



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en ciencias (Nanotecnología)

## Partículas de sílice nanoporosa biomiméticas: Efectos de la superficie en la formación de la biocorona

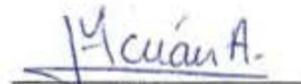
Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Nanotecnología

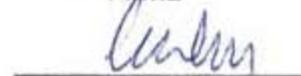
**Presenta:**  
Gerardo Paredes González

**Dirigido por:**  
Director interno: Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández  
Director externo: Dra. Luz María López Marín

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández  
Presidente

  
Firma

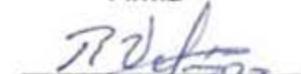
Dra. Luz María López Marín  
Secretario

  
Firma

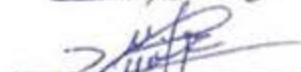
Dr. Rufino Nava Mendoza  
Vocal

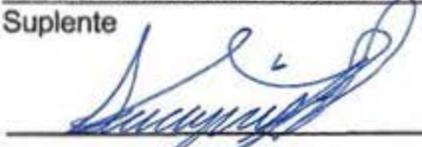
  
Firma

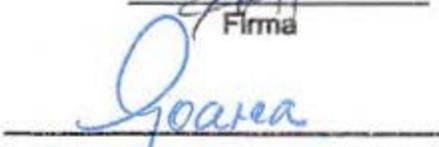
Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo  
Suplente

  
Firma

Dr. Carlos Martín Cortés Romero  
Suplente

  
Firma

  
Dr. Aurelio Domínguez González  
Director de la Facultad de Ingeniería

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro. México  
Septiembre de 2016

## RESUMEN

El suministro de medicamentos en el organismo resulta ser sub óptimo debido a que muchas veces no es liberado en el lugar correcto, además de dañar algunos otros órganos durante su trayectoria. En este sentido, el diseño de agentes acarreadores de medicamentos resulta ser una alternativa para la liberación del fármaco en lugares específicos. En particular, el diseño de acarreadores a través de la Nanotecnología resulta prometedor, ya que las tallas de partículas en escalas nanométricas son compatibles con las estructuras celulares. Sin embargo, muchas veces estos acarreadores antes de llegar al lugar de atención pueden ser destruidos por el sistema inmune, siendo ineficaz el tratamiento. A este respecto, uno de los eventos que más influyen sobre el reconocimiento de nanopartículas en el organismo es la formación de una capa de proteínas provenientes de fluidos biológicos, también llamada biocorona. En este trabajo se propone la síntesis de nanopartículas de sílice funcionalizadas con bicapas de lípidos que confieran características superficiales específicas, y la caracterización, así como el modelamiento molecular de la interacción de un modelo representativo de la SBA-15 con algunos fragmentos representativos del plasma sanguíneo, con el fin de establecer algunos aspectos fundamentales de la afinidad de la sílice con moléculas cargadas y neutras.

**(Palabras clave:** Nanotecnología, SBA-15, Biocorona, Lípido)

## ABSTRACT

The supply of drugs in the body turns out to be suboptimal because many times it is not released in the right place, and damages some other organs during his career. In this sense, the design of drug carriers proves to be an alternative to drug release at specific locations. In particular, the design of carriers through nanotechnology is promising, since the sizes of particles in nanoscale are compatible with cell structures. However, many times these carriers are destroyed by the immune system before reaching their target. In this regard, one of the events influencing the recognition of nanoparticles in the organism is the formation of a layer of proteins from biological fluids, also known as biocorona. In this paper, silica nanoparticles were synthesized and functionalized with lipid bilayers to confer specific surface features, the characterization of biocorona is addressed and a molecular modeling of a representative SBA-15 framework and its interaction with some representative molecular fragments of blood plasma were proposed, in order to get fundamental knowledge of the silica affinity with charged and not charged molecules.

**(Key words:** Nanotechnology, SBA-15, Biocorona, Lipid)

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco por el apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de CVU: 631144, que significó un apoyo sumamente importante en mi estancia en mi posgrado.

Este proyecto fue realizado en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro y en el Centro de Física aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, Campus Juriquilla, bajo la dirección de las Dras. María de los Ángeles Cuán Hernández y Luz María López Marín.

El trabajo fue financiado parcialmente por el CONACYT, a través del proyecto PDCPN-2013-1/214076.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza, Coordinador del Programa de Maestría en ciencias (Nanotecnología), por su compromiso para supervisar mi formación y su guía durante el desarrollo de mi trabajo.

A mi directora, codirectora.

A los demás integrantes del jurado de tesis el Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo y el Dr. Carlos Martín Cortés Romero, por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.

Al laboratorio de Supercómputo y visualización en Paralelo por las facilidades otorgadas para el desarrollo del modelamiento molecular de este proyecto.

A la M. en C. Lourdes Palma Tirado, del Instituto de Neurobiología, por su apoyo para análisis por Microscopía electrónica de transmisión.

A la Dra. Carmen Peza Ledesma y a la M. en C. Alicia del Real López, por su apoyo y recomendaciones para los análisis de SEM y EDS.

A la Dra. Genoveva Hernández Padrón, por los análisis de Espectroscopía Raman.

A los miembros del Laboratorio de Nanobio-óptica, especialmente a los Dres. Edgar Jiménez Cervantes-Amieva, Damián Compean y Blanca Millán.

A mis compañeros del Laboratorio Ollín, Isadora, Gisela, Giovana y Anahí, por sus valiosas recomendaciones para el desarrollo de mi trabajo.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Justificación.....	3
1.2 Antecedentes .....	3
1.2.1 Nanopartículas para liberación de fármacos .....	3
1.2.2 Nanopartículas cerámicas mesoporosas.....	4
1.2.3 El material mesoporoso SBA-15.....	9
1.2.4 Biocompatibilidad.....	15
1.2.5 Liposomas .....	15
1.2.6 Liposomas estabilizados o nanopartículas biomiméticas .....	17
1.2.7 Interacción entre nanopartículas y células humanas.....	19
1.2.8 Formación de la biocorona sobre nanopartículas expuestas a fluidos biológicos .....	20
1.2.9 Química cuántica computacional .....	26
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Hipótesis .....	29
2.2 Objetivos .....	29
2.2.1 Objetivo General:.....	29
2.2.2 Objetivos Particulares:.....	29
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
3.1 Metodología Experimental.....	30
3.1.1 Síntesis de nanopartículas .....	30
3.1.2 Plasma sanguíneo.....	31
3.1.3 Incubación de nanopartículas en plasma sanguíneo.....	31
3.1.4 Preparación de la solución de extracción de proteínas .....	32
3.1.5 Análisis de biocorona.....	32

3.1.6	Cuantificación de proteínas de la biocorona .....	32
3.1.7	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	33
3.1.8	Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDX) 33	
3.1.9	Espectroscopia Raman.....	34
3.1.10	Hidrofilización de partículas de sílice.....	34
3.1.11	Preparación de liposomas .....	34
3.1.12	Funcionalización de partículas con liposomas.....	35
3.2	Metodología Teórica.....	35
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1	Talla y morfología de las partículas nanoporosas SBA-15.....	36
4.2	Análisis de la talla de poros y del área superficial interna de las partículas SBA15 .....	40
4.3	Preparación de liposomas unilaminares zwitteriónicos .....	42
4.4	Preparación del híbrido SBA15 con liposomas zwitteriónicos.....	43
4.5	Obtención del plasma.....	46
4.6	Cuantificación de proteínas por el método de la Ninhidrina .....	47
4.7	Análisis térmico de la partícula.....	48
4.8	Análisis elemental (SEM - EDX) de las partículas mesoporosas SBA-15 con capa biomimética .....	52
4.9	TEM con tinción negativa (acetato de uranilo) .....	54
4.10	Simulación molecular del sistema.....	57
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dimensiones en nanoescala de varios objetos .....	5
Tabla 2. Clasificación de los materiales mesoporosos .....	6
Tabla 3. Propiedades texturales de la SBA-15 .....	9
Tabla 4 Valores normales relativos a las diferentes proteínas plasmáticas respecto al total .....	22
Tabla 5 Bandas características de cada material analizado por espectroscopía Raman .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema básico de un surfactante .....	7
Figura 2 Mecanismo de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15. Figura adaptada de [Van der Voort y col., 2002; Flodstrom y Alfredsson, 2003; Lachheb y col., 2011] .....	11
Figura 3 Hidrólisis del TEOS .....	13
Figura 4 Reacción de condensación de agua .....	13
Figura 5. Reacción de condensación de alcohol .....	14
Figura 6. Lípidos en medio acuosos: a) anfipático, b) sección transversal de una micela, c) sección trasversal de una bicapa lipídica, d) sección transversal de un liposoma .....	16
Figura 7. Ingreso de partículas con diversas características en la membrana celular a través de macropinocitosis .....	20
Figura 8. Enlace peptídico .....	23
Figura 9. Representación esquemática de la corona de proteínas, o biocorona, que se deposita sobre una nanopartícula al contacto con fluidos biológicos. Distintas proteínas (representadas como polígonos de diferente color) se adhieren mediante enlaces no covalentes a las nanopartículas, pudiendo influir sobre el devenir de las mismas en un organismo (Wolfram et al., 2014) .....	25
Figura 10. Imágenes obtenidas por TEM de las partículas nanoporosas SBA-15 obtenidas para este estudio, (a) resolución a 200 nn; (b) resolución a 100 nn. ....	37
Figura 11. Imágenes TEM de las partículas obtenidas nanoporosa SBA-15 para este estudio. (a) Resolución a 200 nn; (b) Resolución a 500 nn .....	38
Figura 12. Isotherma de adsorción-desorción de N <sub>2</sub> a 77°K de las partículas de sílice obtenidas .....	40
Figura 13. Distribución del tamaño de poro de las partículas SBA-15 obtenidas para este estudio .....	41
Figura 14. Espectro Raman de liposomas unilaminares zwitteriónicos .....	43
Figura 15. Espectros Raman de las partículas nanoporosas de sílice SBA-15, de los liposomas zwitteriónicos unilaminares (LUV) y de la partícula híbrida de SBA-15 con liposomas zwitteriónicos .....	45

Figura 16. Curva patrón de BSA de la determinación de proteínas del plasma por el método de Bradford.....	47
Figura 17. Curva patrón de BSA de la determinación de proteínas de las partículas por el método de la Ninhidrina.....	48
Figura 18 Gráfica del TGA hecho a la partícula incubada en plasma .....	49
Figura 19. Gráfica del DTG hecha a la partícula incubada en plasma. ....	49
Figura 20. Gráfica del TGA hecha a la partícula funcionalizada.....	50
Figura 21. Gráfica del DTG hecha a la partícula funcionalizada .....	50
Figura 22. Gráfica del TGA hecha a la partícula funcionalizada e incubada en plasma.....	51
Figura 23. Gráfica del DTG hecha a la partícula funcionalizada e incubada en plasma.....	51
Figura 24. Imágenes de SEM de la partícula SBA-15 recubierta por liposoma.....	53
Figura 25. Análisis elemental (SEM-EDX) de las partículas mesoporosas SBA-15 con capa biomimética.....	54
Figura 26. TEM con tinción de las partícula izquierda sin funcionalizar y derecha funcionalizadas.....	55
Figura 27. TEM con tinción de las partículas izquierda sin funcionalizar y expuestas a plasma y derecha funcionalizadas y expuestas a plasma.....	56
Figura 28. Simulación de glutamina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15 .....	57
Figura 29. Simulación de arginina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15 .....	58
Figura 30. Simulación de asparagina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15.....	58
Figura 31. Simulación de glicina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15 .....	59

## 1. INTRODUCCIÓN

El avance de la medicina ha ocasionado una revolución en la manera de tratar enfermedades. Un medicamento tomado vía oral pierde gran parte de su efectividad al ser metabolizado en el hígado o digerido por parte del sistema digestivo, ocasionando que sólo un porcentaje muy reducido del compuesto llegue a la zona afectada y produzca su efecto (López, 2014). Por la posibilidad de alcanzar prácticamente cualquier blanco terapéutico, la vía de administración intravenosa es ampliamente utilizada. Sin embargo, la distribución del medicamento en todo el organismo a partir de esta vía resulta en una baja eficacia terapéutica. La solución de las farmacéuticas es suministrar grandes cantidades del medicamento, lo que produce altos costos y efectos secundarios para los pacientes (López, 2014)).

Un área emergente en medicina es la Nanotecnología, que es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de materiales, a nivel de átomos y moléculas, que corresponde a dimensiones en el intervalo de 0.1 a 100 nanómetros, aunque algunos autores incluyen escalas de varios cientos nanómetros menores a la micra. En esta escala, la materia muestra características y aplicaciones nuevas a las conocidas tradicionalmente.

La aplicación de la nanotecnología a la medicina ha sido llamada Nanomedicina, definiéndose como la rama de la Nanotecnología que emplea herramientas moleculares, así como conocimientos sobre el cuerpo humano, a fin de preservar y mejorar la salud. La actividad interesante es tender el puente a través de estos reinos, biomoleculares y físicos, aprovechar las capacidades únicas de un reino para su aplicación en el otro (Wong *et al.*, 2013).

Una de las ramas de la Nanomedicina es aquella dedicada a la utilización de nanopartículas para fines farmacéuticos; su uso permite realizar una auténtica “nanoentrega”. La administración de fármacos a base de nanotecnología tiene como

objetivo orientar el suministro de drogas en el lugar adecuado, en el momento adecuado, con la dosis óptima. El sistema de entrega de la nanodroga mejora la biodisponibilidad de cada fármaco, reduciendo los efectos adversos perjudiciales (Banu *et al.*, 2014).

Dado que las estructuras celulares presentan escalas nanométricas, la Nanotecnología puede influir e incluso alterar el comportamiento celular que, en última instancia, podría mejorar el funcionamiento de tejidos u órganos. Existen diferentes sistemas de administración de fármacos en nanoacarreadores, también conocidos como nanovectores, específicamente: nanopartículas, andamios con nanofibras, andamios con modificaciones nanotopográficas, o bien una combinación de ellos (Nehoff *et al.*, 2014). Los nanoacarreadores multifuncionales pueden responder a varios estímulos que son característicos del sitio patológico, que se consigue a través de la inclusión de componentes que reaccionan a condiciones anormales de pH, temperatura y sobreexpresión de ciertas moléculas biológicas (Nehoff *et al.*, 2014).

Los materiales nanoestructurados son una nueva clase de materiales altamente potenciales capaz de aplicarse en diversos campos de la ciencia de los materiales, la tecnología, así como de las ciencias biomédicas (Ansari *et al.*, 2010). Una de sus grandes ventajas es que éstos tienen un tamaño comparable con las células, es decir, con macromoléculas biológicas y con estructuras celulares, tales como organelos (Caballero, 2013), razón por la cual resultan apropiados para una posible aplicación como materiales biomiméticos y ha sido un tema candente de discusión en las últimas dos décadas (Balmert *et al.*, 2013). De esta forma, el estudio y desarrollo de nanopartículas ofrece la oportunidad del tratamiento de enfermedades para las que actualmente existen importantes limitaciones terapéuticas.

## 1.1 Justificación

La partícula SBA-15 se puede sintetizar de un amplio rango de tamaño de poro, de espesor de pared de poro y área superficial, además sintetizarla es de bajo costo y posee propiedades biocompatibles, esto la hace un sistema atractivo para aplicaciones en liberación controlada de fármacos. Existen otras partículas que también pueden ser ocupadas para estos fines como la MCM-41, sin embargo estas partículas sólo se pueden sintetizar de 2 a 3 nm y la SBA-15 de 4 a 7nm, este tamaño y estabilidad del poro debida al espesor le confieren además de gran capacidad de almacenamiento de moléculas como fármacos, ser un sistema selectivo que pueda ingresar ciertas proteínas pequeñas además de proteger de sistemas externos que se pudiese encontrar en el medio. También este tipo de poro permite una adecuada funcionalización con un sistema polar como los liposomas. Los liposomas son una estructura orgánica adecuada para probar para funcionalizar porque son fáciles de sintetizar, contribuye al biomimetismo y se pueden sintetizar de diversas cargas. No se ha reportado un sistema funcionalizado de este tipo de partículas ni evaluado los efectos al contacto de plasma humano para la formación de la biocorona.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Nanopartículas para liberación de fármacos

Uno de los sistemas atractivos en Nanomedicina son las partículas de sílice, las cuales son estructuras cerámicas con una gran capacidad de almacenamiento de materiales (o fármacos); una de las ventajas de estas nanopartículas es la de modificar sus propiedades superficiales fácilmente, pudiendo adaptarlas para transportar moléculas de diversa naturaleza (Caballero, 2013). Aunado a ello, las partículas de sílice son de bajo costo y son biocompatibles.

Otras de las partículas más prometedoras para la liberación de fármacos son los liposomas, descubiertos en 1961 por Bangham y colaboradores, quienes observaron que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en disolución acuosa. Estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por láminas o bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso. Comúnmente, a las vesículas formadas por fosfolípidos se les denomina liposomas, y las que están formadas por lípidos son vesículas, ambas denominaciones para los liposomas son aceptadas (Ruano, 2013). Los liposomas constituyen el primer sistema nanoacarreador de fármacos que fue aceptado para uso humano.

### 1.2.2 Nanopartículas cerámicas mesoporosas

Las cerámicas se definen como materiales inorgánicos con propiedades no metálicas, compuestos de elementos metálicos y elementos no metálicos, tales como el Aluminio y el Oxígeno ( $Al_2O_3$ ), Calcio y Oxígeno ( $CaO$ ), o Silicio y Nitrógeno ( $Si_3N_4$ ). (Acosta-Torres *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó, la capacidad de acarreo de fármacos es una característica clave para la selección de un material. En el caso de las partículas de sílice, se cuenta con métodos estandarizados que permiten la obtención de estructuras con poros bien estructurados, de dimensiones nanométricas, que resultan ideales para el encapsulamiento de fármacos. Resulta importante mencionar que una de las principales razones por las que la Nanotecnología puede ofrecer soluciones en el campo de la Biomedicina es la conmensurabilidad entre los materiales nanoestructurados y las moléculas y estructuras biológicas (ver tabla I).

**Tabla 1. Dimensiones en nanoescala de varios objetos**

<b>Objeto</b>	<b>Dimensión (nm)</b>
<b>Diámetro de un cabello</b>	50000
<b>Glóbulo rojo</b>	2500
<b>Vesícula en una célula</b>	200
<b>Bacteria</b>	1000
<b>Virus</b>	100
<b>Exosomas (nanovesículas dealojadas por las células dendríticas)</b>	65-100
<b>Diámetro del ADN</b>	2.5
<b>Ribosoma</b>	2-4
<b>Un par de bases en el genoma humano</b>	0.4
<b>Proteínas</b>	1-20
<b>Aminoácido (ejemplo, triptófano, el más largo)</b>	1.2 ( la medida más larga)
<b>Molécula de aspirina</b>	1
<b>Un átomo individual</b>	0.25

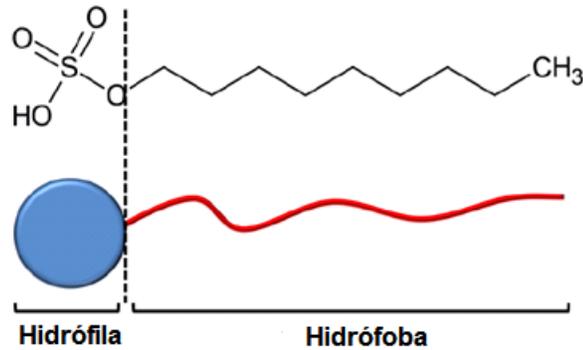
En un material, la existencia de poros y el control de su tamaño resultan de gran interés, ya que brindan la capacidad para interactuar con átomos, iones o moléculas no solamente en la superficie del material, sino a través del interior de la pared de sus poros. Asimismo, el control del tamaño de los poros permite seleccionar el tipo de biomoléculas que un material es capaz de incluir y de excluir de su interior, dando lugar a aplicaciones tales como el encapsulamiento de fármacos combinado con la protección de los mismos ante enzimas capaces de degradarlos.

Los materiales porosos son aquellos que tienen un diámetro de poro homogéneo en toda su superficie y de acuerdo a la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) estos materiales se clasifican por el tamaño del poro (Tabla II).

**Tabla 2. Clasificación de los materiales mesoporosos**

Tamaño de poro	Clasificación
Menor de 2 nm	Microporoso
De 2 a 50 nm	Mesoporoso
Mayor de 50 nm	Macroporoso

De acuerdo a lo mencionado, la sílice mesoporosa resulta uno de los materiales más prometedores para el acarreo de fármacos. Los materiales de sílice mesoporosa se sintetizan utilizando moléculas anfifílicas capaces de autoensamblarse de forma ordenada, constituyendo así una plantilla para la estructura interna durante la condensación de la sílice. Estas moléculas anfifílicas son denominadas surfactantes o tensioactivos, y son moléculas que tienen tendencia a adsorberse en las superficies e interfases. Tienen una estructura química dual, una parte de la molécula es hidrófila y el otro es hidrófoba. En la siguiente figura es posible observar la estructura de un tensioactivo (Barrabino, 2011):



**Figura 1** Esquema básico de un surfactante

Básicamente, los surfactantes pueden ser de tres formas: algunos se solubilizan en agua como moléculas individuales; otros permanecen en la interfaz agua-aire. Después de alcanzada la saturación de todas las interfases, todo el agente surfactante que permanece en el agua se conforma en grupos llamados micelas. Este punto, cuando se forma la primera micela, se llama Concentración Micelar Crítica (también conocida como CMC). La CMC depende de la estructura química de cada compuesto. Por ejemplo, de acuerdo con la longitud de la cola hidrófoba, depende la CMC. Este fenómeno se explica porque las cadenas de carbono más largas o más cortas se agregan con mayor o menor dificultad. De ello se deriva también el gasto de energía y, por lo tanto, la conformación de sistemas de mayor o menor estabilidad. La CMC es un valor muy importante para los surfactantes (Barrabino, 2011).

Una manera para clasificar los surfactantes es en función de su carga de la cabeza polar, resultando estos 4 grupos:

- Los surfactantes aniónicos: esta familia de surfactantes poseen grupos de cabezas polares cargadas negativamente. El grupo no polar es una cadena de hidrocarburo grande, entre C12 y C18. Los grupos polares más utilizados en este tipo de surfactantes son carboxilatos, sulfatos, sulfonatos y fosfatos.

- Los catiónicos: tienen una cabeza polar cargada positiva y una cadena de alquilo grande como un grupo no polar. Esta familia se basa en el átomo de nitrógeno. Aminas y productos a base de amonio cuaternario son comunes como un grupo de cabeza.
- No iónicos: los surfactantes no iónicos tienen un poliéter o una unidad de polihidroxi como el grupo polar. En realidad, el poli (óxido de etileno) (EO)<sub>x</sub> es el grupo polar más común. Como grupo no polar, el poli (óxido de propileno) (PO)<sub>x</sub> es probablemente el más común. En esta familia, debemos hacer hincapié en los copolímeros de bloque. Estos copolímeros tienen un peso molecular relativamente bajo. Se componen de bloques de diferentes monómeros polimerizados. Por ejemplo, el copolímero formado por EO y PO, en el cual las estructuras polares del EO quedan en los extremos, generándose así el copolímero (EO)<sub>x</sub>-(PO)<sub>x</sub>-(EO)<sub>x</sub>.
- Iones híbridos: Esta es la última familia de surfactantes. Tienen dos diferentes cargas de distinto signo en su grupo de cabezas dando una carga neta neutra. La carga positiva más común es dada por un grupo amonio, la fuente de carga negativa puede variar, pero los carboxilatos son por mucho el más común (Barrabino, 2011).

Para la síntesis de sílices mesoporosas, con la variación de las condiciones se pueden obtener dos tipos diferentes de estructuras internas: la estructura hexagonal de dos dimensiones ( $p6mm$ ) también conocidos como MCM-41, y la estructura cúbica tridimensional ( $Ia3d$ ), conocida como MCM-48. Cuando llegamos a una estructura hexagonal de dos dimensiones, pero en lugar de un agente tensioactivo catiónico se utiliza un copolímero tribloque, tal como el ácido plurónico ("Pluronic P123"), el material es llamado SBA-15 (Santa Bárbara Amorfo No. 15)

### 1.2.3 El material mesoporoso SBA-15

Los materiales SBA han sido reportados como las sílices mesoporosas más estables desde el punto de vista hidrotérmico, debido a sus paredes más gruesas. La estructura de los agentes tensioactivos utilizados en estos materiales son  $(EO)_x - (PO)_y - (EO)_x$ . Otra ventaja de los materiales SBA-15 es que tienen microporos desordenados, lo que permite la conexión entre mesoporos.

El material denominado SBA-15 fue desarrollado por Stucky *et al.*, 1994. Tiene una estructura hexagonal de poros uniformes, de tipo panal (*honeycomb-like*). Puede ser preparado en un amplio rango de tamaños de poro (4.6 nm a 30 nm) y espesores de pared de poro (3.1 nm a 6.4 nm), con alta área superficial (>800 m<sup>2</sup>/g) (Tabla III). Esto se logra variando la temperatura (35 °C a 140 °C) y tiempo de reacción (11 h a 72 h) durante su síntesis. En ocasiones el tamaño de poro se puede modificar agregando un agente de hinchamiento como el 1, 3, 5-trimetilbenceno (mesitileno).

**Tabla 3. Propiedades texturales de la SBA-15**

Propiedad	Característica
Área superficial	800-940 m <sup>2</sup> /g
Diámetro de poro	4.6-30 nm
Volumen de poro	1 cm <sup>3</sup> /g

La SBA-15 se sintetiza por el método sol-gel y por medio de un mecanismo neutral que involucra interacciones del tipo de enlaces de hidrógeno entre surfactantes neutros (copolímeros anfífilicos de tres bloques) como agentes directores de estructura y precursores inorgánicos neutros (Figura 2). Como se mencionó anteriormente, el papel del surfactante es el de guiar la formación de la estructura mesoporosa. En el caso de un copolímero de tres bloques, se trata de un surfactante que en solución tiene dos partes dentro de la misma molécula (un grupo

de cabeza hidrofílico y una larga cola hidrofóbica) las cuales se agregan y auto-organizan de tal manera que minimizan el contacto entre sus extremos incompatibles.

Con la adición del precursor inorgánico, como se presenta más adelante, las especies inorgánicas participan en interacciones del tipo de enlaces de hidrógeno con los grupos de cabeza del surfactante dando como resultado la formación de una mesoestructura (inorgánico-surfactante) ordenada de forma hexagonal.

Durante la etapa llamada de madurado, la mesoestructura se consolida adquiriendo sus características finales. Finalmente, el surfactante se elimina por extracción con un solvente o por calcinación para obtener el material mesoporoso ordenado.

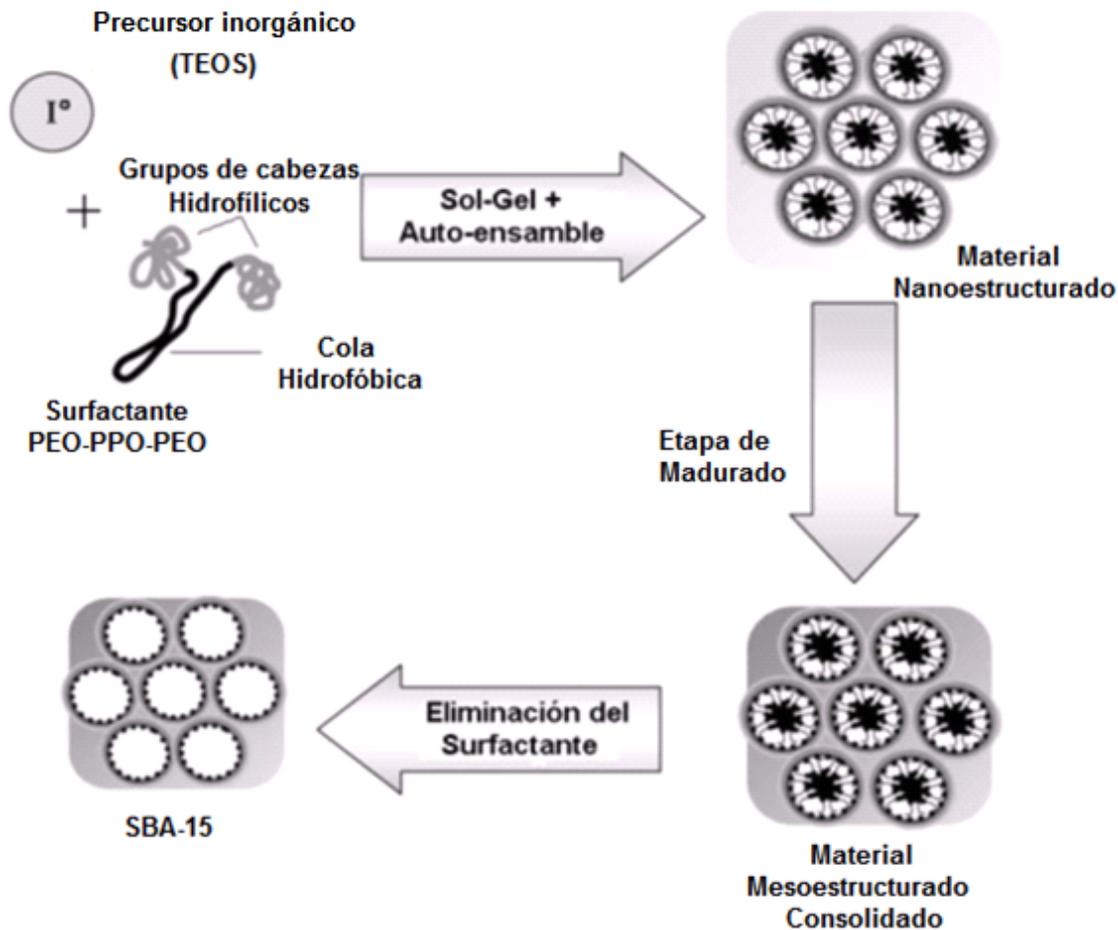


Figura 2 Mecanismo de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15. Figura adaptada de [Van der Voort y col., 2002; Flodstrom y Alfredsson, 2003; Lachheb y col., 2011]

El proceso Sol-Gel, como su nombre lo indica, es un proceso químico homogéneo que involucra la transformación continua de una solución para formar una dispersión coloidal (sol) y la condensación del sol para formar una red en fase líquida continua (gel). Este proceso se aplica en la preparación de una amplia gama de materiales como son materiales policristalinos y amorfos con propiedades únicas que no pueden ser obtenidas por otros métodos.

Los soles son dispersiones de sólidos coloidales de partículas muy pequeñas (diámetros menores de 500 nm), que se encuentran dispersas en un medio. No se pueden observar a simple vista ni con un microscopio óptico común,

y sólo es posible hacerlo mediante microscopios electrónicos. Otra característica es que estos no pueden ser detenidos por la mayoría de los papeles filtro debido a su pequeñísimo tamaño.

En el caso de los geles, éstos forman redes complejas tridimensionales, las cuales se forman mediante uniones de hidrógeno, formando un sólido semirrígido. En los geles el medio de dispersión inicial se encuentra absorbido por las partículas de soles, como una esponja con agua.

El proceso Sol-Gel se ha utilizado desde mediados del siglo XIX, ya que permite obtener materiales de alta dureza y homogeneidad a temperaturas no elevadas, en comparación con otras técnicas como el método tradicional para obtener cerámicas.

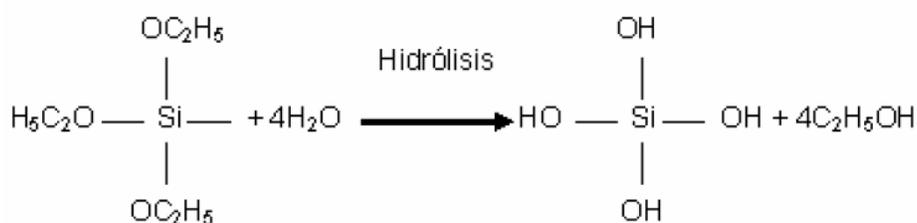
Muchos trabajos en el campo de la preparación de materiales inorgánicos (cerámicas) por el método Sol-Gel se han realizado utilizando como precursores alcóxidos metálicos, ya que brindan la posibilidad de controlar la reacción de hidrólisis y de condensación por medios químicos, además de que reaccionan rápidamente con el agua. Los alcóxidos metálicos más ampliamente utilizados para la preparación de la sílice son los alcoxisilanos, tales como el tetra-metil-ortosilicato (TMOS) y el tetra-etil-ortosilicato (TEOS). También existen otros alcóxidos para la formación de otras cerámicas, como los aluminatos, como fuente de alúmina, y los titanatos como fuente de titania.

En general, la síntesis de materiales cerámicos por sol-gel se ha reconocido por su versatilidad y porque permite un mejor control de la textura, composición, homogeneidad y propiedades estructurales de los sólidos obtenidos. El método Sol-Gel permite obtener materiales con alta área superficial (alta porosidad).

El proceso sol-gel involucra diferentes etapas de las cuales las más importantes son: *hidrólisis y condensación de agua y alcohol*. Estas etapas son las

más importantes del proceso ya que en éstas se determina la estructura final que presentará el material y, por lo tanto, sus características físicas y químicas. Estas dos etapas se llevan a cabo simultáneamente.

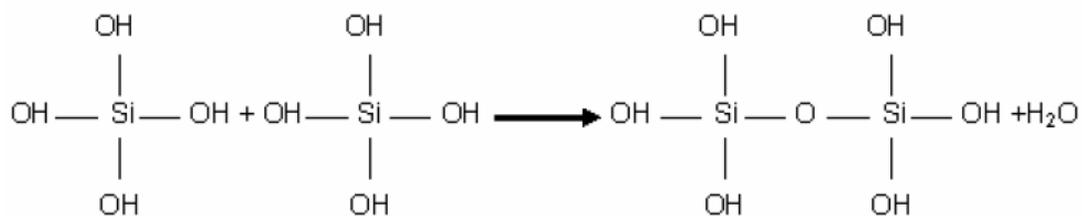
Al realizar la mezcla de los reactivos, los coloides (soles) se encuentran dispersos en la solución, la cual generalmente es agua y etanol. El tetra-etil-ortosilicato (TEOS), precursor de la sílice, reacciona con el agua dándose una reacción de hidrólisis. En esta hidrólisis los grupos alcóxidos ( $\text{OC}_2\text{H}_5$ ) son sustituidos por hidroxilos ( $\text{OH}$ ) y dan como producto etanol y silanol (hidróxido del silicio) (Figura 3).



**Figura 3 Hidrólisis del TEOS**

Simultáneamente, se llevan a cabo las reacciones de condensación para la formación de los enlaces siloxanos,  $\text{Si-O-Si}$ , que pueden ocurrir en dos formas:

1. Reacción de condensación de agua mediante la reacción entre dos grupos hidroxilos de los hidróxidos de silicio (Figura 4).



**Figura 4 Reacción de condensación de agua**

2. Reacción de condensación de alcohol mediante la reacción de un grupo hidroxilo (Si-OH) con un grupo alcóxido (Si-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) (Figura 5).

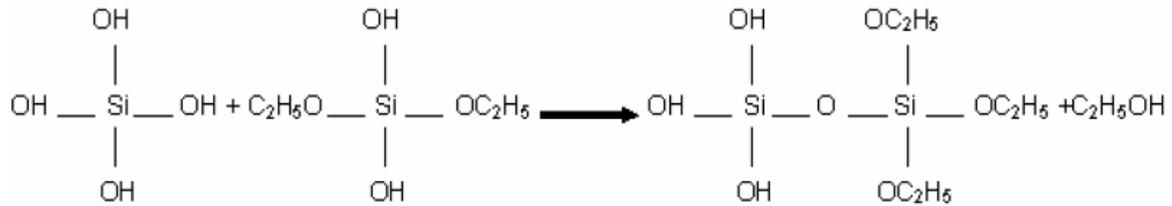


Figura 5. Reacción de condensación de alcohol

Esta última reacción continúa realizándose, hasta formar una red sólida tridimensional (gel) la cual contiene en sus poros agua y etanol.

Existe una serie de factores que van a afectar las estructuras del gel, como son la temperatura, la concentración de electrolitos, la naturaleza del precursor y el tipo de alcóxido utilizado. Un factor muy importante que debe controlarse es la velocidad de reacción a la cual se realizan tanto la hidrólisis como la condensación, lo cual se controla por el pH de la solución en la cual se realiza la reacción.

En suma, la síntesis de sílice mediante sol-gel comprende los siguientes 3 pasos:

- *Gelificación.* Es la transformación del sol en gel. En esta etapa las partículas de sílice condensadas se unen entre sí para dar forma a una red tridimensional. Físicamente esta etapa se puede identificar por generarse un aumento en la viscosidad de la solución.
- *Madurado.* Esta etapa es un periodo de tiempo de reposo en el cual continúan condensándose partículas y uniéndose hasta encontrar la estabilidad de la estructura a formar.

- *Secado*. Consiste en la eliminación del líquido que contiene el gel, este líquido se encuentra dentro de los poros formados por la red.

#### 1.2.4 Biocompatibilidad

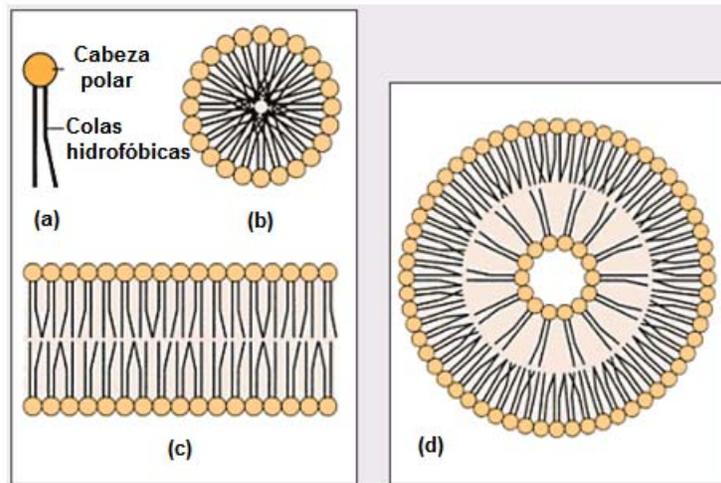
De forma general, el sistema inmune innato reconoce fácilmente y destruye el material extraño que entra en la circulación del cuerpo. En ausencia de camuflaje, diversas nanopartículas pueden ser fagocitadas (engullidas) por el sistema fagocítico mononuclear (MPS), el cual reduce drásticamente la vida media de la nanopartícula (Beas *et al.*, 2009). De forma particular los materiales de sílice mesoporosos son estructuras que presentan baja toxicidad, su biocompatibilidad y biotranslocación está en función de su tamaño, forma, superficie, área y su estructura (Sun, 2012).

Nuevos hallazgos sugieren que el control del tamaño y la funcionalización de las partículas de sílice contribuyen a minimizar aún más su toxicidad, otro aspecto importante de estos materiales es que en circulación in vivo estas partículas se acumulan principalmente en hígado, riñón y vejiga urinaria, y luego se excretan a través de vía renal (Tang, 2012).

#### 1.2.5 Liposomas

Los lípidos son biomoléculas orgánicas formadas por cadenas largas de carbono, e hidrógeno y oxígeno en porcentajes más bajos, también pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre. Esta composición determina que las moléculas sean en mayor o menor grado apolares o anfifílicas y posean la propiedad de solubilidad (Torchilin, 2014).

En la Figura 6 se muestra el acomodo de lípidos anfifílicos en un medio acuoso.



**Figura 6. Lípidos en medio acuoso: a) anfipático, b) sección transversal de una micela, c) sección trasversal de una bicapa lipídica, d) sección transversal de un liposoma**

En cuanto a esto, los liposomas son vesículas compuestas de una bicapa lipídica que rodea un compartimento acuoso interno (Banu, 2014). El tamaño de estas vesículas lipídicas casi esféricas puede variar desde unos pocos nanómetros a varios micrómetros. Sin embargo, los liposomas aplicados a uso médico poseen un rango de entre 50 y 450 nm (Bozzuto, 2015).

La composición, la distinta naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas y regiones polares de los lípidos, determinan muchas propiedades superficiales y de membrana, tales como la carga superficial, interacciones estéricas o la rigidez de la membrana.

Las vesículas/liposomas se clasifican generalmente en función de la morfología o naturaleza y del número de membranas o lamelas (Barrán, 2015):

- SUV: vesículas unilaminares pequeñas de entre 20 y 50nm de tamaño.
- LUV: vesículas unilaminares grandes de entre 50 a 500 nm.

- GUV: Vesículas unilaminares gigantes con tamaños superiores a 1 micrómetro.
- MLV: vesículas multilaminares, su tamaño varía en función del número de bicapas, pudiendo llegar a tamaños superiores a 10 micrómetros.

Los liposomas pueden estar constituidos por uno o varios tipos de fosfolípidos, pudiendo llegar a contener algún otro componente (lípidos de doble cadena, colesterol o derivados, glicolípidos, ácidos grasos, proteínas, etc). Por este motivo, y a diferencia de las vesículas no fosfolipídicas, se hace necesario un gran aporte energético para su preparación, llegándose a obtener liposomas de muy variada estabilidad y tamaño, en función del método aplicado, aun partiendo de una misma composición.

En cuanto a la carga que presenten los lípidos en los grupos polares, éstos pueden ser catiónicos, aniónicos, neutros o zwitteriónicos.

Los tipos de lípidos a utilizar en este trabajo son los lípidos zwitteriónicos, que se caracterizan por presentar carga positiva y negativa en la misma molécula, siendo, por tanto, el pH del medio el que determina la carga neta global. Habitualmente, se utilizan mezclados en distintas proporciones con el lípido catiónico a un pH tal que su carga neta sea nula (Barrán, 2015 ).

#### 1.2.6 Liposomas estabilizados o nanopartículas biomiméticas

Los liposomas son los sistemas de suministro de fármacos más ampliamente utilizados para la administración sistémica de muchos fármacos para disminuir la toxicidad del fármaco y el aumento de su acumulación en los sitios diana (blanco terapéutico) (Calixto *et al.*, 2014).

También su amplia aplicación es debida a que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y de carácter anfifílico. Además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Si se utilizan lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo tumores, acercándose al concepto que Helrich introdujo denominándolo bala mágica (Barrán, 2015).

En casos más particulares, el uso de lípidos a las superficies de sílice de la capa se ha demostrado durante más de una década en un intento de emular biomiméticamente el revestimiento de lípidos de las membranas celulares y mejorar la biocompatibilidad SiNps (Carmona, 2010). Esta bicapa de lípidos puede tener diferencias estructurales en sus componentes, pudiendo estar formada por lípidos neutros o por lípidos con carga eléctrica.

El mecanismo y el alcance de la interacción de las células de liposomas están fuertemente influenciados por la naturaleza y la densidad de la carga de la superficie de los liposomas. Los liposomas pueden incluir componentes que les confieren una carga neutra, positiva o negativa general cargada. Los liposomas neutros no interactúan significativamente con las células y esto permite la liberación del fármaco desde los liposomas en el espacio extracelular. Una carga superficial electrostática podría promover la interacción de los liposomas con las células (Bozzuto, 2015).

En este proyecto, se propone la síntesis de nanopartículas con una alta biocompatibilidad, mediante la funcionalización de éstas con una bicapa de lípidos. De esta manera, la bicapa de fosfolípidos mimetizará una membrana biológica, interactuando con las células como cualquier otra vesícula.

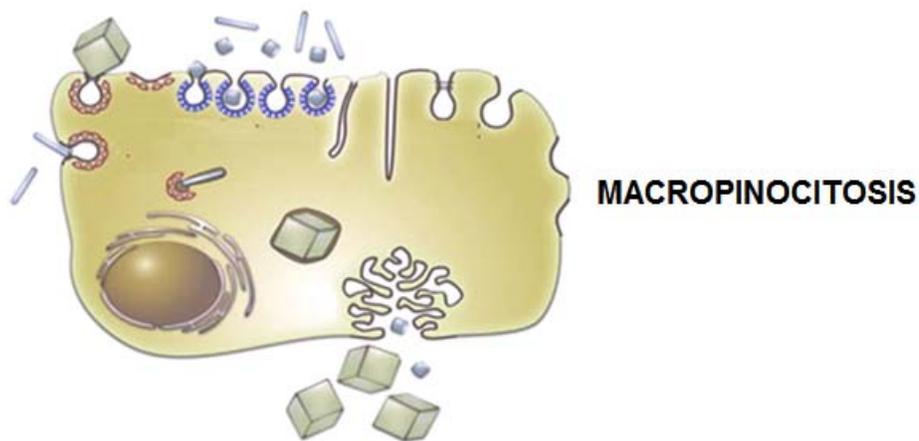
### 1.2.7 Interacción entre nanopartículas y células humanas

Una importante barrera física que debe ser superada por los nanomedicamentos para la entrega intracelular es la membrana plasmática. En general, las nanopartículas se internalizan a través de endocitosis después de la inmovilización en la superficie de la célula. La endocitosis es el proceso natural por el cual macromoléculas ingresan a la célula, puede ser desencadenada por la unión de las nanopartículas a la membrana celular (Vercauteren *et al.*, 2012).

Del proceso de endocitosis se conocen 2 tipos, un tipo, la fagocitosis, el cual es característico de los fagocitos profesionales especializados, tales como macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas; en este proceso los macrófagos fagocitar partículas tan grandes como 20 micras. El otro tipo, la pinocitosis, en contraste está presente en todos los tipos de células y tiene múltiples formas según el origen y la función celular.

También existe un caso especial de la pinocitosis llamada macropinocitosis, que se inicia por la activación transitoria de tirosina quinasas receptoras de factores de crecimiento. La activación del receptor conduce a cambios en el citoesqueleto y desencadena la formación de ondulaciones de la membrana, las cuales sobresalen para engullir el líquido que rodea y nutrientes en el medio extracelular. En principio por este proceso se pueden internalizar partículas submicrométricas que carecen de la fagocitosis. En la mayoría de los casos esta vía puede servir como un punto de entrada no específica para los nanomateriales que pueden utilizar varios mecanismos para la entrada celular (Sahay *et al.*, 2015).

Otros aspectos importantes a considerar para que nanomedicamentos puedan ingresar a la membrana celular través de la ruta endocítica son ciertos parámetros físico-químicos como son carga, forma, composición del material, y la química de superficie (Sahay *et al.*, 2015).



G. Sahay et al. / Journal of Controlled Release 145 (2010) 182–195

**Figura 7. Ingreso de partículas con diversas características en la membrana celular a través de macropinocitosis**

Cabe señalar que la mayoría de los blancos terapéuticos son células no fagocíticas, por lo que para este estudio este tipo de endocitosis es de principal interés.

## 1.2.8 Formación de la biocorona sobre nanopartículas expuestas a fluidos biológicos

### 1.2.8.1 Composición de fluidos biológicos

Los fluidos biológicos son las diferentes excreciones y secreciones que provienen del organismo. De la totalidad del líquido corporal se pueden diferenciar dos tipos de fluidos que cumplen funciones diferentes: El fluido intracelular que es el que contiene las células y constituye su medio interno; Y el fluido extracelular que comprende el resto de líquido que contiene el organismo, incluye el líquido intersticial (líquido de los tejidos intersticiales, el del tejido de sostén y la linfa), el plasma y diversos fluidos del organismo (Fuentes *et al.*, 1998 ).

En el presente trabajo se hace uso del plasma sanguíneo, la sangre puede considerarse como un tejido conectivo especializado, en el que la sustancia intercelular es un líquido y no existe componente fibroso; es fluido opaco y turbio, presenta una coloración que oscila entre el escarlata brillante (cuando está oxigenada: sangre arterial) y el rojo oscuro o púrpura (cuando es pobre en Oxígeno: sangre venosa). Las funciones que desempeña este tejido revisten gran importancia para el mantenimiento de la homeostasia.

La sangre al dejarla en reposo o centrifugarla (previamente tratada con anticoagulante), es posible observar su carácter heterogéneo, pues aparece un sobrenadante, el líquido denominado plasma (aproximadamente el 55%), y un sedimento, los elementos formales (células) (alrededor del 45%).

El plasma es un líquido claro ligeramente amarillento, compuesto en un 90% por agua; el resto lo constituye iones, los principales son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y moléculas orgánicas, como glúcidos, lípidos y proteínas, entre las cuales cabe destacar:

Albúmina (PM 69 000). Es la más abundante de las proteínas plasmáticas, con una concentración de 3.5-5 g/100 mL. Sintetizada por el hígado, sus funciones son: transporte de aniones y cationes; regulación de la presión osmótica o presión oncótica ejercida por las soluciones proteicas, si la concentración de albúmina disminuye, es más fácil la aparición edemas; y transporte de ácido grasos, bilirrubina y fármacos poco solubles.

Globulinas (PM entre 150 000 y 900 000). Los valores normales en el plasma oscilan alrededor de 2.5-3.5 g/100 mL. La fracción globulinas se subdividen en numerosos componentes, entre los que cabe destacar: alfa-1, alfa-2, beta y gamma. Las globulinas alfa y beta se encargan del transporte de sustancias como hierro, cobre, triglicéridos, vitaminas y hormonas. Entre las gammaglobulinas se encuentran los anticuerpos o inmunoglobulinas, que participan en el mecanismo de

defensa del organismo. Esta fracción proteica es sintetizada por linfocitos de la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos.

Fibrinógeno (PM 340 000). Proteína plasmática soluble, sintetizada por el hígado, es esencial en el complejo mecanismo de la coagulación. Los valores normales en plasma son de 200-400 mg/100 mL (Martín, 1994).

**Tabla 4 Valores normales relativos de las diferentes proteínas plasmáticas respecto al total.**

	Porcentaje
<b>Albúmina</b>	50-60
<b>Globulina alfa-1</b>	4.2 – 7.2
<b>Globulina alfa-2</b>	6.8 – 12
<b>Globulina beta</b>	9.3 – 15
<b>Gammaglobulina</b>	13 - 23

#### 1.2.8.2 Estructura de proteínas

Nuestros cuerpos y otros organismos contienen una enorme cantidad de moléculas diferentes. Las proteínas son algunas de estas moléculas, las cuales son sintetizadas en el interior de las células (López, *et al.*, 1991).

Las proteínas son las moléculas más versátiles de los seres vivos (Beas *et al.*, 2009) y desempeñan funciones cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos.

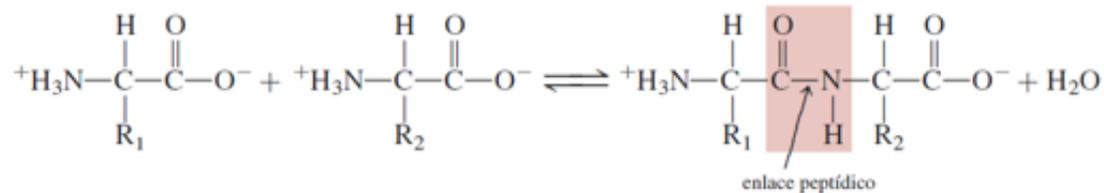
Antes de exponer la primera propiedad de las proteínas es necesario definir lo que es un polímero; Un polímero es un compuesto molecular que posee una masa molar grande, comprende desde miles a millones de gramos y están formados por

muchas unidades que se repiten, por ello se conocen como macromoléculas y sus propiedades físicas son muy distintas a las de las moléculas pequeñas comunes. Entre los polímeros naturales (o biopolímero) figuran las proteínas (Chang, 2010).

Las unidades estructurales de las proteínas son los aminoácidos, el cual es un compuesto que contiene por lo menos un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (-COOH), unidos en una secuencia lineal mediante un tipo específico de enlace covalente (enlace peptídico).

Todas las proteínas del cuerpo humano están formadas por 20 aminoácidos distintos, los cuales son alfa-aminoácidos; es decir, en todos ellos el carbono α (alfa) es asimétrico y está unido a cuatro grupos diferentes: el grupo carboxilo, el grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno (Beas et al., 2009):

La molécula formada a partir de los dos aminoácidos se conoce como dipéptido, y el enlace que los une es un enlace peptídico (Figura 8):



**Figura 8. Enlace peptídico**

Donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan un átomo de H o algún otro grupo; el grupo –CO-NH– se denomina amida. Como el equilibrio de la reacción en la que se unen dos aminoácidos está desplazado hacia la izquierda, el proceso está acoplado a la hidrólisis de ATP.

Cualquier extremo del dipéptido puede participar en una reacción de condensación con otro aminoácido para formar un tripéptido, un tetrapéptido, y así

sucesivamente. El producto final, que es la molécula de proteína, es un polipéptido, que puede verse como un polímero de aminoácidos. Una unidad de aminoácido de una cadena polipeptídica se conoce como residuo. Una cadena polipeptídica comúnmente contiene 100 o más residuos de aminoácidos (Chang, 2010).

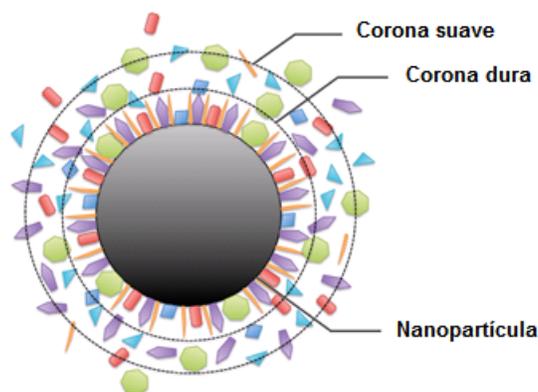
Las estructuras tridimensionales de estos biopolímeros (proteínas) se estabilizan por varios tipos de fuerzas intermoleculares.

#### *1.2.8.3 Interacción de proteínas con nanopartículas*

Las interacciones entre la sílice y otras partículas tales como enzimas pueden ser iónicas, polar y lipófilo. En la superficie de la sílice, se encuentran los grupos silanol. Estos grupos se pueden utilizar para fijar enzimas por enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y grupos carbonilo o amino en las moléculas de enzimas.

Refiriéndose a la sangre, ésta contiene una importante cantidad de proteínas, en cuanto a esto, la superficie de una nanopartícula es de gran importancia para su interacción dentro del cuerpo humano, ya que uno de los eventos que más influyen en dicha interacción es la adherencia de proteínas presentes en la sangre sobre las nanopartículas (Figura 9). Se sabe que, dependiendo de las características de superficie, distintos tipos y cantidades de proteínas podrían quedar adheridas a una nanopartícula, formando una “corona de proteínas”, también llamada “biocorona” (Wolfram *et al.*, 2014), en la que se observan interacciones dinámicas debido a que los ambientes biológicos son transitorios y no homogéneos. Dichas interacciones pueden ser claves en la modulación de la biodistribución, eliminación, de las respuestas inmunes y de la metabolización de los nanomateriales (NM). En este contexto se propone que la naturaleza de los NM influirán sobre las interacciones inespecíficas con los

componentes biológicos, esperándose en un futuro poder regular dichas interacciones según los intereses farmacéuticos [Guerrero, 2013].



**Figura 9. Representación esquemática de la corona de proteínas, o biocorona, que se deposita sobre una nanopartícula al contacto con fluidos biológicos. Distintas proteínas (representadas como polígonos de diferente color) se adhieren mediante enlaces no covalentes a las nanopartículas, pudiendo influir sobre el devenir de las mismas en un organismo (Wolfram et al., 2014)**

#### 1.2.8.4 Implicaciones de la formación de la biocorona en el destino de una partícula nanoestructurada (PNe)

Refiriéndose a la sangre, ésta contiene una importante cantidad de proteínas, en cuanto a esto, la superficie de una nanopartícula es de gran importancia para su interacción dentro del cuerpo humano, ya que uno de los eventos que más influyen en dicha interacción es la adherencia de proteínas presentes en la sangre sobre las nanopartículas (Figura 9). Se sabe que, dependiendo de las características de superficie, distintos tipos y cantidades de proteínas podrían quedar adheridas a una nanopartícula, formando una “corona de proteínas”, también llamada “biocorona” (Wolfram *et al.*, 2014), en la que se observan interacciones dinámicas debido a que los ambientes biológicos son transitorios y no homogéneos. Dichas interacciones pueden ser claves en la modulación de la biodistribución, en su eliminación, de la respuesta inmune y de la metabolización de los nanomateriales (NM). En este contexto se propone que la

naturaleza de los NM influirán sobre las interacciones inespecíficas con los componentes biológicos, esperándose en un futuro poder regular dichas interacciones según los intereses farmacéuticos (Guerrero, 2013).

Para los NM aún sigue sin conocerse a fondo el impacto que estos pueden tener en la salud, debido a que su interacción con los sistemas biológicos es muy compleja por la gran cantidad de interacciones con biomoléculas y células. Dichas interacciones pueden regular la biodistribución, aclaramiento, respuesta inmune y metabolismo de los NM, procesos que pueden llevarlos a ser biocompatibles o bioadversos. Llegar a comprender la relación entre las propiedades físicas y químicas de los NM y su conducta *in vivo*, contribuirá a interpretar su comportamiento biológico y así lograr una entrega selectiva (Guerrero, 2013).

#### 1.2.9 Química cuántica computacional

La química computacional es un nuevo campo del conocimiento desde los años setenta, el cual está orientado al diseño y cálculo de propiedades electrónicas de átomos, moléculas o sólidos cristalinos asistido por computadora. Esta ha sido impulsada principalmente por las principales compañías farmacéuticas del mundo interesadas en la química medicinal y el vertiginoso desarrollo del cómputo. Tuvo gran impacto en la química al cambiar la idea de que para obtener conocimiento en esta ciencia es necesario hacer experimentos. El desarrollo que tiene en la actualidad es muy grande (Cuevas, 2003).

Con esta herramienta, proporcionándole un conjunto de núcleos y el número de electrones de cada molécula, se puede calcular:

- a) Los arreglos geométricos de los átomos que corresponden a moléculas estables y a estados de transición.
  - b) Las energías relativas de varias moléculas.
  - c) Sus propiedades: momento dipolar, polarizabilidad.
  - d) Propiedades espectroscópicas, como corrimientos químicos y constantes de acoplamiento, frecuencias vibracionales, et.
  - e) Propiedades termoquímicas.
  - f) La rapidez con la que un reactivo se transforma en producto (propiedades cinéticas).
  - g) La dependencia de algunas propiedades, como la estructura molecular con el tiempo.
- (Cuevas, 2003).

Un aspecto muy importante a considerar es que la química computacional y las técnicas experimentales tradicionales son complementarias, cada una no son rivales. (Castañeda, 2011).

Para resolver un problema química a nivel teórico, de acuerdo con los postulados de la Mecánica Cuántica, es necesario conocer la función de onda  $\Psi$ , la cual permite calcular la energía y otras propiedades. Mediante los postulados, es posible plantear la ecuación exacta para obtener la energía y la función de onda de un sistema estacionario, que es la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$H \Psi = E \Psi$$

Donde H es el Hamiltoniano del sistema, el operador asociado a la energía (E) y  $\Psi$  la función de onda.

Los métodos empleados para ello cubren situaciones cuasiestáticas y dinámicas. En todos los casos, en tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida

que el tamaño del sistema estudiado crece. Estos métodos se basan en teorías que van desde la alta precisión, pero apropiados para pequeños sistemas, a las buenas aproximaciones, pero apropiadas para grandes sistemas. (Castañeda, 2011).

Para este estudio se utilizó el método semiempírico PM6, estos métodos están basados en el método de Hartree-Fock. Los métodos semiempíricos minimizan el costo computacional al reducir el número de integrales a calcular, ya que introducen algunas simplificaciones como:

1. Considerar sólo los electrones de valencia y no los de capas internas o de "core".
2. Se utilizan sólo conjuntos de base mínima, así como el número mínimo de funciones necesarias, para representar a los electrones.
3. Se realizan aproximaciones para simplificar el número de integrales de traslape y de repulsión interelectrónica por resolver.

(Cuevas, 2003).

Los métodos semiempíricos de la química cuántica como el PM6 son ampliamente utilizados. Estos métodos proporcionan resultados que pueden ser muy precisos en la búsqueda de geometrías de mínima energía y con muy bajo costo computacional comparado con los métodos ab-initio y métodos conocidos como Funcionales de la Densidad (DFT) por las razones ya mencionadas (Fredin, 2016).

La pérdida de precisión debido a estas aproximaciones normalmente se recupera a través de parametrización contra datos experimentales, lo que lleva a un método que es robusto a través de unas amplias gamas químicas (Fredin, 2016).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### 2.1 Hipótesis

Modificando las condiciones de síntesis convencionales de la SBA-15 se podrá obtener una partícula con propiedades texturales, morfológicas y tamaño compatibles para su uso en liberación controlada de fármacos, para funcionalizarla y evaluar estas variaciones al exponerla a plasma sanguíneo.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo General:

Obtener partículas de sílice con propiedades morfológicas y texturales modificadas para liberación de fármacos y superficie biomimética, evaluar los efectos de esta sílice sobre la formación de la corona de proteínas en contacto con plasma humano.

#### 2.2.2 Objetivos Particulares:

- Modificar las condiciones de síntesis de las partículas SBA-15, a fin de identificar condiciones para la obtención de estructuras de menor longitud y mayor área superficial que las estándar.
- Evaluar la factibilidad de recubrir partículas SBA-15 con una capa de liposomas
- Evaluar el efecto de una cubierta de liposomas sobre la formación de la corona de proteínas sobre partículas SBA-15

- Realizar un estudio químico-cuántico de la afinidad electrónica de los fragmentos de proteínas (aminoácidos) con un modelo representativo de la partícula SBA-15.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Metodología Experimental

##### 3.1.1 Síntesis de nanopartículas

La sílice mesoporosa SBA-15 se sintetizó mediante el proceso sol-gel y siguiendo el procedimiento propuesto por Zhao y cols. (1998a,) y por Flodström y Alfredsson (2003), donde se utiliza un surfactante neutro como director de la estructura, el ácido plurónico conocido como “Pluronic P123 o P123”.

El P123 se disuelve en una solución de ácido clorhídrico 4M (75 mL) y agua destilada (112.5 mL) con agitación constante a 35°C. Una vez completamente disuelto el P123, se inicia el proceso Sol-Gel mediante la adición del precursor de la sílice, el TEOS (11 mL). La reacción se realiza por 24 horas a 35°C y con agitación constante.

Transcurrido este tiempo se efectúa el proceso de madurado, colocando el gel obtenido en un recipiente de polipropileno, se tapa y se coloca en la mufla durante 24 horas a 80°C (sin agitación).

Al terminar se deja enfriar y se recupera el sólido por filtración. Se seca a temperatura ambiente y posteriormente a 110°C por 18 horas a una rapidez de calentamiento de 2°C/min.

Finalmente se calcina a 500°C por 4 horas a una rapidez de calentamiento de 1°C/min.

### 3.1.2 *Plasma sanguíneo*

Se obtuvo muestra de sangre (100mL) de 12 voluntarios donadores sanos mediante tubos vacutainer 158vsp con heparina de sodio como anticoagulante.

Se pasaron los fluidos a tubos de centrifuga de 50 mL los cuales están hechos de polipropileno y sus medidas son 17x120mm.

Las muestras se centrifugaron con una centrifuga Hermle Z230A, durante 10 min a 1500rpm, se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu$ m de poro. Los plasmas estériles se reunieron por tipo de donador (género masculino o femenino) y se conservaron en condiciones estériles a -20°C.

La cantidad de proteínas en plasma fue cuantificada mediante el método de Bradford

### 3.1.3 *Incubación de nanopartículas en plasma sanguíneo.*

Se procedió a centrifugar el plasma a 13000g por 3 min. En una placa de cultivo estéril con 24 pozos (Thermo Nunc, # catálogo 142475) se depositaron 500  $\mu$ l de una suspensión de PNe de la SBA-15 (2 mg/ml en PBS) por pozo; enseguida, las PNe fueron expuestas a plasma (500  $\mu$ l del plasma centrifugado) durante 24 hs a 37°C. Se prepararon PNe controles, incubadas con PBS. Este procedimiento se realizó en condiciones estériles, utilizando material esterilizado en autoclave y manipulando dentro de un gabinete de bioseguridad.

#### *3.1.4 Preparación de la solución de extracción de proteínas*

Se realizó una solución de acuerdo con Philip et al (2015), con dodecil sulfato de sodio (Sigma # catálogo 436143-100G) al 2% con 100mM de ditioneitol (Sigma # catálogo D0632).

#### *3.1.5 Análisis de biocorona*

Al término de la incubación con plasma, las PNe fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Para eliminar proteínas del medio de incubación, las PNe se lavaron 3 veces con PBS, eliminando los lavados por centrifugación a 2500rpm durante 5 minutos. Posteriormente, el sedimento fue incubado con solución de extracción de proteínas. Las PNe se conservaron suspendidas en 500  $\mu$ l de PBS a 4°C hasta análisis por microscopía electrónica o hasta extracción de proteínas.

Para extraer las proteínas, las PNe fueron centrifugadas para eliminar el PBS, e incubadas en 500  $\mu$ l de la solución de extracción de proteínas, en baño María a 70°C durante 1 hora. Enseguida, se recuperó el sobrenadante, que contenía las proteínas extraídas, para su posterior análisis.

#### *3.1.6 Cuantificación de proteínas de la biocorona*

El extracto de proteínas de la biocorona se analizó por el ensayo de ninhidrina, el cual se basa en la reacción colorimétrica de la ninhidrina con los grupos  $-NH_2$  de los aminoácidos que constituyen la proteína. La reacción se realiza a un pH entre 4 y 8, obteniéndose una coloración que varía de azul a violeta intenso, con un máximo de absorción a 575nm (Dohmae N., 2011).

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

Se tomaron muestras de PNe de sílice, PNe de sílice con biocorona, PNe de sílice con liposomas y PNe de sílice con liposomas y biocorona, todas las muestras fueron diluidas, (concentración original 1 mg de lípidos/ml) en agua (1/500, 1/1000, vol/vol). Las PNe de sílice 1:300.

Las muestras fueron depositadas sobre una rejilla de cobre, malla 200, recubierta con Formvar/carbón (Cat. 01800-F de Ted Pella, Inc.). Se utilizó acetato de uranilo al 2% como agente de tinción. Para ello, las rejillas fueron incubadas en la solución de acetato de uranilo a 80°C durante 10 minutos dentro de placas Mazzini, y lavadas con agua desionizada. Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio Hitachi SU8230.

### *3.1.8 Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDX)*

La morfología superficial de las partículas de sílice, las partículas con biocorona, funcionalizadas y funcionalizadas con biocorona se estudió mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Hitachi, modelo SU8230. Se prepararon 4 muestras (una por cada tipo de partícula) diluidas 1:300, se colocaron en un soporte de cobre, y se secaron a vacío. Las condiciones de las muestras analizadas fueron 1.0kV-D 3.0mm X 100k SE(T).

Asimismo, el microscopio permite llevar a cabo un análisis semi cualitativo de la variación composicional gracias al análisis de la intensidad de los electrones retrodispersados (EDS), que se aplicó también a cada una de las muestras mencionadas.

### 3.1.9 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman fue realizada en un espectrómetro Raman dispersivo Senterra (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), acoplado a un microscopio Olympus BX. Se utilizó una fuente láser de 632.8 nm. Las muestras, en solución, fueron secadas a vacío en un porta-muestras sin ningún tratamiento previo.

### 3.1.10 Hidrofilización de partículas de sílice

Para obtener PNe con una superficie hidrofílica, se realizan incubaciones en una solución alcalina, seguida por una solución ácida, de acuerdo con el método de Liu et al (2009). Primeramente se preparan las soluciones: la solución A con 4%  $\text{NH}_4\text{OH}$  y 4%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; y solución B con 0.4 M  $\text{HCl}$  y 4%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se colocan 25 mg de PNe de sílice en un tubo de centrifuga y se incuban a  $80^\circ\text{C}$  por 10 minutos con 10 mL de la solución A. Se centrifuga por 10 minutos a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se lava con 1 mL de agua inyectable (PiSa Farmacéutica). Se centrifuga por 10 minutos a 4000 rpm, nuevamente eliminando el sobrenadante. Se incuba a  $80^\circ\text{C}$  con 10 mL de solución B. Se centrifuga por 10 minutos a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se lava con 1 mL de agua inyectable. Se centrifuga por 10 minutos a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante. Las PNe son resuspendidas en agua y conservadas a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.1.11 Preparación de liposomas

Se hizo uso del lípido zwitteriónico fosfatidilcolina de yema de huevo, de Sigma, primeramente se prepararon liposomas multilaminares grandes (MLV, del inglés Multilamellar Vesicle) con una concentración de 2.5 mg lípidos/mL. Los lípidos fueron disueltos en una mezcla de cloroformo/metanol (9:1 vol/vol), en un vial de centelleo, y secados en atmósfera de nitrógeno. Las alícuotas de lípidos fueron conservadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta antes de preparar los liposomas. Para la preparación de

liposomas, los viales fueron llevados a temperatura ambiente y rehidratados con solución tampón de fosfatos (PBS) o con agua destilada a 50°C, pasando la muestra a través de una aguja calibre 21 hasta obtención de una suspensión homogénea. Los MLV resultantes fueron pasados 10 veces a través de membranas con poros de 400nm, a fin de obtener liposomas unilaminares. Los liposomas fueron conservados en atmósfera inerte a 4°C.

### *3.1.12 Funcionalización de partículas con liposomas*

A las PNe SBA-15 hidrofilizadas, resuspendidas en 2.5 mL de PBS estéril se agregaron 2.5 mL de liposomas unilaminares (a una concentración de 1 mg/ml). La mezcla se agitó cuidadosamente y se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 minutos, agitando ocasionalmente. Se centrifugó la preparación a 4000 rpm por 1 minuto, después de lo cual se desechó el sobrenadante, y las partículas fueron resuspendidas en 2.5 mL de PBS estéril.

## 3.2 Metodología Teórica

Utilizando el paquete de programas Gaussian 09 (28), se construyó un modelo representativo para el material nanoestructurado de la SBA-15, en donde se utilizó el método semiempírico PM6 dejando la molécula interactuante libre, así como la región vecina a ella del modelo de la SBA-15. El efecto de disolvente es tomado en cuenta mediante el modelo de polarización continua, tomando el agua como disolvente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Tamaño y morfología de las partículas nanoporosas SBA-15

El método para sintetizar partículas mesoporosas SBA15 fue desarrollado por Stucky *et al.*, 1994. En este trabajo, ese método se modificó a fin de obtener PNe de menor tamaño y menor diámetro de poro.

En una síntesis típica, el copolímero de tres bloques se disuelve en una solución de agua y HCl 4M (HCl, J.T. Baker, 36.6%) con agitación constante y a una temperatura de 35°C. Posteriormente, se adiciona a la solución anterior la cantidad requerida de TEOS (11mL) y la reacción se mantiene a 35°C y con agitación constante durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se transfiere a un bote de polipropileno y se calienta a 80°C durante 24 h sin agitación. Después de la síntesis, el sólido obtenido se recupera por filtración, se lava varias veces con agua destilada, se seca a 100°C y finalmente se calcina a 500°C durante 6 h para eliminar el molde orgánico.

La modificación que se realizó a la síntesis típica consistió en agregar menor cantidad de TEOS (8mL).

En la Figura 10 se muestra la morfología de una partícula de SBA-15 nanoestructurada obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.

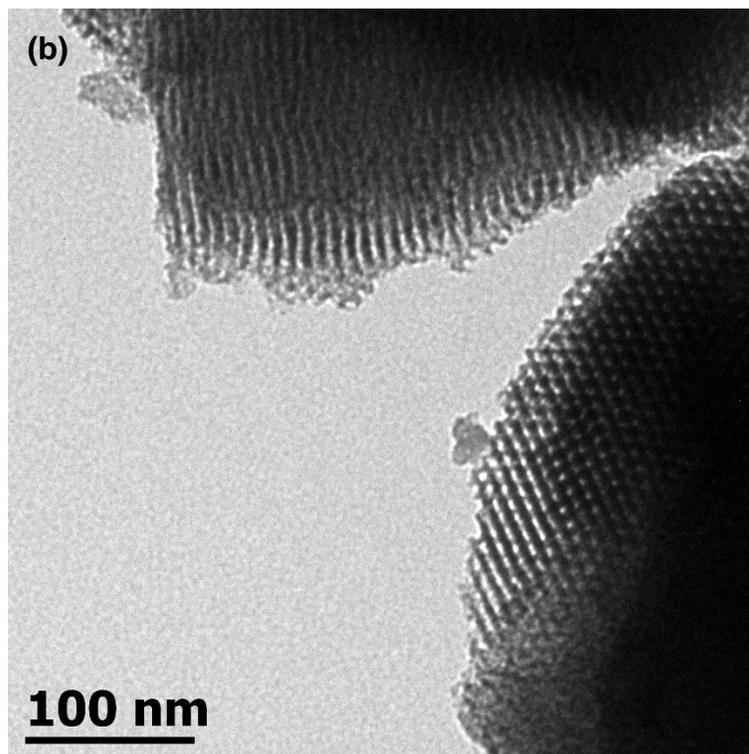
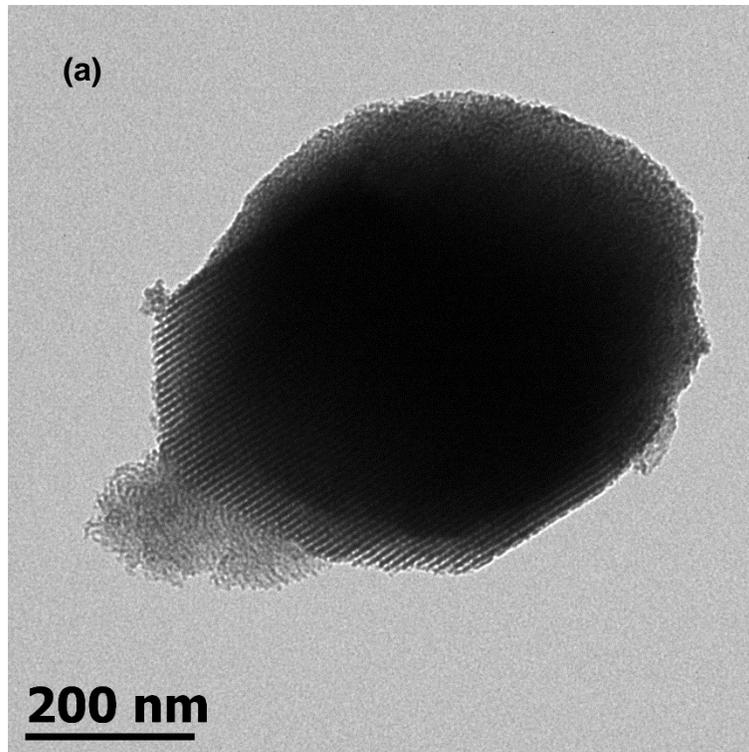
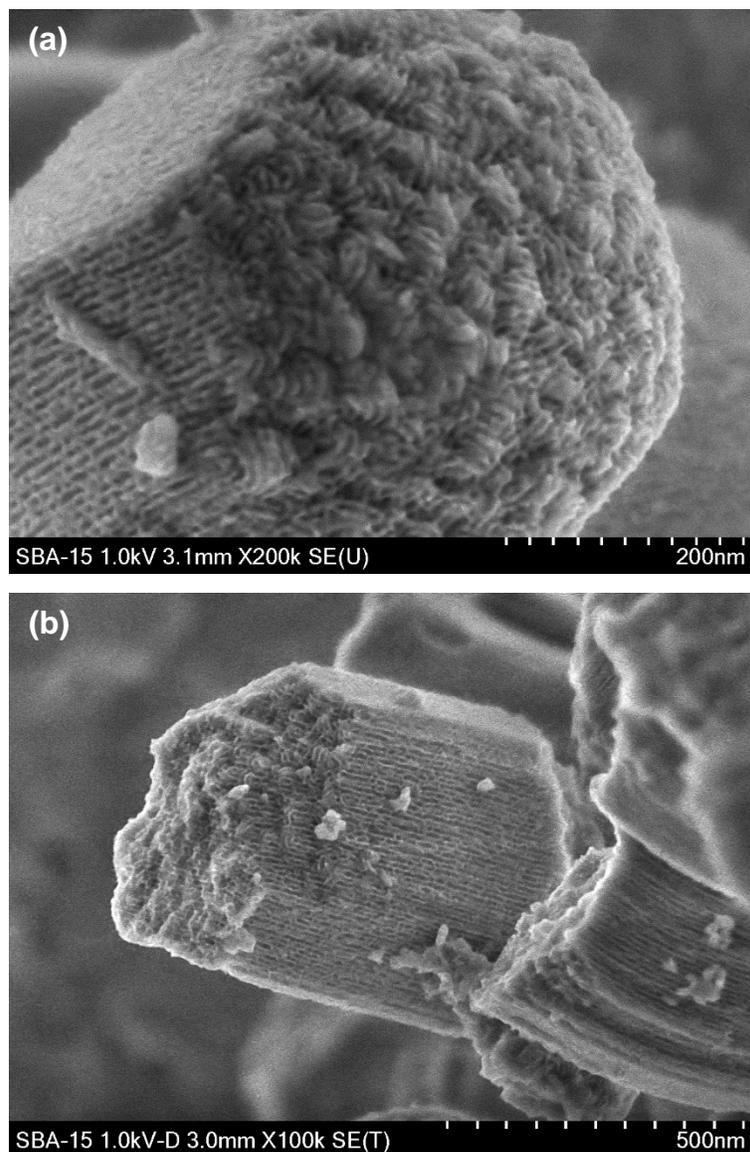


Figura 10. Imágenes obtenidas por TEM de las partículas nanoporosas SBA-15, (a) 200 nm, el tamaño aproximado de PNe es de 300nm con forma semi-esférica; (b) 100 nm.

Como se observa en las micrografías el tamaño de la partícula (NPe) es menor que en la síntesis tradicional, siguiéndose observándose la porosidad característica de la partícula. Cabe mencionar que la morfología obtenida PNe no se ve modificada por el cambio de tamaño. De la Figura 10, se observa una morfología característica de este tipo de materiales hechos a base de sílice y crecimiento ordenado.

Estos cambios en la tamaño de las PNe fueron también observados mediante microscopía electrónica de barrido, como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Imágenes SEM de las partículas obtenidas nanoporosa SBA-15. (a) Micrografía a 200 nm; (b) Micrografía a 500 nm.**

Los análisis por SEM muestran los poros característicos de partículas SBA-15 y confirman el tamaño observado por el análisis TEM. Se observa del análisis una estructura nanoporosa con poros verticales y transversales, así como un arreglo hexagonal de la partícula formada por la SBA-15. Los poros verticales se encuentran paralelos unos con otros, mostrando poros bien definidos en el material. El tamaño de la partícula es más corto que la reportada en, lo cual muestra un cambio en la morfología global de la partícula. Ver Figura 12

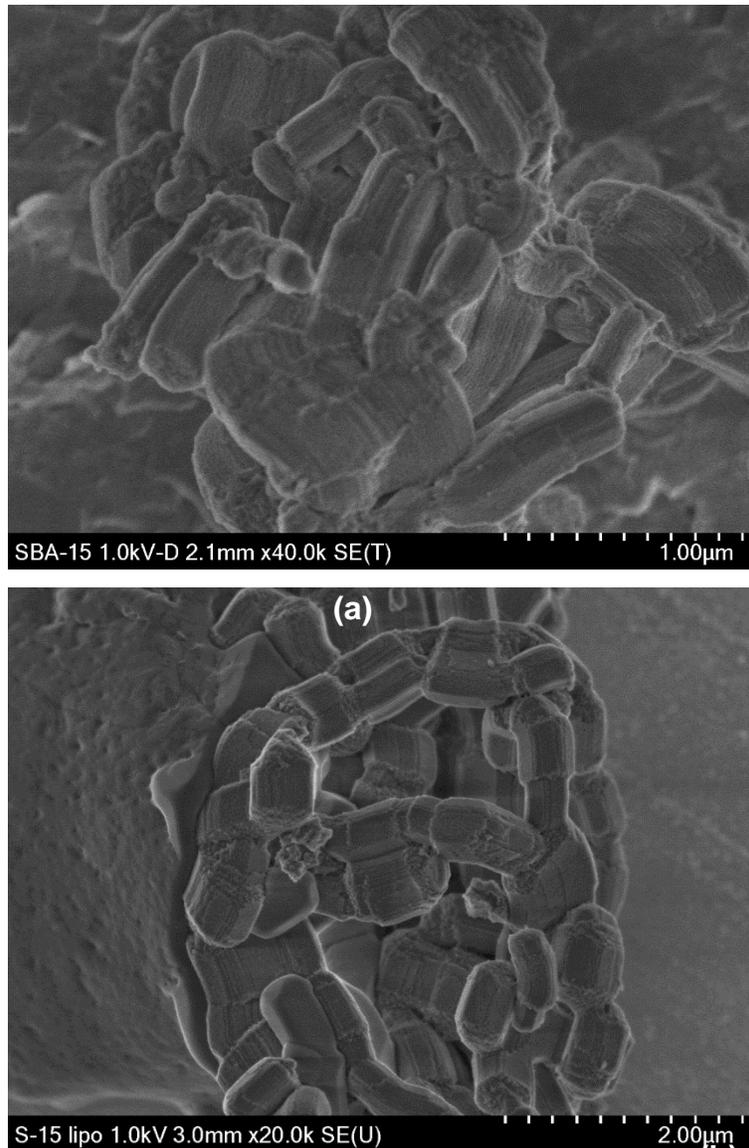


Figura 12. Diferencia entre tamaño de la partícula SBA-15. a) Síntesis tradicional, b) síntesis del estudio.

## 4.2 Análisis del tamaño de poros y del área superficial interna de las partículas SBA-15

Las propiedades texturales del material de sílice mesoporoso SBA-15 se determinaron mediante las isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$  a 77 K (Figura 12). La distribución del tamaño de poro del material de sílice mesoporoso SBA-15 se calculó con los datos de la isoterma de desorción mediante el método B.J.H. (Figura 13). El área específica de la muestra se calculó de acuerdo con la ecuación de B.E.T. (Brunauer-Emmet-Teller). El volumen total de poro se estimó a partir de la cantidad de nitrógeno adsorbido a la presión relativa de 0.98.

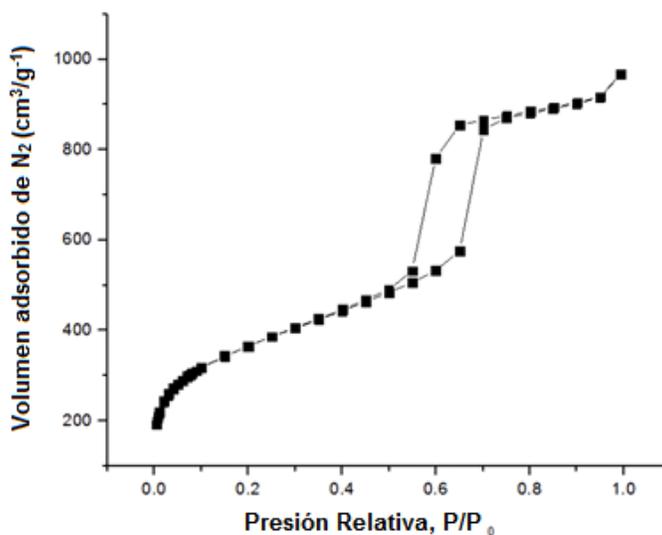
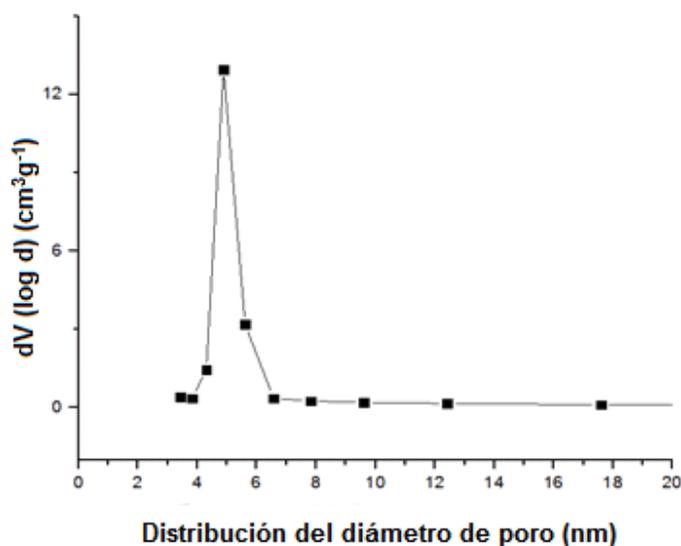


Figura 13. Isotherma de adsorción-desorción de  $N_2$  a 77°K de las partículas de sílice obtenidas



**Figura 14. Distribución del tamaño de poro de las partículas SBA-15 obtenidas para este estudio.**

De estos análisis se puede concluir que las propiedades texturales de la SBA-15 sintetizada son: Área superficial = 1267.162 m<sup>2</sup>/g, Volumen de poro = 1.269 cm<sup>3</sup>/g y Diámetro de poro = 4.881 nm.

De esta manera, se puede comprobar que los materiales nanoestructurados formados por la sílice en este caso, genera importantes ventajas estructurales, ya que confiere tamaños de partículas adecuados para el organismo humano, además de una alta porosidad que permitiría la encapsulación de grandes cantidades de moléculas (farmacos o nanopartículas).

Un aspecto importante a remarcar es que este tipo de materiales nanoestructurados pueden ser diseñados o confeccionados de manera funcional. Esto es, confeccionados a la medida requerida con la morfología adecuada. Estudios reportados para la sílice nanoestructurada muestran que estos materiales son compatibles con el cuerpo humano y se degradan en un tiempo corto. (Slowing et al., 2007). Razón por la cual resultan ser atractivos para aplicaciones biológicas.

### 4.3 Preparación de liposomas unilaminares zwitteriónicos

Los liposomas unilaminares zwitteriónicos fueron preparados de vesículas unilaminares de tamaño similar a las partículas de sílice mediante autoensamblaje de un fosfolípido zwitteriónico, la fosfatidil colina de yema de huevo. El lípido fue depositado en solución orgánica (cloroformo-metanol), y después de evaporar el solvente bajo corriente de nitrógeno, se agregó una solución amortiguadora a un pH de 7.4 (PBS). Los liposomas de múltiples láminas formados fueron filtrados a través de una membrana de 400  $\mu\text{m}$  de poro, a fin de preparar las vesículas de una sola lámina por extrusión (J. Frisken, 2003).

Al analizar los liposomas por espectroscopía Raman se observaron las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales de fosfatidilcolina. En la figura 14 se muestra el espectro Raman de los liposomas unilaminares preparados en donde se observan las señales de los grupos  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}=\text{C}$  y  $\text{C}-\text{H}$ , característicos de la fosfatidilcolina.

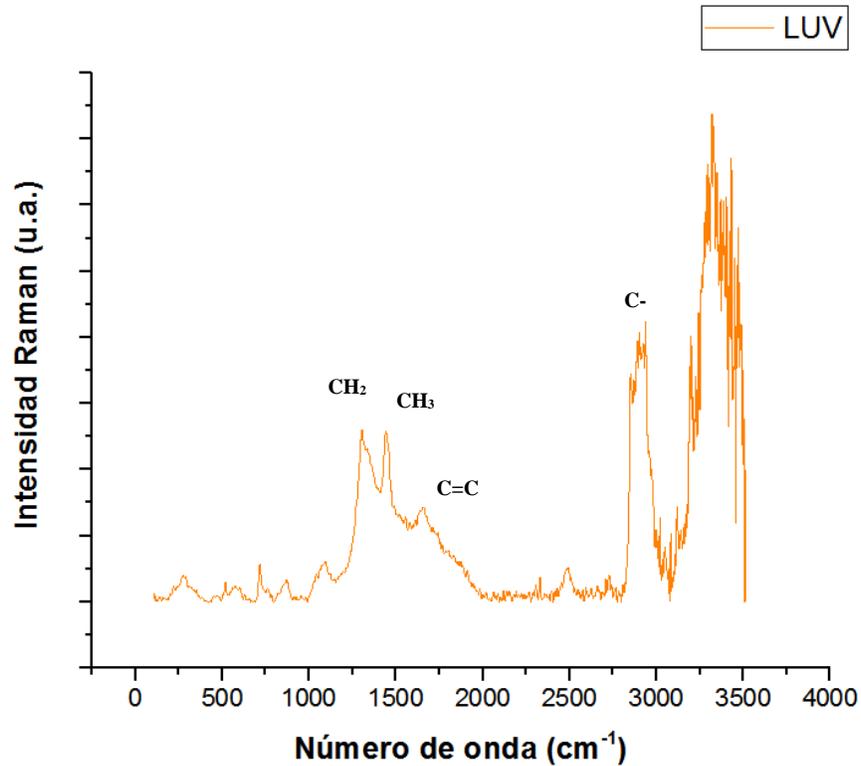


Figura 15. Espectro Raman de liposomas unilaminares zwitteriónicos.

#### 4.4 Preparación del híbrido SBA15 con liposomas zwitteriónicos

Las nanoestructuras híbridas están conformadas por las partículas mesoporosas de sílice SBA-15 y los liposomas zwitteriónicos que se obtuvieron por autoensamblaje.

Previamente a la formación del híbrido a las partículas de sílice se le hidrofiliizó su superficie para mejorar su interacción con recubrimientos hidrofílicos (Liu y colaboradores, 2009).

Después el autoensamblaje de membranas lipídicas sobre la superficie de la sílice fue realizado mediante incubación de las partículas con los liposomas zwitteriónicos. La unión de estas estructuras se logra gracias a interacciones no covalentes.

En la figura 15 se muestran los espectros Raman de las partículas nanoporosas de sílice SBA-15, de los liposomas zwitteriónicos unilaminares (LUV) y de la partícula híbrida de SBA-15 con liposomas zwitteriónicos. Las bandas características (Kocisová et al., 2013; Socrates, 2001) de estas muestras se describen conforme a sus tipos de vibración en la Tabla V.

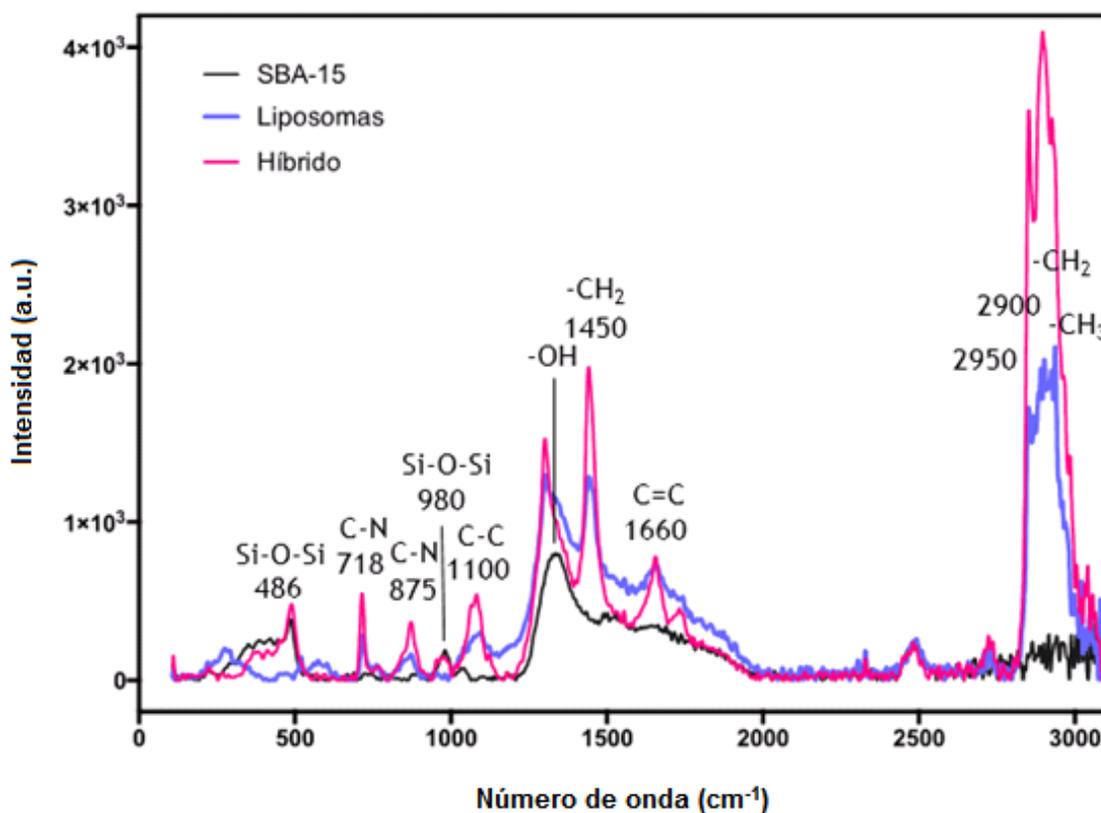
**Tabla 5 Bandas características de cada material analizado por espectroscopía Raman**

Banda	Número de onda [cm <sup>-1</sup> ]	Tipo de vibración
1	~486	Si-O-Si
2	~786	
3	~980	
4	1330	Grupo Hidroxilo O-H
5	~1450	Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>
6	~1655	Estiramiento C=C
7	~2850	Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>
8	~2900	
9	~2935	

En el caso de las partículas nanoporosas de sílice SBA-15 se encontraron las bandas de absorción de enlaces de silicio y oxígeno (Si-O-Si) en su espectro característico.

En el espectro de liposomas unilaminares zwitteriónicos, como ya se mencionó, se observan las señales de los grupos  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}=\text{C}$  y  $\text{C}-\text{H}$ , que forman parte de la estructura química de la fosfatidilcolina, componente de los liposomas hechos en este estudio.

Así mismo, en el caso de la estructura híbrida, se observan las bandas de absorción características de ambas de sus partículas componentes (SBA-15 y liposomas de fosfatidilcolina).



**Figura 16. Espectros Raman de las partículas nanoporosas de sílice SBA-15, de los liposomas zwitteriónicos unilaminares (LUV) y de la partícula híbrida de SBA-15 con liposomas zwitteriónicos**

Este análisis proporcionó una evidencia de la formación del híbrido SBA-15 con liposomas zwitteriónicos al encontrar el aumento en la intensidad de señal de manera general en casi todas las bandas características tomando como referencia a ambos componentes (SBA-15 y liposomas zwitteriónicos). Por lo que el aumento

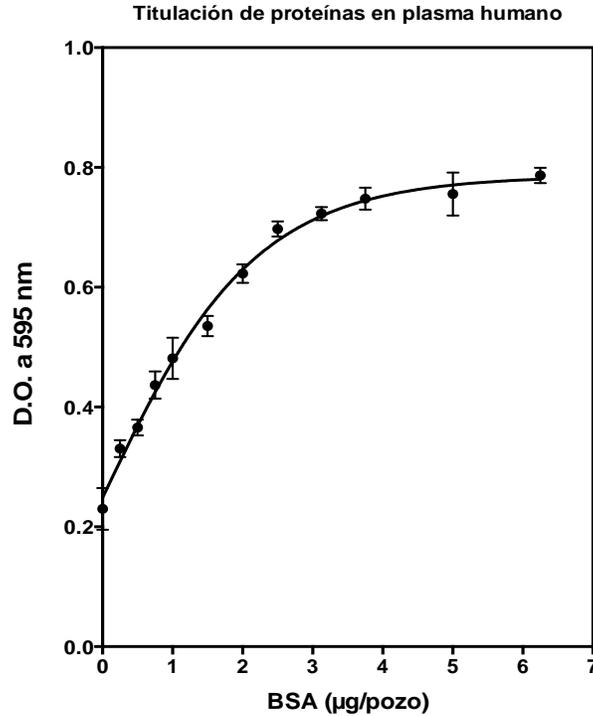
en la señal representa un aumento de vibraciones rotaciones en el sistema indicando que existe la formación de una mayor cantidad de interacciones entre para el compuesto híbrido.

Es de hacer notar que para el caso del compuesto híbrido, se pierde la banda de -OH del siloxano, indicándose que ese grupo fue posiblemente ocupado en enlaces de puente de hidrógeno con los grupos polares de los liposomas, indicando que la interacción de entre ellos disminuye, mientras que otras se tornan más intensas y definidas. Se puede decir que la interacción de lo liposomas zwitteriónicos con la PNe es significativa pues algunas de las interacciones formadas continúan presentes en dicho sistema estabilizándolo.

#### 4.5 Obtención del plasma

El plasma humano contiene 334 proteínas, las más abundantes son la albúmina sérica humana, proteína de 66 kDa, y las inmunoglobulinas, proteínas secretadas por glóbulos blancos.

El plasma fue obtenido en condiciones asépticas por centrifugación de sangre en presencia de heparina de sodio como anticoagulante. El sobrenadante fue titulado por el método de Bradford para cuantificación de proteínas, que es un método colorimétrico. Para ello, se preparó una curva estándar de cantidades crecientes de una proteína estándar, la albúmina sérica bovina (BSA). En la Figura 16 se muestra la densidad óptica obtenida con esta curva patrón.

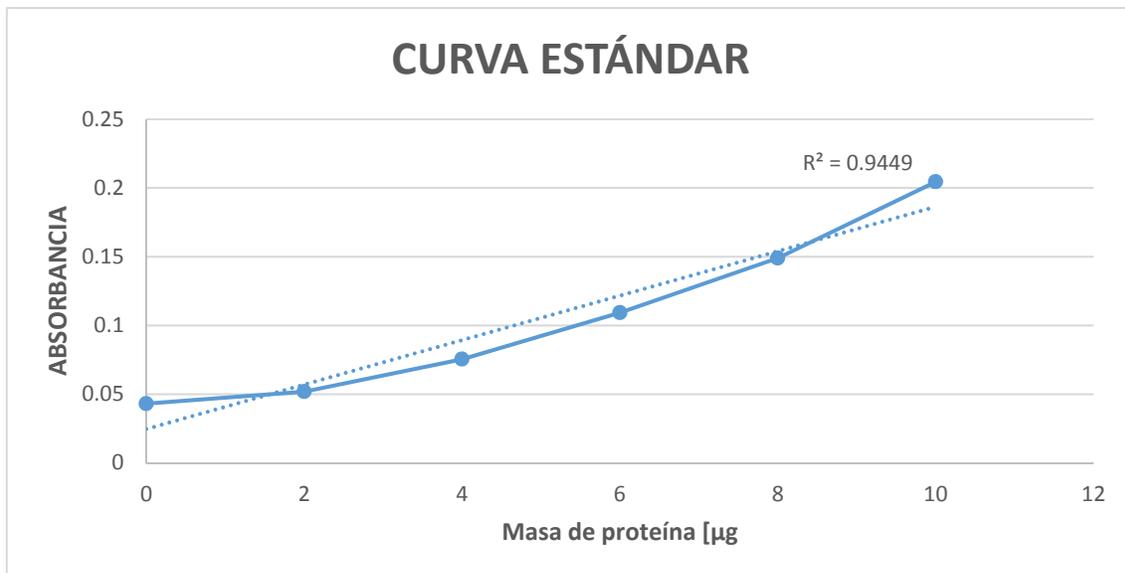


**Figura 17. Curva patrón de BSA de la determinación de proteínas del plasma por el método de Bradford**

Al interpolar las densidades ópticas de las reacciones obtenidas con las muestras de plasma se encontró que el lote de plasma 1 (varones) tenía una concentración de 35  $\mu\text{g}$  proteína/ $\mu\text{l}$  plasma, y el lote de plasma 2 (mujeres) una concentración de 29.8  $\mu\text{g}$  proteína/ $\mu\text{l}$  plasma.

#### 4.6 Cuantificación de proteínas por el método de la Ninhidrina

Se realizó una cuantificación de proteínas de la biocorona obtenida con liposomas sin funcionalizar y otra para las partículas funcionalizadas, la curva del experimento se aprecia en la figura 18. Por el método se detectó que se tiene 1.240 mg proteína/mg SBA-15 de proteína en la partícula sin funcionalizar y 1.373 mg proteína/mg SBA-15 de proteína en la partícula funcionalizada con lípidos zwitteriónicos.



**Figura 18. Curva patrón de BSA de la determinación de proteínas de las partículas por el método de la Ninhidrina**

#### 4.7 Análisis térmico de la partícula

Se realizó un análisis térmico de la partícula cuando es expuesta a plasma sanguíneo, el resultado arrojó que la partícula tiene adherido un material que se degrada rápidamente a 58°C, este se relaciona con las proteínas pues son estructuras muy sensibles al calor.

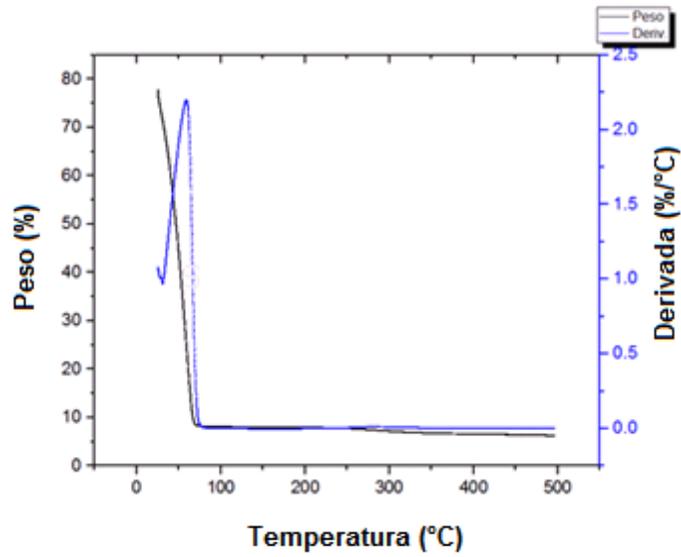


Figura 19 Gráfica del TGA hecho a la partícula incubada en plasma

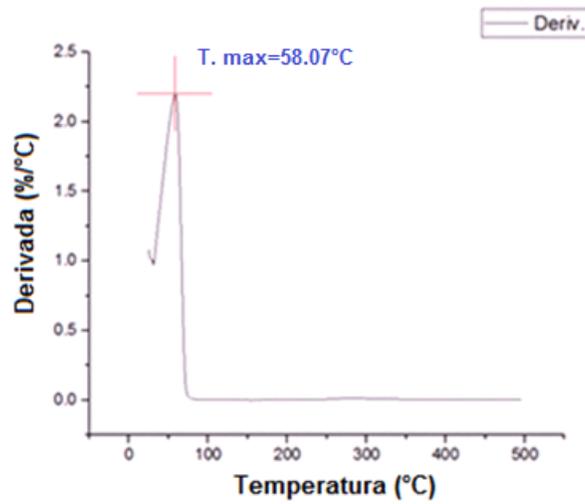


Figura 20. Gráfica del DTG hecha a la partícula incubada en plasma.

De acuerdo con el análisis térmico de la partícula funcionalizada, el resultado arrojó que la partícula tiene adherido un material que se degrada a 70.9°C.

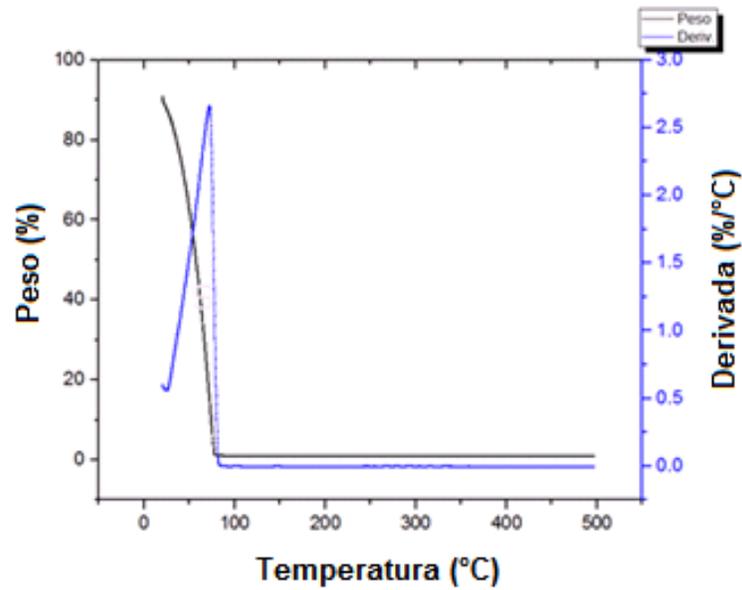


Figura 21. Gráfica del TGA hecha a la partícula funcionalizada

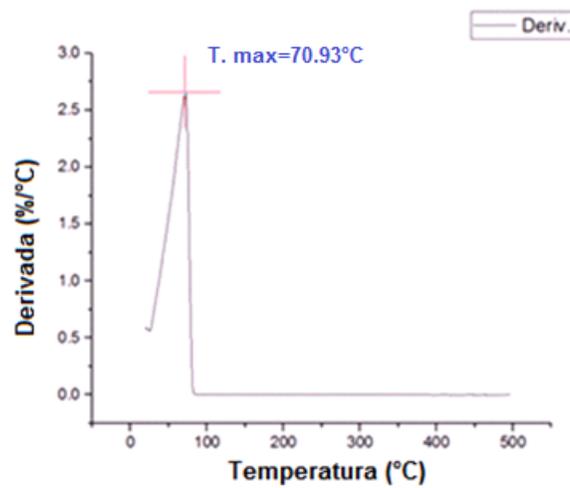


Figura 22. Gráfica del DTG hecha a la partícula funcionalizada

El tercer análisis térmico fue de la partícula funcionalizada y expuesta a plasma sanguíneo, el resultado indica en esta partícula que tiene adherido un material que se degrada a 65.04°C.

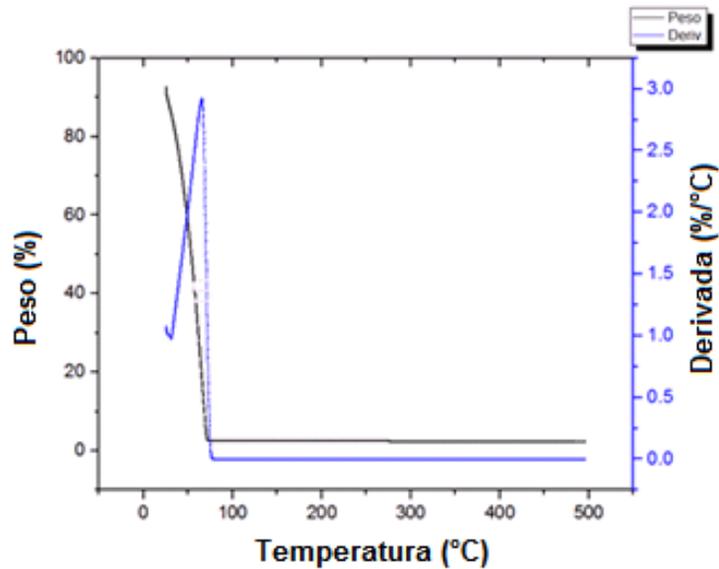


Figura 23. Gráfica del TGA hecha a la partícula funcionalizada e incubada en plasma

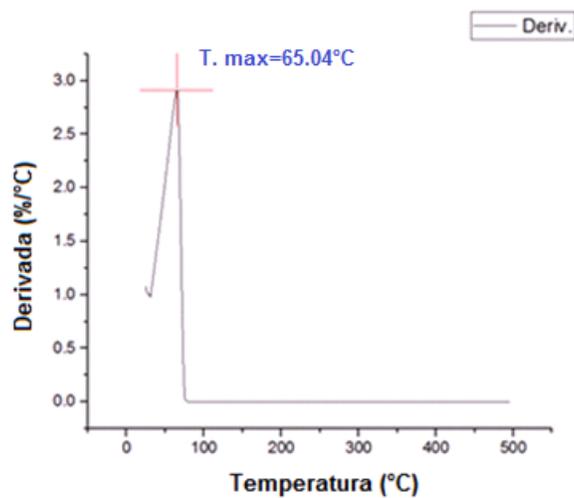


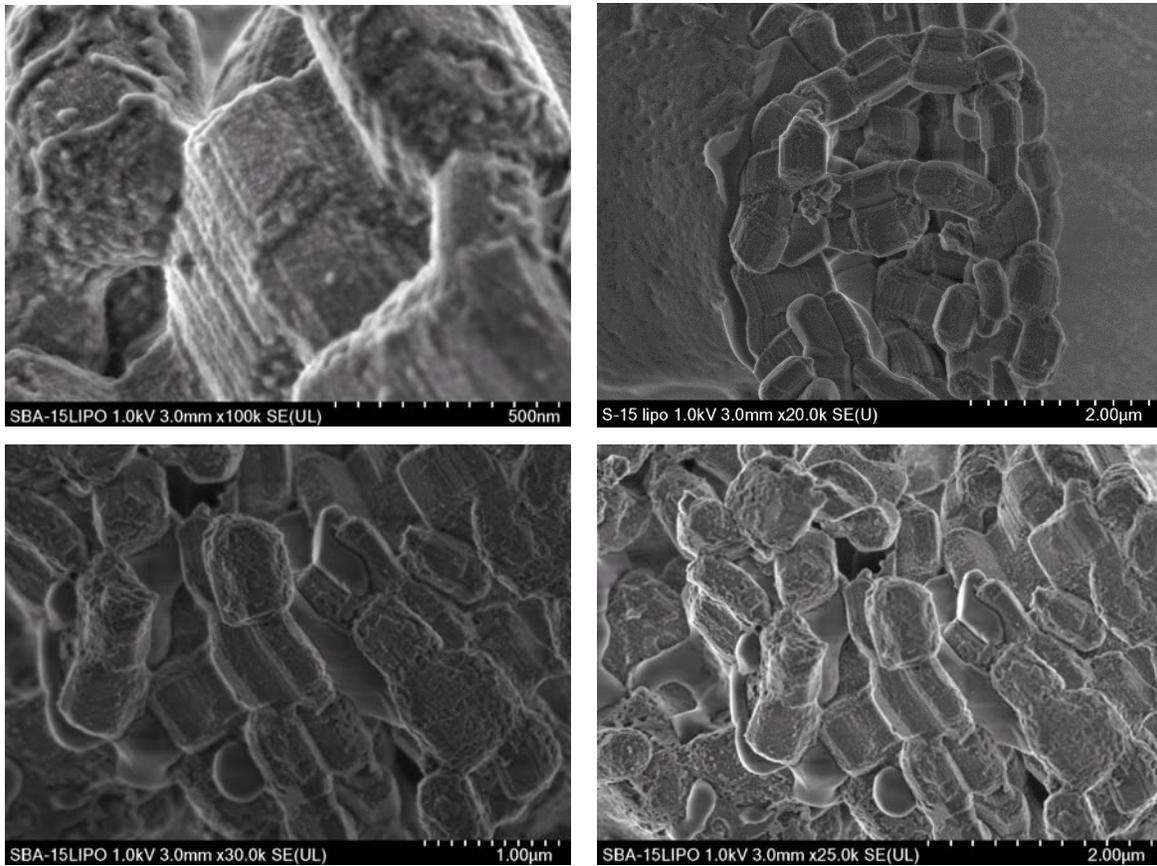
Figura 24. Gráfica del DTG hecha a la partícula funcionalizada e incubada en plasma

Estos resultados muestran entonces un cambio en la temperatura de degradación de las moléculas orgánicas adheridas a la PNe, obteniéndose que para la partícula expuesta a plasma sanguíneo la temperatura de degradación es de 58 °C y para la partícula funcionalizada con lípidos es de 70.9 °C, mientras que para la funcionalizada e incubada en plasma es de 65.04°C. Estos resultados se pueden

relacionar con la fuerza de interacción entre los diferentes sistemas, en la cual podría decirse que la PNe interacciona más fuertemente con el liposoma pues se obtiene un aumento de temperatura en TGA, mientras que para la funcionalizada y expuesta al plasma sanguíneo muestra una disminución en la temperatura, lo que indicaría que las interacciones de la biocorona formada con la PNe disminuyeron por la presencia del plasma sanguíneo.

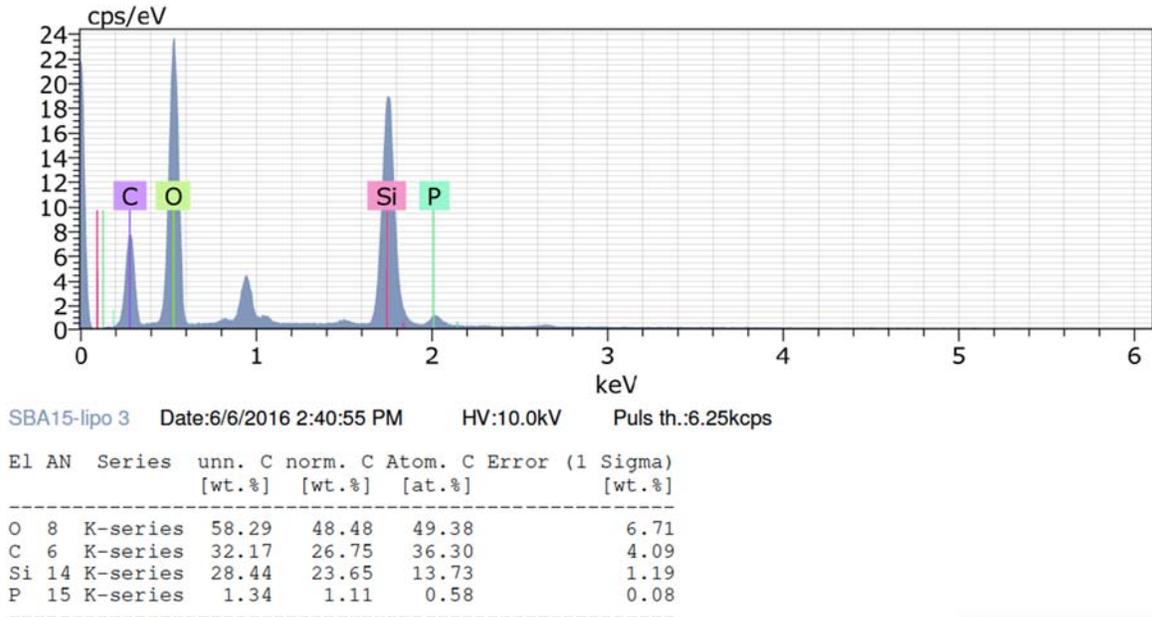
#### 4.8 Análisis elemental (SEM - EDX) de las partículas mesoporosas SBA-15 con capa biomimética

Se obtuvieron micrografías en SEM para poder observar la adherencia de los liposomas en las partículas de sílice. En estas se observan que las partículas poseen una capa que obstaculiza observar las propiedades texturales normales de la partícula, además que esta capa no es homogénea (Figura 24).



**Figura 25. Imágenes de SEM de la partícula SBA-15 recubierta por liposoma**

El análisis por EDX nos muestra la presencia de los elementos presentes en la muestra, el Si de las partículas y otros elementos como el P, C que corresponde a los elementos de los liposomas.



**Figura 26. Análisis elemental (SEM-EDX) de las partículas mesoporosas SBA-15 con capa biomimética.**

#### 4.9 TEM con tinción negativa (acetato de uranilo)

Para poder apreciar la presencia de liposomas y de proteínas se realizó una tinción de acetato de uranilo a todas las estructuras obtenidas, de esta manera se obtuvieron las siguientes micrografías:

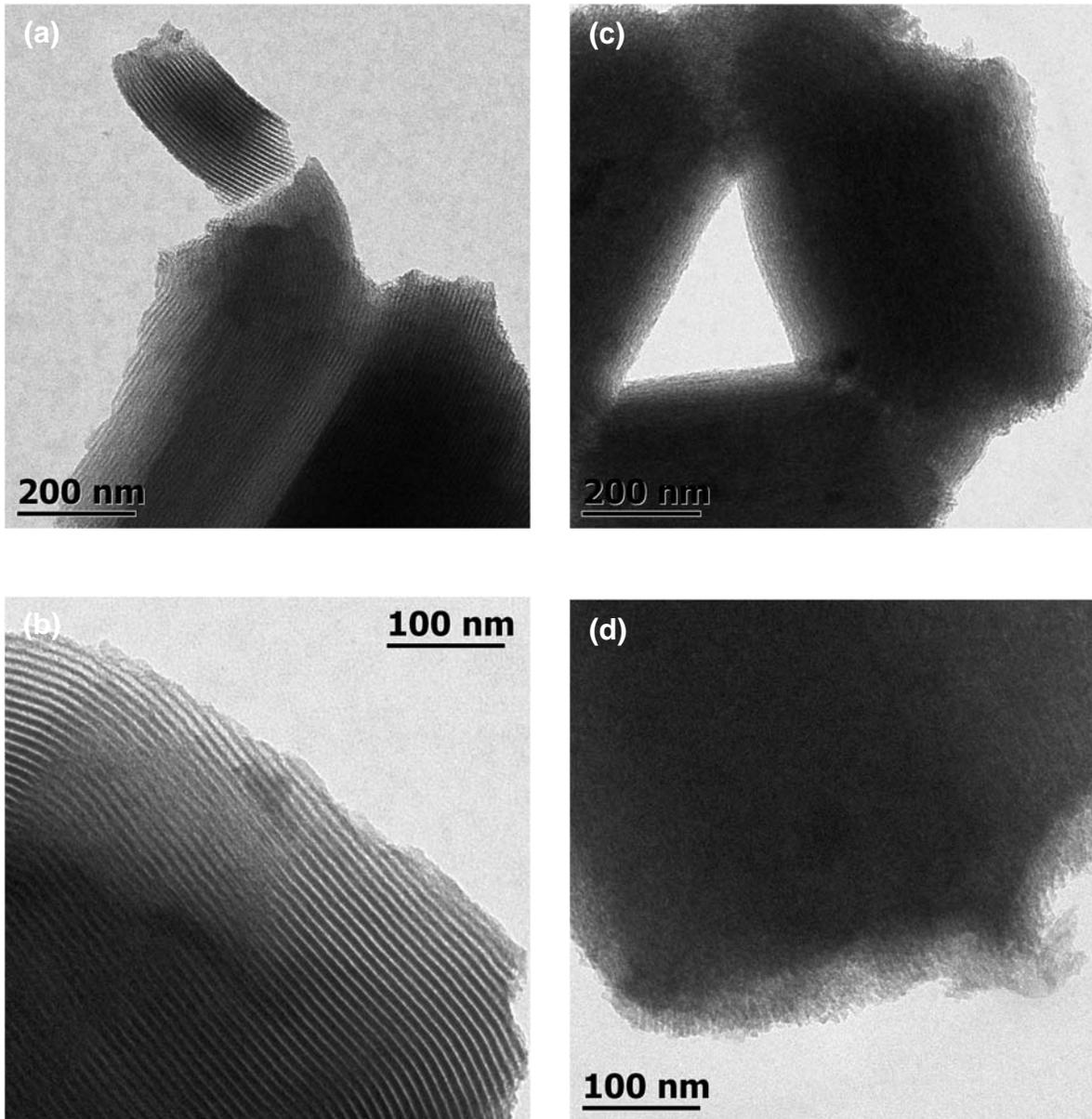
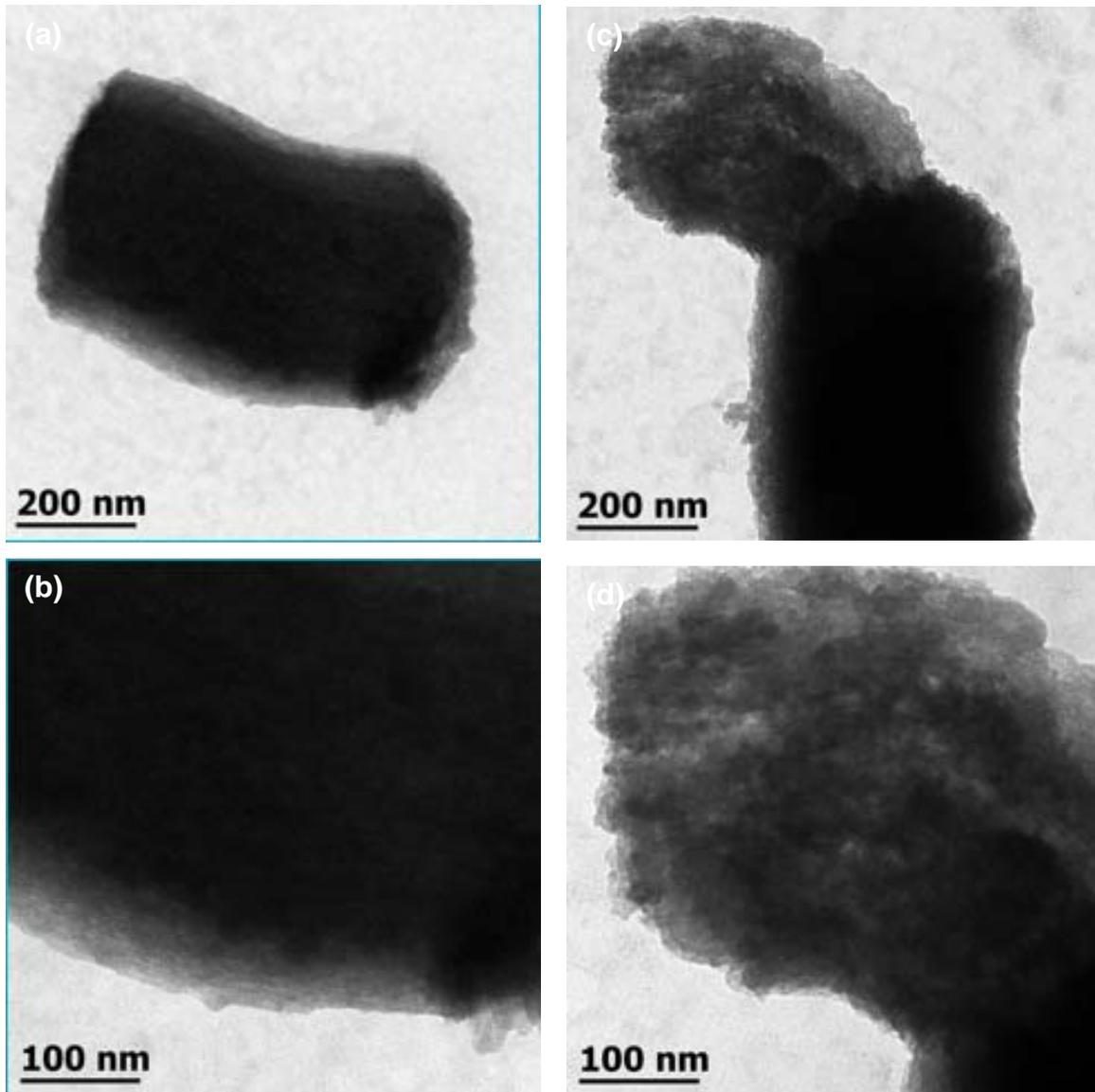


Figura 27. TEM con tinción, a) y b) partículas sin funcionalizar; c) y d) partículas funcionalizadas.

Las micrografías de las figuras 27 a) y 27 b) muestran la porosidad de la partícula y su ordenamiento muy claramente, mientras las micrografías de la 27 c) y d) que muestran la partícula funcionalizada, se aprecia la forma de la partícula, sin embargo no clara su porosidad y ordenamiento, deduciéndose que estas partículas poseen cierto recubrimiento hecho por los lípidos.



**Figura 28.**TEM con tinción de las partículas, a) y b) partículas sin funcionalizar y expuestas a plasma; c) y d) partículas funcionalizadas y expuestas a plasma.

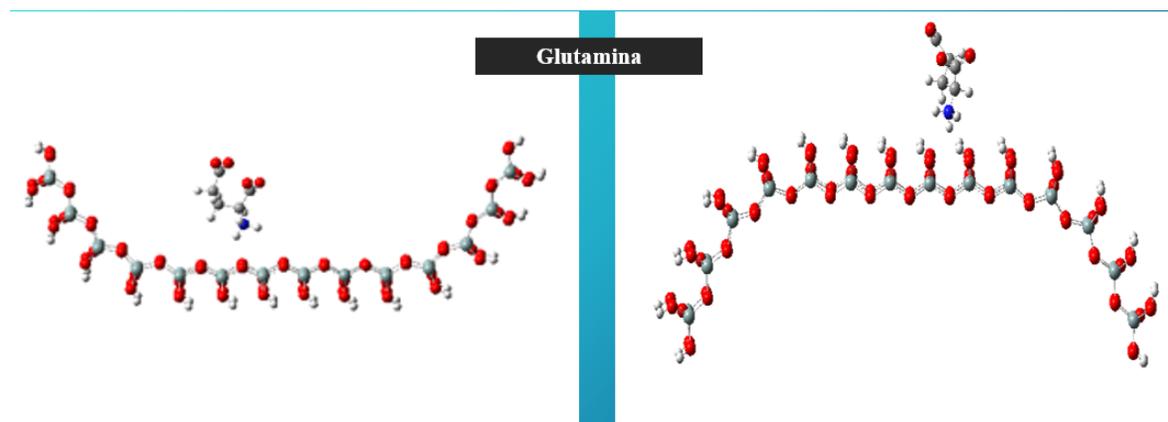
Las figuras 28 a) y b) muestra las micrografías de la partícula expuesta a plasma sanguíneo, en estas no es posible distinguir la porosidad y ordenamiento de los poros por la presencia de cierta capa con cierto relieve producido por el plasma sanguíneo, deduciéndose que es la biocorona. En la figura 28 c) y d) se muestra la micrografía de la partícula funcionalizada y expuesta a plasma sanguíneo, en esta ocasión el cambio en la partícula es el más notorio, pues modificó la forma de la partícula y no es posible distinguir la porosidad, en vez de ello sólo se aprecia un

relieve irregular que la recubre, se llega a la conclusión que la funcionalización más la capa de proteínas del plasma que originó la biocorona es lo que se aprecia a ver y por poseer doble capa el cambio en la partícula es el mayor en comparación con las otras partículas, además que la capa con relieve observado es de mayor tamaño en comparación con la partícula de la 28 a) y b), deduciéndose que son la mayor cantidad de proteínas de la biocorona mostrada por la cuantificación de proteínas.

#### 4.10 Simulación molecular del sistema

Se creó un pequeño fragmento del poro de la SBA-15 y se hizo interaccionar con algunos aminoácidos de las proteínas, esto con la finalidad de obtener información fundamental del cómo se adhieren éstas a la partícula, así como, obtener algunos aspectos importantes relacionados con las interacciones cuando las moléculas se encuentran cargadas, neutras o polarizadas. De la simulación utilizando el método PM6 se obtuvo las siguientes energías de estabilización:

$$\Delta E (\text{estabilización}) = E(\text{Gluta-arriba}) - E(\text{Gluta-abajo}) = -3.73 \text{ kJ mol}^{-1}$$



**Figura 29. Simulación de glutamina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15**

$$\Delta E (\text{estabilización}) = E(\text{Argi-arriba}) - E(\text{Argi-abajo}) = -26.633 \text{ kJ mol}^{-1}$$

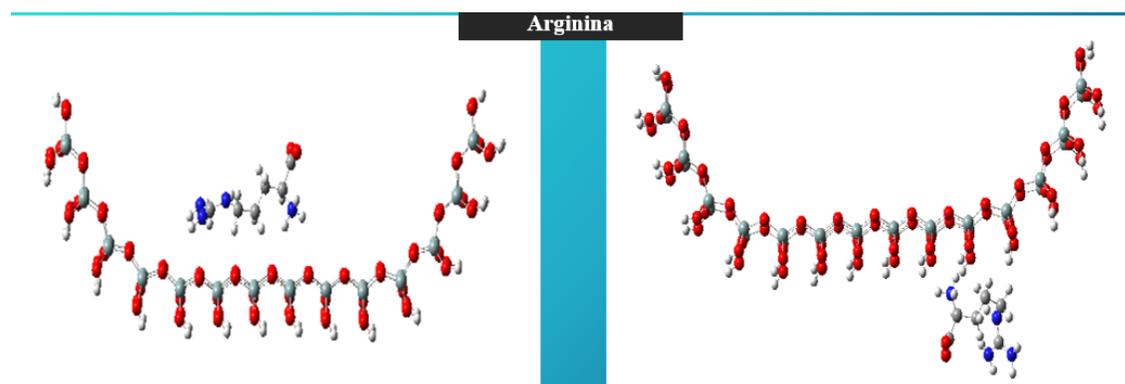


Figura 30. Simulación de arginina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15

$$\Delta E (\text{estabilización}) = E(\text{aspara-arriba}) - E(\text{Aspara-abajo}) = -2.132 \text{ kJ mol}^{-1}$$

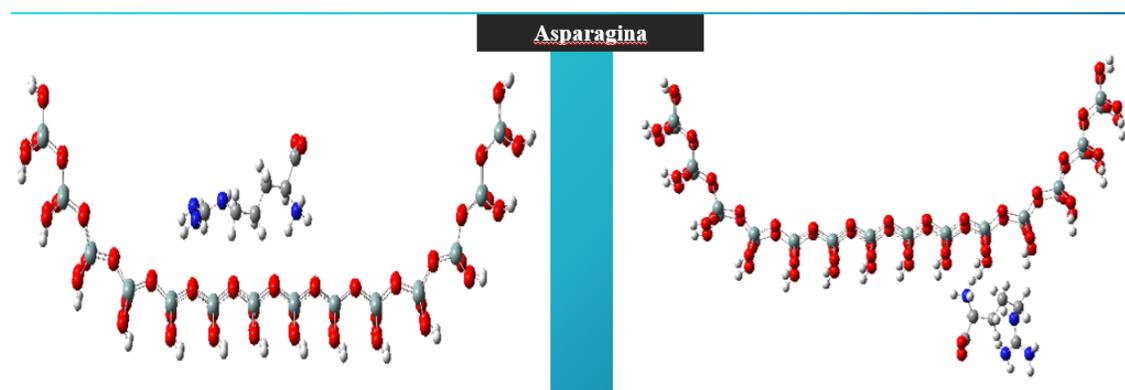
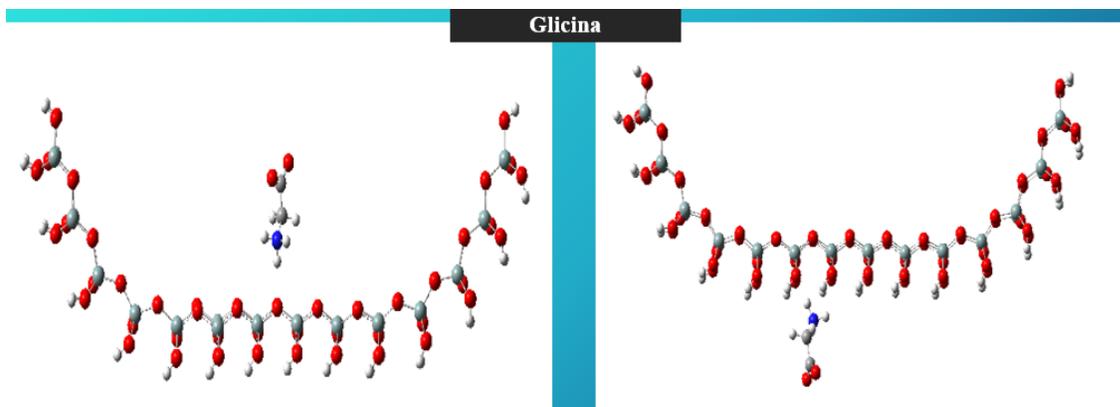


Figura 31. Simulación de asparagina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15

$$\Delta E (\text{estabilización}) = E(\text{Glici-arriba}) - E(\text{Glici-abajo}) = 2.906 \text{ kJ mol}^{-1}$$



**Figura 32. Simulación de glicina dentro y fuera de un poro de la partícula SBA-15**

De acuerdo con las energías de absorción obtenidas para los diferentes fragmentos, se puede decir que, los grupos cargados positivamente ( $-NH_3^+$  terminales) se verán más atraídos por el sólido que los grupos cargados negativamente ( $-COO^-$  terminales). Esto está relacionado con la alta densidad electrónica que posee el material a través de los grupos  $-O-Si-O-$ , así como, los  $-O-Si-O-H$ . De acuerdo al acomodo geométrico encontrado para el grupo representativo de fragmentos proteicos, los grupos carboxilos siempre se encuentran lo más alejado de la superficie de la SBA-15. De esta manera, se puede decir que la superficie interior o exterior de la sílice reconoce a las moléculas actuando de una manera selectiva sobre las moléculas cargadas positivamente. De acuerdo a las energías de estabilización de las moléculas se obtuvo que éstas se estabilizan en mayor proporción en la parte interior del esqueleto con respecto a la parte exterior del modelo del sólido. Esto sugiere, que si la molécula es menor que el tamaño del poro, ésta se alojará preferencialmente en la parte interior de éste. Mientras, que las moléculas de mayor tamaño que el poro que tengan grupos cargados positivos solo podrían interactuar con la parte exterior del esqueleto. Esto concuerda con lo encontrado experimentalmente (Artículo Adv. Funct. Mater. 2007, 17, 1225–1236) en donde se observa que las moléculas cargadas positivamente, se difunden a través del poro más rápidamente que las neutras o las cargadas negativamente. Sin embargo, en el caso de las especies zwitterónicas en

donde se tiene ambas cargas (positiva-negativa) distribuidas, resulta benéfico ya que podrían servir como acarreados de moléculas difundiendo al interior de los poros.

## 5. CONCLUSIONES

### a) Síntesis modificada de la SBA15:

- Tamaño submicrométrico adecuado para macropinocitosis
- Se obtuvo una mayor área superficial que la SBA15 convencional (1200 m<sup>2</sup>/g VS 400-900 m<sup>2</sup>/g)

### b) Funcionalización de SBA-15 con bicapa de lípidos

- Se logró la funcionalización con liposomas zwitteriónicos de la partícula a pesar de poseer una forma poco estudiada en este tipo de recubrimientos.

### c) Efectos de la superficie de la SBA-15 sobre la formación de la corona de proteínas en contacto con plasma humano

- Las partículas incubadas con plasma contienen una importante presencia de proteínas.
- Las partículas funcionalizadas con lípidos zwitteriónicos son más afines a las proteínas del plasma.

### d) Resultado análisis teórico

- Los modelos teóricos muestran que existe una mayor afinidad (selectividad-específica) entre la superficie y los grupos cargados positivamente, mostrando una estabilización energética. La interacción se puede dar por la parte interior del modelo (grupos -O-Si-O-) y por la parte exterior con los grupos hidroxilos de la superficie (grupos -O-Si-O-H).

## 6. REFERENCIAS

- Ansari A. A., Alhoshan M., Alsalhi S. M., Aldwayyan S. A. (2010). Prospects of Nanotechnology in Clinical Immunodiagnosics. *Sensors (Basel)*. Vol. 10(7), pp. 6535–6581.
- Balmert S. C., Little S. R. (2013). Biomimetic Delivery with Micro- and Nanoparticles. *Adv Mater*. Vol. 24(28), pp. 3757–3778.
- Banu A., Templeton A., Munshi A., Ramesh R. (2014). Nanodrug Delivery Systems: A Promising Technology for Detection, Diagnosis, and Treatment of Cancer. *PharmSciTech*, vol. 15(3), pp. 709–721.
- Barrabino A. (2011). Synthesis of mesoporous silica particles with control of both pore diameter and particle size. Master of Science Thesis in Materials and Nanotechnology program, Chalmers University of Technology.
- Barrán A. (2015). Derivados lipídicos biocompatibles : una mejora en la vectorización del DNA. Tesis Doctoral, Doctorado en Ciencias de la Facultad de ciencias químicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Beas C., Ortuño D., *Biología Molecular Fundamentos y Aplicaciones* (2009). 1a edición, Cap. 1. Editorial Mc Graw Hill, pp. 5-10. México D.F., México
- Bozzuto G., Molinari A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. Vol. 10, pp. 975–999.
- Caballero R. (2013) Nanovectores híbridos para insertar material genético en células humanas. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Calixto G., Bernegossi J., Fonseca-Santos B., Chorilli M. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *Int J Nanomedicine*. Vol. 9, pp. 3719–3735.
- Carmona-R. A. (2010). Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *Int J Nanomedicine*. Vol. 5, pp. 249–259.
- Castañeda F. (2011). Evaluación de los Factores Responsables de la Decoloración del Licor de almendras Denominado Tipo Amaretto. Tesis de Doctorado. Posgrado en Tecnología Avanzada, Instituto politécnico nacional.
- Chang Raymon. Química (2010) 10a edición, Cap. 25. Editorial Mc Graw Hill, pp 1060-1073. México, DF, México
- Cuevas G., Introducción a la Química Computacional. (2003). 1a edición, Cap. 4. Editorial Fondo de Cultura Económica, pp. 60-67. México D.F., México
- Fredin L., Allison T. (2016) Predicting Structures of Ru-Centered Dyes: A Computational Screening Tool. *J. Phys. Chem*. Vol. 120, pp 2135–2143
- Fuentes X., Castiñeiras M., Queraltó J. Bioquímica Clínica y Patología Molecular (1998) Segunda Edición. Editorial Reverté, Barcelona España.
- Guerrero S. (2013) “Implicancias Farmacéuticas de la Conjugación de Péptidos a Nanopartículas de Oro: efectos sobre la interacción con proteínas plasmáticas, la estabilidad, la toxicidad y la biodistribución” Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias farmacéuticas, Universidad de Chile.
- López Goerne T. M. Nanotecnología y nanomedicina (2011). 1ª edición,, Cap. 1. Ediciones Arkhé, pp. 41-43. México D.F., México

- López Marín, L. M., Lanéelle, M. A., Promé, D., Daffé, M., Lanéelle, G., Promé, J. C. (1991) Glycopeptidolipids from *Mycobacterium fortuitum*: a variant in the structure of C-mycoside. *Biochemistry* Vol. 30 (43), pp. 10536-10542.
- Martín P. Soto J. *Enfermería Anatómo-Fisiología* (1994). Ediciones científicas y tecnológicas. Barcelona España.
- Nehoff H., N Parayath N., Domanovitch L. (2014). Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int J Nanomedicine*. Vol. 9, pp. 2539–2555.
- Ruano M. (2013) *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. Tesis de Doctorado, Doctorado Facultad ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Sahay G., Alakhova D., Kabanov A.(2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* Vol. 145, pp. 182–195
- Slowing I., Trewyn B., Giri S., Lin V. (2007). Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing Applications *Journal of Advanced Functional Materials* Vol. 17, pp. 1225–1236
- Sun X. (2012). *Mesoporous silica nanoparticles for applications in drug delivery and catalysis*. Doctoral thesis, degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY: Chemistry, Iowa State University.
- Tang F., Li L., Chen D. (2012). ChemInform Abstract: Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* Vol. 24, pp. 1504–1534

- P. Torchilin V. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* Vol. 13(11), pp. 813–827.
- Vercauteren D., Rejman J , Martens T. , Demeester J , Smedt S., Braeckmans K. (2012) On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods. *Journal of Controlled Release* Vol. 161, pp. 566–581
- Wolfram J., Yang Y., Shen J., Mten A., Chen C., Shen H., Ferrari M, Zhao.J. Y. Wolfram (2014) The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. “*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*” vol.124, pp. 17-24.
- Wong I. Y., Bhatia S. N., Toner M. (2013). Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev.* Vol. 27(22), pp. 2397–2408.p.