phosphates as substitution of bone tissues,” *Prog. Solid State Chem.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–31, **2004**, doi: 10.1016/J.PROGSOLIDSTCHEM.2004.07.001.
- [205] H. B. Pan and B. W. Darvell, “Calcium phosphate solubility: The need for re-evaluation,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, no. 2, pp. 639–645, **2009**, doi: 10.1021/cg801118v.
- [206] M. Sousa De Almeida *et al.*, “Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 50, no. 9, pp. 5397–5434, **2021**, doi: 10.1039/d0cs01127d.

- [207] G. Sahay *et al.*, "Endocytosis of nanomedicines," *J. Control. Release*, vol. 145, no. 3, pp. 182–195, **2010**, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036.
- [208] H. P. Rim *et al.*, "PH-tunable calcium phosphate covered mesoporous silica nanocontainers for intracellular controlled release of guest drugs," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 38, pp. 8853–8857, **2011**, doi: 10.1002/anie.201101536.
- [209] R. Z. LeGeros, "Calcium phosphate-based osteoinductive materials," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, **2008**, doi: 10.1021/cr800427g.
- [210] H. Zhang *et al.*, "Cellular internalization of rod-like nano hydroxyapatite particles and their size and dose-dependent effects on pre-osteoblasts," *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 6, pp. 1205–1217, **2017**, doi: 10.1039/C6TB01401A.
- [211] S. Salatin *et al.*, "Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles," *Cell Biol. Int.*, vol. 39, no. 8, pp. 881–890, **2015**, doi: 10.1002/CBIN.10459.
- [212] L. Shang *et al.*, "Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters," *J. Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, **2014**, doi: 10.1186/1477-3155-12-5.
- [213] Y. Zhao *et al.*, "Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects," *ACS Nano*, vol. 5, no. 2, pp. 1366–1375, **2011**, doi: 10.1021/NN103077K.
- [214] T. H. Chung *et al.*, "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*, vol. 28, no. 19, pp. 2959–2966, **2007**, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.03.006.
- [215] I. Slowing *et al.*, "Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 46, pp. 14792–14793, **2006**, doi: 10.1021/JA0645943.
- [216] T. Komori, "Regulation of osteoblast differentiation by runx2," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 658, pp. 43–49, **2010**, doi: 10.1007/978-1-4419-1050-9\_5.
- [217] P. Bialek *et al.*, "A twist code determines the onset of osteoblast differentiation," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 423–435, **2004**, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00058-9.
- [218] E. E. Golub and K. Boesze-Battaglia, "The role of alkaline phosphatase in

mineralization," *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, no. 5, pp. 444–448, **2007**, doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851.

- [219] D. Ruffoni *et al.*, "The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process," *Bone*, vol. 40, no. 5, pp. 1308–1319, **2007**, doi: 10.1016/j.bone.2007.01.012.









La presente Tesis Doctoral se centra en el diseño, la ingeniería y la evaluación microbiológica de "nanoantibióticos" avanzados para el tratamiento personalizado de las infecciones óseas. Las altas tasas de fracaso de las terapias actuales basadas en antibióticos se deben principalmente a la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos, la formación de biopelículas bacterianas y la pérdida ósea asociada a la infección. El desafío es desarrollar tratamientos nuevos y más efectivos para enfrentar estos problemas. En este escenario, la nanotecnología ofrece alternativas prometedoras mediante el uso de nanoportadores para la entrega de antimicrobianos. Entre ellos, las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN), gracias a sus características únicas, están ganando un creciente interés científico. Con este objetivo, hemos desarrollado tres enfoques principales basados en MSNs: 1) Evaluar el impacto de la carga de antibióticos de las MSN en el biofilm bacteriano gramnegativo y grampositivo; 2) Entrega conjunta de agentes mucolíticos y antibióticos para terapia combinada hacia la erradicación sinérgica de biopelículas bacterianas; 3) Proporcionar nanosistemas basados en MSN con capacidad de regeneración ósea.

