

Desarrollo y síntesis de materiales híbridos para la liberación controlada de moléculas bioactivas

ANDREA BERNARDOS BAU

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria del Disseny



**Desarrollo y síntesis de materiales híbridos,
para la liberación controlada de moléculas
bioactivas**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Andrea Bernardos Bau

Dirigida por:
Dr. Ramón Martínez Mañez
Dr. José Manuel Barat Baviera

Valencia, junio 2011



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

© Andrea Bernardos Bau

Primera edición, 2013

© de la presente edición:
Editorial Universitat Politècnica de València
www.editorial.upv.es

ISBN: 978-84-9048-024-3 (versión impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.



D. Ramón Martínez Máñez, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. José Manuel Barat Baviera, Catedrático de Universidad del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Andrea Bernardos Bau en esta memoria, bajo el título **“Desarrollo y síntesis de materiales híbridos, para la liberación controlada de moléculas bioactivas”** ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia”.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctor, expedimos la presente que firmamos en Valencia, a 24 de junio de 2011.

Dr. Ramón Martínez Máñez

Dr. José Manuel Barat Baviera

A mi sobrina Marta y a toda mi familia.

Agradecimientos

Ha llegado el momento de agradecer tantas cosas y a tantas personas, que no se si sabré como hacerlo.

Gracias a mis directores de tesis. Gracias José por ser el primero en confiar plenamente en mí y gracias Ramón por aceptarme en tu grupo como una más y sobretodo gracias por dejarme crecer como investigador. Gracias a los dos por vuestro apoyo y ayuda siempre que lo he necesitado.

Gracias Félix, por ser una ayuda imprescindible para la realización de esta tesis, gracias por tu apoyo, tu sabiduría y buenos consejos en todo momento.

Gracias Loles, Juan, Luis, José Vicente, Quique, Fina y demás profesores. Gracias a todos por estar ahí siempre que lo he necesitado, para darme consejos, apoyo y consuelo en todo momento.

Gracias al profesor Søren Hvilsted de la Universidad técnica de Dinamarca (DTU) y a todo el Centro danés de polímeros, por su ayuda y gran acogida durante mi estancia en Copenhague.

Y ahora, probablemente lo más difícil de esta tesis, agradecer a mis amigos del laboratorio 2.6. Me ha costado semanas empezar estas palabras, pero ahí van.

Quiero que sepáis que cada uno de vosotros me ha aportado mucho más de lo que imagináis, los que conocí mis primeros meses, los que se fueron, los que han estado conmigo todo este recorrido y las nuevas generaciones, todos habéis ayudado a formar lo que somos, un gran grupo.

Elena, que te puedo decir,..., gracias amiga por todo, por ser mi profe esos primeros días y por ser mi compañera de fin de tesis. Gracias por tu ayuda incondicional, tus consejos, nuestras risas posando en las fotos y simplemente gracias por estar siempre a mi lado.

Carmen gracias por estar siempre ahí para ayudarme y escucharme en todo momento y gracias por espabilarme cuando más lo necesito. Estela gracias

por ser mi amiga, llegamos juntas y aunque nuestros viajes por Europa nos ha separado muchos meses, no impide que seamos tan amigas, gracias por esos momentos en el forfi...Gracias Cris S, por tu amistad, apoyo y risas durante todos estos años y gracias por enseñarme la palabra 'canson', que tantas veces utilizamos!!!. Gracias Inma Campos, por ser mi amiga, por escucharme y por perseguirme. Gracias Yoli por tu amistad y cariño fundamental en este recorrido. Y por supuesto gracias a las dos por hacerme disfrutar tanto y por hacerme el mejor regalo de Navidad. Gracias Inma Candel por tus risas, tu amistad y por hacer que salgan Inmas de mi hombro. Gracias María Moragues por hacerme ver la parte buena de las cosas, yendo siempre juntas al gym, es estupendo compartir esos momentos contigo. Gracias Laura por escucharme en todo momento, por tu ayuda imprescindible en el mundo bio y gracias por no odiarme cuando te alineo los viales. Gracias Núria por tu gran apoyo y amistad estos últimos meses, es muy bonito conocerte desde tus días de la carrera y ser ahora una más entre nosotros. Gracias Cris G por tus risas y por darme siempre animo y cariño. Gracias Alessandro y Román por sacarme por ahí a tomar algo y por organizar partidos de futbol para que me desestrese y me alegre. Gracias a Marian, Patri, Marta, Luis Enrique, Michelle y José Manuel, por que con vuestra llegada habéis ayudado a formar un gran grupo, con vuestras risas y vuestra amistad. Y gracias también a Santi, por todo lo vivido, y Andrea y Almu, por ir tan contenta a Burjassot, sólo por ir a veros.

Y al final, por todo lo que implica eso, gracias Edgar. Gracias por todo, por aguantarme, por tu apoyo incondicional, tus risas, tu amistad, tu ayuda, por creer tanto en mi, por tu cariño, por habernos formado juntos, por enseñarme mucho más de lo que te imaginas, pero sobretodo, gracias por hacerme llorar de la risa, cuando más lo necesito, sólo con decir 'mueblerería'.

A los que ahora no están en el laboratorio, pero han formado parte esencial estos años: gracias Tati por tus locuras, risas y por las noches valencianas. Gracias Hanoi por tu apoyo, amistad y preocupación en todo momento. Gracias Pilar por tu amistad y por esas buenas horas hablando de nuestras vidas familiares. Gracias Rosa por pasarme el testigo a la hora del

trabajo y gracias por tu apoyo y preocupación. Gracias Merche, por ser tan buena conmigo y por preguntar siempre cómo estoy. Gracias María Sapiña, por ser tan estupenda con todos. Gracias también Julio y María Raga por los buenos momentos pasados juntos.

Y como esta claro, no sólo se hacen amigos en tu laboratorio, gracias a todos los que pertenecen al edificio 5M. Gracias a todos mis compañeros de los laboratorios 2.5, 2.2 y los del piso de abajo, gracias por tan buenos momentos vividos juntos, fuera y dentro del 5M. En especial gracias a mi gran amigo Carlos, gracias por tus consejos, por tu preocupación y aunque ahora nos separen muchos kilómetros, gracias por seguir siendo tan buen amigo. Gracias Pavel y Giorgia por vuestra amistad y por preguntar siempre como va todo. Gracias Dani por pasar tan buenos momentos estos últimos meses. Y gracias también Neus, Dolors, Mireia, Sara, Diana, Tania, Raúl, Sergio, Maykel, Roberto y todos los demás, gracias por tantas risas, sobretodo en la sala de becarios.

Gracias a todo el grupo CUINA, en especial a mi amiga Marta, gracias por tu confianza.

Por otro lado, pero no menos importante, gracias a toda mi familia. Gracias mamá y Andrés, papá y Lalo, María y David, Elena y Zafra, Andrés y Marta, gracias familia por estar siempre a mi lado, gracias por vuestro apoyo desde el primer momento, por leer toda la tesis o escuchar cada presentación, gracias por vuestra admiración, preocupación y por quererme tanto. Estos años no sólo los recordaré como los años de doctorado, sino los años en los que han pasado tantas cosas importantes en mi familia, como las bodas de mis hermanas y la llegada de Marta. Gracias a todos por compartir todo eso juntos y por hacerme tan feliz. Y por supuesto gracias al resto de mi familia, primos, tios,... Gracias a todos por preocuparos siempre de cómo va todo, por estar pendientes de mí, por alegraros por mí, por preguntarme siempre con mucho interés y por esos ataques de risa que nos dan cuando no entendéis nada.

Gracias a mis amigas de Madrid, gracias por apoyarme desde el primer día, aunque eso significará que me iría a otra ciudad. Gracias también a los de

Benicassim, gracias por estar siempre tan pendientes de mi tesis y por vuestro interés. Gracias a mis amigos de químicas por vuestra amistad y por entender todo mejor que nadie. Y para acabar gracias a mis amigos de Valencia, gracias Eli por introducirme en este estupendo grupo y gracias a todos por los buenísimos momentos que hemos vivido juntos estos últimos años, sobretodo en 'Sol y Lluna'.

Y gracias a todos los que leéis estas palabras, por vuestro interés en esta tesis y por ayudarme a formarme como investigadora y también como persona.

Resumen

En esta tesis se han desarrollado diferentes dispositivos de liberación controlada, utilizando materiales híbridos, y su aplicación como 'puerta nanoscópica molecular'.

Se describe en primer lugar, un método de liberación controlada para la vitamina B₂ o riboflavina (vitamina hidrosoluble necesaria para el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y especialmente en el metabolismo de las proteínas que participan en el transporte de oxígeno) a través del uso de 'puertas nanoscópicas moleculares' preparadas mediante el anclaje de agrupaciones poliaminicas en la superficie externa de los poros de sólidos mesoporosos, que actúan como 'puerta molecular'. El pH y la presencia de ciertos aniones van a controlar el estado abierto/cerrado de la puerta y van a permitir la liberación de la vitamina, la cual esta encapsulada en el interior de los poros. En medio ácido los grupos amino de la superficie se protonan adquiriendo cargas positivas y, como consecuencia, aparecen repulsiones electrostáticas que mantienen cerrada la 'puerta'. A pH neutro, por la ausencia de repulsiones electrostáticas, la 'puerta' se encuentra abierta, produciéndose la liberación de la vitamina.

En segundo lugar, se describe el desarrollo, síntesis, caracterización y funcionamiento de un material mesoporoso. Este material esta cargado con un colorante y funcionalizado con un disacárido, que actúa como 'puerta nanoscópica molecular', el cual se abre en presencia de una enzima intestinal. El sólido esta formado por un material mesoporoso, MCM-41, cargado con el colorante $[\text{Ru}(\text{bipi})_3]^{2+}$ y funcionalizado con un alcoxisilano derivado del disacárido lactosa. Debido al impedimento estérico que representa ese azúcar, la salida de los poros se encuentra bloqueada. La presencia en la disolución de una β -D-galactosidasa capaz de hidrolizar el enlace O-glucosídico que une a los monosacáridos de la lactosa, es capaz de 'abrir' los poros permitiendo así la liberación del colorante.

En tercer lugar, se describe la síntesis de un nanodispositivo, que consiste en nanopartículas de sílice mesoporosas MCM-41, funcionalizadas en el exterior de los poros con un derivado de almidón, y cargadas en el interior con un

colorante, $[\text{Ru}(\text{bipi})_3]^{2+}$, necesario para la monitorización del dispositivo. Además, se prepara un material cargado con un citotóxico, doxorubicina, capaz de matar las células cancerosas. Estudios previos de liberación controlada, muestran la 'no' liberación del colorante o el citotóxico en agua a pH 7.5, mientras que se observa liberación en presencia de una disolución acuosa de amilasas a pH 7.5 (capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos $\alpha 1 \rightarrow 4$, que unen a las moléculas de glucosa presentes en el almidón). Debido a la presencia de amilasas en los lisosomas de las células, el nanodispositivo se utiliza para el estudio de la liberación controlada del colorante o del citotóxico en medio intracelular. Se utilizan las células tumorales HeLa y las células no tumorales LLC-PK1 para los ensayos de viabilidad del sólido cargado con el colorante, a través de los cuales se ha comprobado la 'no' toxicidad del material. La internalización en las células HeLa vía endocitosis, se confirma con microscopía confocal. Los procesos de endocitosis, dirigen a las nanopartículas a los lisosomas, donde el almidón se degrada, por la presencia de amilasas. La hidrólisis del polisacárido en el material cargado con el citotóxico se confirma por la notable muerte celular observada por microscopía confocal, al ser liberado el citotóxico en el interior de las células.

Por último, se sintetizan y caracterizan poliésteres que incluyen grupos azoicos en su estructura, para su posterior funcionalización en nanomateriales de sílice y su aplicación como 'puertas nanoscópicas moleculares'. Debido al volumen de los poliésteres y de los grupos azoicos, se inhibe la liberación de la carga ocluida en el interior de los poros. La adición posterior de enzimas esterasas, presentes en los lisosomas y capaces de hidrolizar los poliésteres, permite la liberación del colorante ocluido en su interior. Se utilizan las células tumorales HeLa y las células tumorales MCF-7 para los ensayos de viabilidad, comprobándose la 'no' toxicidad del material. La internalización vía endocitosis y la liberación del colorante en las células HeLa, se confirma mediante microscopía confocal.

Resum

En aquesta tesi s'han desenvolupat diferents dispositius de lliberació controlada, utilitzant materials híbrids i la seua aplicació com a 'porta nanoscòpica molecular'.

En primer lloc s'ha descrit, un mètode de lliberació controlada per a la vitamina B₂ o riboflavina (vitamina hidrosoluble necessària per al metabolisme dels hidrats de carboni, greixos i especialment per al metabolisme de les proteïnes que participen en el transport d'oxigen) emprant 'portes nanoscòpiques moleculars' preparades mitjançant l'ancoratge d'agrupacions poliamíniques, que actuen com a 'porta molecular', en la superfície externa dels porus de sòlids mesoporosos. El pH i la presència de certs anions controlaran l'estat obert/tancat de la porta, permetent la lliberació de la vitamina encapsulada en l'interior dels porus. En medi àcid els grups amino de la superfície es troben protonats adquirint càrregues positives i per tant, apareixen repulsions electrostàtiques que mantenen tancada la 'porta'. A pH neutre, a causa de l'absència de repulsions electrostàtiques, la 'porta' es troba oberta, produint la lliberació de la vitamina.

En segon lloc, es descriu el desenvolupament, la síntesi, la caracterització i el funcionament, d'un material mesoporós. Aquest material està carregat amb un colorant i funcionalitzat amb un disacàrid que actua com a 'porta nanoscòpica molecular', que s'obri en presència d'un enzim intestinal. El sòlid està format per un material mesoporós, MCM-41, carregat amb el colorant [Ru(bipi)₃]²⁺ i funcionalitzat amb un derivat alcoxisilà del disacàrid lactosa. A causa de l'impediment estèric que representa el sucre, l'eixida dels porus es troba bloquejada. La presència en la dissolució d'una β-D-galactosidasa capaç d'hidrolitzar l'enllaç O-glucosídic que uneix els monosacàrids de la lactosa, és capaç d' 'obrir' els porus permetint així la lliberació del colorant.

En tercer lloc, es descriu la síntesi d'un nanodispositiu, que consisteix en nanopartícules de sílice mesoporoses MCM-41, funcionalitzades amb un derivat de midó a l'exterior dels porus, i carregades a l'interior amb un colorant, [Ru(bipi)₃]²⁺, necessari per a la monitorització del dispositiu. A més a més, es

preparà un material carregat amb el citotòxic, doxorubicina, capaç de matar les cèl·lules tumorals. Estudis previs de lliberació controlada, mostren la 'no' lliberació del colorant o el citotòxic en aigua a pH 7.5, mentre que s'observa lliberació en presència d'una dissolució aquosa d' amilases a pH 7.5 (capaçs d'hidrolitzar els enllaços glicosídics $\alpha 1 \rightarrow 4$, que uneixen les molècules de glucosa presents en el midó). A causa de la presència d'amilases en els lisosomes de les cèl·lules, el nanodispositiu s'utilitza per a l'estudi de la lliberació controlada del colorant o del citotòxic al medi intracel·lular. S'utilitzen les cèl·lules tumorals HeLa i les cèl·lules no tumorals LLC-PK 1 per als assajos de viabilitat del sòlid carregat amb el colorant, a través dels quals s'ha comprovat la 'no' toxicitat del material. La internalització en les cèl·lules HeLa via endocitosi, es confirma amb microscòpia confocal. Els processos d'endocitosi, dirigeixen a les nanopartícules als lisosomes, on el midó es degrada per la presència d'amilases. La hidròlisi del polisacàrid en el material carregat amb el citotòxic es confirma per la notable mort cel·lular observada per microscòpia confocal, al ser alliberat el citotòxic a l'interior de les cèl·lules.

Finalment, se sintetitzen i caracteritzen polièsters que inclouen grups azoics en la seua estructura, per a la posterior funcionalització en nanomaterials de sílice i la seua aplicació com a 'portes nanoscòpiques moleculars'. A causa del volum dels polièsters i dels grups azoic, s'impedix la lliberació de la càrrega closa a l'interior dels porus. L'addició posterior d'enzims esterasa, presents en els lisosomes i capaçs d'hidrolitzar els polièsters, permet la lliberació del colorant clos al seu interior. S'utilitzen les cèl·lules tumorals HeLa i les cèl·lules tumorals MCF-7 per als assajos de viabilitat, comprovant-se la 'no' toxicitat del material. La internalització via endocitosi i la posterior lliberació en les cèl·lules HeLa es confirma mitjançant microscòpia confocal.

Abstract

In this thesis we have developed different controlled release devices using hybrid materials and their use as molecular gate.

It is developed, first, a method of controlled release of vitamin B₂ or riboflavin (soluble vitamin needed for the metabolism of carbohydrates, fats and especially in the metabolism of proteins involved in oxygen transport) through the use of 'nanoscopic molecular gates' prepared by anchoring of polyamines groups, which act as 'molecular gate' at the outer surface of the pores of mesoporous solids. The pH and the presence of certain anions will control the opening/closure state of the gate allowing the release of the vitamin that is encapsulated inside the pores. At acidic pH, amino groups at the surface are protonated and positively charged and, therefore, it has electrostatic repulsion, so the 'gate' remains closed. At neutral pH, due to the absence of electrostatic repulsion, so the 'gate' remains opened, resulting in the release of the vitamin.

Second, we describe the development, synthesis, characterization and operation of a mesoporous material loaded with a dye and functionalized with a disaccharide that acts as 'molecular nanoscopic gate', which is opened in the presence of an intestinal enzyme. The solid consists of a mesoporous material, MCM-41 loaded with a dye, [Ru(bipy)₃]²⁺ and functionalized with an alkoxy silane derived from lactose disaccharide. Due to steric hindrance showed by the sugar, the pores are blocked. The presence of β-D-galactosidase in the solution, enables the hydrolysis of O-glycosidic-bond linking the monosaccharides of lactose, being able to 'open' the pores and so allowing the release of the dye.

Third, we describe the synthesis of a nanodevice, which consists of MCM-41 mesoporous silica nanoparticles, functionalized on the outside of the pores with a starch derivative. The material is loaded inside first with a dye, [Ru(bipy)₃]²⁺, necessary for monitoring the device. Then it is loaded with a cytotoxic, doxorubicin, capable of killing cancer cells. Preliminary controlled release studies show the 'non' release of dye or cytotoxic in water at pH 7.5, and the almost total release in the presence of an aqueous solution at pH 7.5 with amylase (able to hydrolyse the

glycosidic $\alpha 1 \rightarrow 4$ bond, linking glucose molecules present in the starch). Due to the presence of amylase in the lysosomes of cells, the nanodevice is used to study the controlled release of the dye or the cytotoxic, in intracellular environment. HeLa tumoral cells and LLC-PK1 nontumoral cells were used for feasibility testing of the solid loaded with the dye, which indicate the 'non' toxicity of the material. Internalization in HeLa cells via endocytosis is confirmed by confocal microscopy. The endocytic process targets the nanoparticles to lysosomes where the anchored starch is degraded by the lysosomal enzymes. Hydrolysis of the polysaccharide in the material loaded with the cytotoxic is confirmed by the significant cell death observed by confocal microscopy, as the cytotoxic is released inside the cells.

Finally, polyesters including azo groups are synthesized, characterized, grafted onto nano-silica mesoporous support and used as 'nanoscopic molecular gates'. Due to the presence of the bulky polyesters functionalized with azo groups the release of cargo occluded inside the pores is blocked. The presence of esterases, able to hydrolyze polyesters, allowed the release of de entrapped cargo. HeLa tumoral and MCF-7 tumoral cells are used for feasibility testing, indicating the 'non' material toxicity. Internalization via endocytosis and cargo release, thanks to the esterases present in the lysosomes, in HeLa cells are confirmed by confocal microscopy.

Prólogo

Las moléculas bioactivas son sustancias imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. Sin embargo estas sustancias pueden ser susceptibles a la oxidación, luz, altas temperaturas y pH. Por este motivo, nace la idea de la encapsulación de las mismas en soportes que las proteja de agentes externos, y su posterior liberación controlada en el lugar deseado. El empleo de soportes sólidos mesoporosos nanoestructurados para la liberación controlada de especies es muy prometedor y de gran interés, por ese motivo se pensó en la realización de la presente tesis doctoral, aplicando los nanodispositivos para la liberación controlada de moléculas de interés biológico, uniendo para ello diferentes disciplinas, como son la química, la bioquímica, la ciencia de materiales, etc.

La presente tesis doctoral se ha desarrollado dentro del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y el Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) de la UPV.

Para la comprensión y linealidad del trabajo realizado, la tesis se divide de la siguiente manera:

- Introducción: Se realiza una revisión bibliográfica sobre el estado del arte actual de las diferentes disciplinas empleadas en la presente tesis doctoral y los ejemplos más destacados del uso de nanodispositivos aplicados en liberación controlada.
- Objetivos: Se desarrollan los objetivos más importantes de la tesis, que se cumplirán en cada capítulo.
- Capítulo 1: Liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina, mediante el uso de materiales híbridos funcionalizados con poliaminas.
- Capítulo 2: Liberación controlada con respuesta enzimática, mediante el uso de sílice mesoporosa funcionalizada con lactosa.

- Capítulo 3: Liberación controlada intracelular con respuesta enzimática, basada en nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con polisacáridos.
- Capítulo 4: Síntesis de poliésteres y su uso como 'puertas moleculares' en nanomateriales híbridos.
- Capítulo 5: Procedimiento experimental.
- Conclusiones generales y perspectivas.

Publicaciones

Los resultados de esta tesis y las colaboraciones realizadas han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Soto, J. *J. Control. Release*, **2008**, *131*, 181-189.
- Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5884-5887.
- Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Máñez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.
- Bernardos, A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Pérez-Payá, E.; Guillem, C.; Amorós, P. *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6353-6368.

Abreviaturas

ADN ácido desoxirribonucleico

ATP trifosfato de adenosina

bipi biperidina

CBPQT⁴⁺ ciclobis-(paraquat-p-fenileno)

CTABr bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DSC calorimetría diferencial de barrido

DNPD derivado del dioxilnaftaleno

DTT ditioneitol

G1,5 generación 1.5

GFP proteína verde fluorescente

GLU47 Glucidex[®] 47

GLU39 Glucidex[®] 39

GLU29 Glucidex[®] 29

GMP monofosfato de guanosina

HPLC cromatografía líquida de alta resolución

IR espectroscopía infrarroja

LC3-I cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulos 1

MCM Mobile Crystalline Material

ME mercaptoetanol

N1 3-aminopropiltriétoxissilano

N3 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamina]propiltrimetoxissilano

PAMAM poliamidoamina

ppi 2-fenilpiridina

PXRD difracción de rayos X de polvo

RMN resonancia magnética nuclear

RMN-MAS resonancia magnética nuclear de ángulo mágico de spin

Ru(bipi)₃Cl₂ cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II)

SBA Santa Barbara Amorphous type material

SEC cromatografía de exclusión molecular

TEAH₃ trietanolamina

TEM microscopía electrónica de transmisión

TEOS tetraetilortosilicato

TGA análisis termogravimétrico

UV ultravioleta

WST-1 2-(4-Iodofenil)-3- (4-nitrofenil)-5- (2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio

Índice

Introducción.....	1
1	Introducción a la Química Supramolecular.....3
1.1	Química Supramolecular..... 3
1.2	Reconocimiento Molecular..... 4
2	Materiales mesoporosos.....6
2.1	Síntesis de materiales mesoporosos..... 7
2.2	Funcionalización MCM-41 por Co-condensación..... 9
2.3	Funcionalización MCM-41 por Grafting..... 10
2.4	Aplicaciones de los materiales mesoporosos híbridos..... 12
3	‘Puertas nanoscópicas moleculares’.....12
3.1	‘Puertas nanoscópicas moleculares’ en liberación controlada.... 15
3.2	Liberación controlada intracelular..... 32
3.3	Biodisponibilidad..... 34
Objetivos.....	37
Capítulo 1: Liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina, mediante el uso de materiales híbridos funcionalizados con poliaminas.....	41
1.1	Introducción..... 43
1.1.1	Liberación controlada..... 43
1.1.2	Vitaminas..... 47
1.2	Resultados y discusión..... 49
1.2.1	Síntesis del material..... 49

1.2.2	Caracterización del sólido Rf-N3-S	52
1.2.3	Mecanismo de la 'puerta': control pH.	57
1.2.4	Mecanismo de la 'puerta': control aniónico.	61
1.2.5	Efecto de la 'puerta' con diferentes concentraciones de aniones.	70
1.2.6	Cinéticas de liberación.	72
1.3	Conclusiones.....	75

Capítulo 2: Liberación controlada con respuesta enzimática, mediante el uso de sílice mesoporosa funcionalizada con lactosa. 77

2.1	Introducción.....	79
2.2	Resultados y discusión.....	85
2.2.1	Síntesis de materiales.	85
2.2.2	Caracterización de materiales.	91
2.2.3	Mecanismo de 'puerta' con respuesta enzimática.	96
2.3	Conclusiones.....	108

Capítulo 3: Liberación controlada intracelular con respuesta enzimática, basada en nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con polisacáridos. 109

3.1	Introducción.....	111
3.2	Resultados y discusión.....	116
3.2.1	Síntesis de materiales.	116
3.2.2	Caracterización de materiales.	122
3.2.3	Mecanismo de 'puerta molecular' con respuesta enzimática.....	129

3.2.4	Mecanismo de liberación controlada intracelular.	144
3.3	Conclusiones.....	158

Capítulo 4: Síntesis de poliésteres y su uso como ‘puertas moleculares’ en nanomateriales híbridos. 161

4.1	Introducción.....	163
4.1.1	Nanomateriales híbridos.....	163
4.1.2	Polímeros.....	166
4.2	Resultados y discusión.....	167
4.2.1	Síntesis de materiales.	167
4.2.2	Caracterización polímeros.....	175
4.2.3	Caracterización de materiales.	178
4.2.4	Mecanismo de la ‘puerta’.....	184
4.2.5	Liberación intracelular.	189
4.3	Conclusiones.....	192

Capítulo 5: Procedimiento experimental. 195

5.1	Métodos.	197
5.1.1	Técnicas de caracterización de materiales.	197
5.1.2	Técnicas de caracterización compuestos orgánicos.....	199
5.1.3	Técnicas de análisis.	200
5.2	Reactivos químicos.	201
5.3	Síntesis de materiales generales.....	202
5.3.1	Síntesis del material inicial MCM-41.	202
5.3.2	Síntesis del material inicial nanopartículado MCM-41.	203

5.4	Síntesis de materiales por capítulos.	204
5.4.1	Síntesis materiales capítulo 1.....	204
5.4.2	Síntesis materiales capítulo 2.....	204
5.4.3	Síntesis materiales capítulo 3.....	206
5.4.4	Síntesis materiales capítulo 4.....	207
5.5	Ensayos de liberación.	209
5.5.1	Liberación vitamina B ₂ capítulo 1.....	209
5.5.2	Liberación del colorante de rutenio capítulo 2.....	209
5.5.3	Liberación del colorante de rutenio capítulo 3.....	210
5.5.4	Liberación de Rodamina B capítulo 4.	210
5.6	Ensayos en células.	211
5.6.1	Condiciones cultivo celular.	211
5.6.2	Medidas de viabilidad celular.	211
5.6.3	Internalización celular.....	212
5.6.4	Estudios de citometría de flujo empleando Ru-GLU47-S	212
	Conclusiones generales y perspectivas.....	213
	General conclusions and perspectives.	219

Introducción.

Introducción.

1 Introducción a la Química Supramolecular.

La Química Supramolecular se ha convertido en una base fundamental en el desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología al combinarse con la ciencia de los materiales, permitiendo su uso para llegar a formar nanoválvulas capaces de liberar controladamente moléculas de interés biológico.

A continuación se va a profundizar un poco más en los conceptos de química supramolecular y reconocimiento molecular, así como en la descripción de los soportes inorgánicos que se suelen emplear en el desarrollo de materiales para la liberación controlada. Por último se presentarán algunos de los materiales híbridos más significativos desarrollados a lo largo de los últimos años.

1.1 Química Supramolecular.

La Química Supramolecular,¹ es una disciplina científica que se sitúa más allá de la Química Molecular (entendida ésta como la química del enlace covalente), y que se ocupa del diseño, síntesis, y el estudio de estructuras moleculares complejas generadas mediante interacciones intermoleculares y en las que los enlaces covalentes juegan papeles marginales. Esta rama de la química, nació con el objetivo de imitar la capacidad que presentan las macromoléculas biológicas para formar supramoléculas, mediante procesos de reconocimiento selectivo. La capacidad de las macromoléculas biológicas, como las proteínas y el ADN, para reconocer selectivamente y unirse a otras especies para formar complejos más grandes de naturaleza supramolecular es un elemento clave en multitud de procesos bioquímicos. Los químicos actualmente están cada vez mas interesados en imitar estos procesos que implican el reconocimiento de una molécula por otra mediante la formación de uniones no covalentes entre ambas. La unión espontánea de dos o muchas moléculas, en sistemas definidos como supramoleculares, da lugar a la aparición de nuevas propiedades y

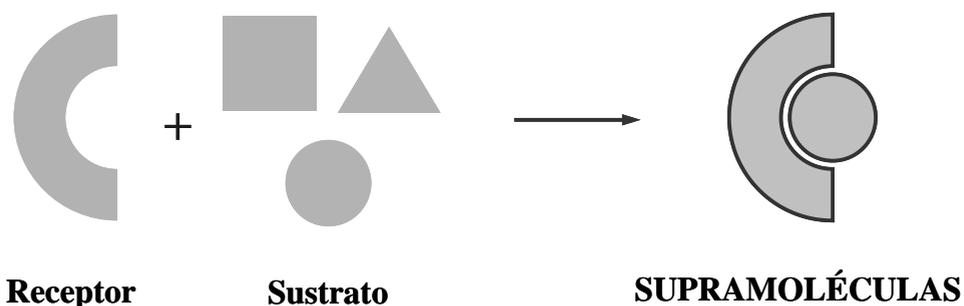
¹ Taylor & Francis Group, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Vols. 1, 2 (Ed.: Atwood, J.L.; Steed, J.W.), LLC, New York, **2004**.

características que son muy difíciles de alcanzar por las entidades moleculares aisladas.

El término supramolecular fue introducido en 1978 por Jean-Marie Lehn,² y hace referencia a la interacción entre dos o más moléculas para construir conglomerados moleculares (en algunos casos de dimensiones nanométricas) asociados de una forma dinámica mediante equilibrios. Estas “súper moléculas” se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes como enlaces intermoleculares. Las interacciones intermoleculares electrostáticas, dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals son la base en procesos de reconocimiento molecular, procesos de transporte y regulación, reacciones enzimáticas, procesos de ensamblaje y muchos otros.

1.2 Reconocimiento Molecular.

El reconocimiento molecular, entendido como la coordinación selectiva de una molécula (receptor) con un sustrato determinado mediante interacciones intermoleculares, es uno de los campos más importantes dentro de la Química Supramolecular. (Esquema 1).



Esquema 1. Representación esquemática de la coordinación selectiva receptor-sustrato para dar lugar a supramoléculas.

Este campo se ha desarrollado extensivamente durante las últimas décadas, sin embargo los progresos obtenidos se han limitado fundamentalmente a la síntesis de receptores moleculares, al estudio de su interacción en disolución

² Lehn, J. -M., *Supramolecular Chemistry*, (Ed. VCH), 1995.

con cationes, aniones y especies neutras y a su modificación química con grupos capaces de transformar el evento microscópico de la coordinación en una señal macroscópica (sensores químicos).³ Los intentos, en los últimos años, de avanzar hacia sistemas más complejos, han llevado al estudio de procesos como la translocación (cambio posicional de moléculas y/o iones de forma controlada) o de procesos de auto-ensamblaje, donde unidades estructurales simples desarrollan agregados moleculares que alcanzan en ocasiones los niveles nanométricos.

En un intento por avanzar hacia sistemas más complejos que puedan dar lugar a efectos sinérgicos no alcanzados en los receptores de base molecular, se han empezado a desarrollar materiales híbridos orgánico-inorgánicos. Estos materiales se obtienen mediante el anclaje de receptores moleculares, a través de un enlace covalente, sobre soportes sólidos en 2D y en 3D.⁴ Como consecuencia de la disposición superficial ordenada de los receptores se producen innumerables ventajas respecto al reconocimiento en disolución. Así, los receptores pueden alinearse en una disposición paralela formando monocapas más o menos densas, como consecuencia de esa ordenación se produce una restricción de movimiento y la aparición de procesos colectivos inducidos por la preorganización que favorecen el reconocimiento. También se pueden llevar a cabo sucesivas etapas de funcionalización del material, lo que permite introducir diferentes grupos orgánicos en un mismo sólido y así modular sus propiedades a voluntad. Además, con el desarrollo de este tipo de materiales, se evitan pérdidas del receptor por

³ (a) Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4419-4476. (b) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, J. M. A.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566. (c) Schmidtchen, F. P.; Berger, M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1609-1646. (d) Antonisse, M. M. G.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Commun.* **1998**, 443-448. (e) Izatt, N. E.; Bruening, R. L.; Krakowiak, K. E.; Izatt, S. R. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 3405-3411. (f) *Supramolecular Chemistry of Anions*, (Eds.: Bianchi, E.; Bowman-James, K.; García-España, E.) Wiley-VCH, New-York, **1997**. (g) Beer, P. D.; Gale, P. A. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 502-532. (h) Bondy, C. R.; Loeb, S. J. *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, *240*, 77-99. (i) Sessler, J. L.; Camiolo, S.; Gale, P. A. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17-55. (j) Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 267-285. (k) Royo, S.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Costero, A. M.; Parra, M.; Gil, S. *Chem. Commun.*, **2007**, 4839-4847. (l) Climent, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Rurack, K.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 8519-8522.

⁴ Flink, S.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N. *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 1315-1328.

lixiviación y si la respuesta del material híbrido es reversible podría incluso reutilizarse varias veces sin perder sus propiedades en cuanto al reconocimiento.

Como se puede observar a partir de todo lo que se ha comentado con anterioridad, la combinación de conceptos de química supramolecular (receptores moleculares) con materiales inorgánicos como soportes sólidos ha dado lugar al nacimiento de una nueva “química hetero-supramolecular” con aplicaciones muy importantes en el campo de la ciencia de los materiales y la nanotecnología. Una de las posibles aplicaciones de estos materiales híbridos en 3D es su uso en procesos de liberación controlada de moléculas con actividad biológica. Así pues vamos a ver a continuación las características y preparación de uno de los soportes 3D más empleados en la preparación de sistemas híbridos como son los materiales mesoporosos.

2 Materiales mesoporosos.

Uno de los tipos de soportes sólidos más utilizados en la preparación de híbridos orgánico-inorgánicos, son los materiales mesoporosos.⁵ Estos son materiales de base silíceo tridimensionales con una estructura de poro bien definida y alta superficie específica.

En 1992 un grupo de investigación de la compañía Mobil Oil preparó una nueva familia de materiales sintéticos, que podían actuar como soportes sólidos, denominados M41S. La característica principal de estos materiales es que poseen una distribución ordenada de poros, con un tamaño comprendido entre los 2 y 10 nm. Además, esos materiales poseen un elevado volumen de poro, del orden de 1 cm³/g, y una alta superficie específica comprendida entre 500 m²/g y 1000 m²/g. Estas características hacen que sean materiales potencialmente muy útiles en aquellos procesos que requieran la adsorción de cantidades significativas de moléculas voluminosas.

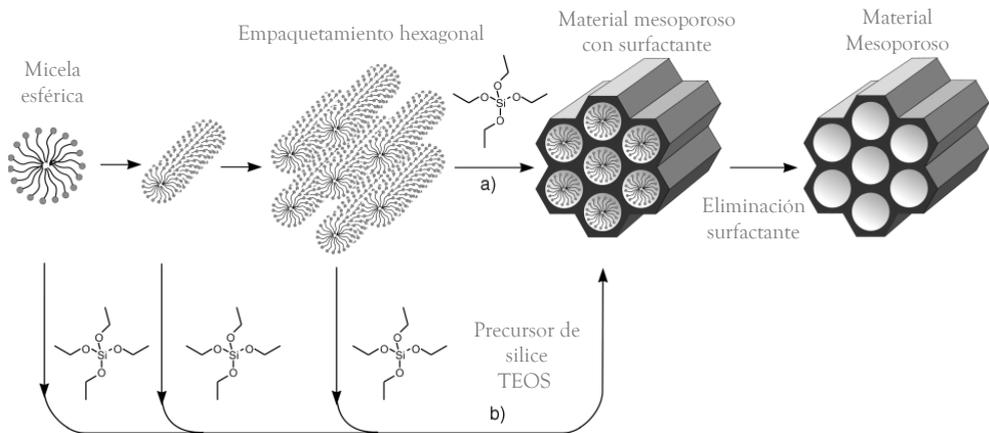
⁵ (a) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature*, **1992**, *359*, 710-712. (b) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10834-10843.

2.1 Síntesis de materiales mesoporosos.

Originalmente, la familia M41S agrupaba bajo esa denominación sólo tres materiales distintos, fácilmente identificables mediante difracción de Rayos X: una fase hexagonal, denominada MCM-41, una fase cúbica, MCM-48, y una fase laminar, MCM-50. La síntesis de los sólidos mesoporosos ordenados M41S requiere el empleo de moléculas de tensoactivos en disolución acuosa, los cuáles forman agregados denominados micelas, cuya forma y tamaño depende esencialmente de la naturaleza y composición química de la molécula de tensoactivo, de su concentración y de la temperatura, aunque factores como el pH de la disolución y la concentración total salina también influyen en el proceso de agregación micelar. A su vez, las micelas se agrupan formando estructuras supramicelares, y la naturaleza de las distintas fases micelares varía en función de la concentración y temperatura. En general, a temperaturas moderadas, las micelas cilíndricas se agrupan formando primeramente una fase hexagonal, que evoluciona hacia una fase cúbica (isotrópica) y posteriormente a una estructura laminar a medida que la concentración de tensoactivo aumenta.

En el proceso de síntesis de los materiales mesoporosos ordenados, constituidos por un esqueleto de sílice, los oligómeros de silicato presentes en disolución acuosa condensan entre sí alrededor de las micelas, que actúan a modo de «plantilla». En el caso de tensoactivos catiónicos, como los utilizados originalmente para la síntesis de la familia M41S, se produce una fuerte interacción coulombica entre la parte polar hidrófila o «cabeza» del tensoactivo cargada positivamente, $R-[N(CH_3)_3]^+$ (siendo R=cadena alquílica o «cola» hidrófoba del surfactante) y los oligómeros de silicato cargados negativamente. Finalmente, y como resultado del proceso de ensamblaje de las especies de silicato en disolución y las micelas, se obtiene un producto sólido que contiene una elevada cantidad de tensoactivo ocluido en su interior. La eliminación posterior del tensoactivo mediante extracción del sólido con disolventes adecuados, o mediante calcinación en aire a temperatura elevada, deja en el interior de la matriz silícea un conjunto de cavidades que constituyen en cierto modo una réplica, un «negativo» de la morfología de las micelas incorporadas en el material durante la síntesis.

Un ejemplo de estos materiales es la MCM-41 (Mobile Crystalline Material), fase hexagonal de los materiales M41S. La síntesis de la MCM-41, tanto microparticulada como nanoparticulada, es la representada en el esquema 2. Consiste en la polimerización de un precursor inorgánico, generalmente TEOS (tetraetilortosilicato), en disolución acuosa alrededor de micelas de un surfactante, CTABr (bromuro de cetiltrimetilamonio), donde las moléculas de surfactante se encuentran asociadas entre sí siguiendo un patrón de empaquetamiento hexagonal compacto de cilindros. Tras la eliminación del surfactante, mediante calcinación o extracción, se obtienen poros definidos de 2-3 nm.



Esquema 2. Representación esquemática de la síntesis de la MCM-41. Adaptado con permiso de *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3216-3251. Copyright 2006 John Wiley & Sons.

Este tipo de materiales presentan una serie de características favorables que hacen que sean interesantes en la preparación de híbridos orgánico-inorgánicos. Así, se pueden funcionalizar con moléculas orgánicas a voluntad, tanto en el exterior como en el interior de los poros. Además, la presencia de un sistema regular de poros accesibles y con tamaños grandes permite cargar en su interior diferentes moléculas.^{6,7}

⁶ Vinu, A.; Hossain, K. Z.; Ariga, K., *Nanosci. Nanotech.*, **2005**, 5, 347-371.

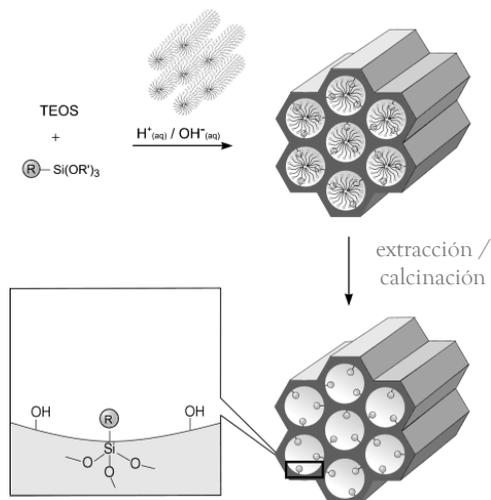
⁷ Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 3216-3251.

La incorporación de grupos orgánicos en la superficie de la MCM-41 permite modular sus propiedades superficiales. Para este fin han sido empleados diversos grupos orgánicos, como amino, tiol, alcohol, vinil, epóxidos, haluros de alquilo, etc. La funcionalización de estos materiales es bastante fácil ya que su superficie (tanto externa como interna) presenta una alta densidad de grupos silanol (Si-OH) que reaccionan en condiciones suaves con moléculas orgánicas conteniendo agrupaciones trialcoxisilánicas. El anclaje covalente de estas especies se puede realizar por dos métodos distintos, según el material que se quiera obtener. Por un lado está el anclaje superficial mediante el “grafting” o post-síntesis, y por otro la co-condensación o síntesis directa. En ambos casos se usa el TEOS como fuente de sílice y un alcoxisilano para la introducción del grupo orgánico.

2.2 Funcionalización MCM-41 por Co-condensación.

En el año 1998, el grupo de investigadores americanos dirigidos por Andreas Stein, lleva a cabo la funcionalización de materiales mesoporosos vía co-condensación o síntesis directa,⁸ demostrando la formación de una monocapa orgánica de grupos 3-mecaptopropil en el interior de los poros de la MCM-41, como se observa en el esquema 3.

⁸ Lim, M. H.; Blanford, C. F.; Stein, A., *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 467-470.



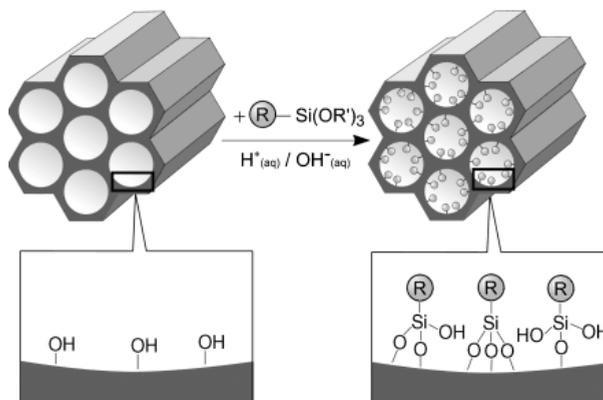
Esquema 3. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por co-condensación o síntesis directa. Adaptado con permiso de *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3216-3251. Copyright 2006 John Wiley & Sons.

La co-condensación o síntesis directa, consiste en la modificación de la superficie del sólido mesoporoso en el mismo momento de la obtención del mismo, por inclusión de un grupo orgánico (en forma de alcoxisilano) en la estructura. Se han llegado a obtener sistemas con una carga de hasta un 20 % de alcoxisilano. De este modo, se pueden introducir todos los grupos funcionales que se quieran, siempre que no produzcan la rotura o deformación de la estructura del mesoporoso. En este caso, la eliminación del surfactante no se puede realizar por calcinación, porque a esas temperaturas tan elevadas la materia orgánica introducida sería eliminada junto con el surfactante. La eliminación del surfactante se realiza por extracción en medio ácido.

2.3 Funcionalización MCM-41 por Grafting.

La funcionalización de un sólido mesoporoso previamente sintetizado, se conoce como grafting o post-síntesis. El procedimiento está basado en el anclaje de moléculas orgánicas en la superficie externa del sólido mesoporoso, después

de la eliminación del surfactante mediante calcinación o extracción (Esquema 4).^{9,10}



Esquema 4. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por grafting o post-síntesis. Adaptado con permiso de *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3216-3251. Copyright 2006 John Wiley & Sons.

El proceso de funcionalización o anclaje superficial consiste en la modificación post-síntesis del sólido mesoporoso por reacción de un alcoxilano con la superficie del material después de eliminar el surfactante. El sólido mesoporoso posee grupos silanol (Si-OH) en una elevada concentración que actúan como centro de anclaje para las moléculas orgánicas con las que se quiere funcionalizar la superficie. Es importante destacar, que la estructura original del mesoporoso se mantiene después de la funcionalización como se ha comprobado mediante difracción de Rayos X de polvo.

La distribución y concentración de los grupos funcionales orgánicos, está influenciada por la reactividad del alcoxilano y por su accesibilidad a la superficie de silanoles, la cual está limitada por procesos de difusión y factores estéricos. La cara superficial externa del material mesoporoso es mucho más accesible que la interna, de este modo los grupos funcionales de la cara externa estarán más accesibles para posteriores reacciones. Si se hace reaccionar un alcoxilano con

⁹ Stein, A.; Melde, B. J.; Schrodin, R. C. *Adv. Mater.* **2000**, 12, 19, 1403-1419.

¹⁰ Juan, F.; Ruiz-Hitzky, E., *Adv. Mater.* **2000**, 12, 6, 430-432.

el sólido antes de eliminar el surfactante, el anclaje se realiza preferentemente sobre la superficie externa ya que el interior de los poros es poco accesible debido a la presencia de las moléculas plantilla.

2.4 Aplicaciones de los materiales mesoporosos híbridos.

Los sólidos mesoporosos, funcionalizados por cualquiera de los dos métodos que se ha comentado anteriormente, han sido muy empleados en distintos campos de la ciencia. Las propiedades distintivas de estos materiales híbridos como su porosidad homogénea, estabilidad de la estructura tridimensional, grande superficie externa, apreciable inercia química, alta capacidad de carga (consecuencia de la presencia de un sistema homogéneo y regular de poros) y su biocompatibilidad, hacen que hayan sido empleados en procesos de catálisis, para liberación controlada de especies, como materiales para remediación medioambiental y en el desarrollo de nuevos materiales sensores.

De entre las aplicaciones que se ha comentado anteriormente, dos particularmente interesantes son el desarrollo de sensores híbridos orgánico-inorgánicos y la liberación controlada de especies de interés mediante la aplicación, en ambos casos, del concepto de ‘puertas nanoscópicas moleculares’. Por todo ello vamos a entrar más en detalle en la definición y aplicaciones de las ‘puertas nanoscópicas moleculares’.

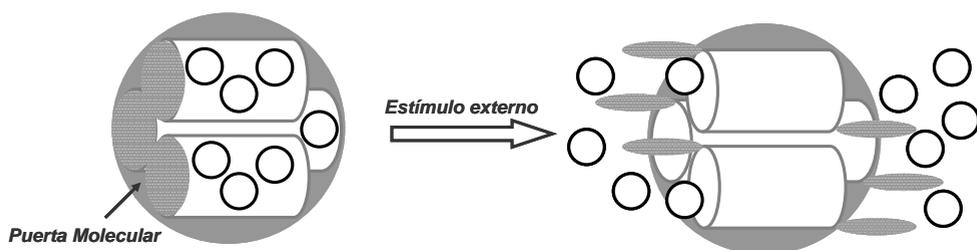
3 ‘Puertas nanoscópicas moleculares’.

Los materiales mesoporosos han sido ampliamente utilizados como sistemas para encapsulación y liberación de ciertas especies químicas. Esto es consecuencia directa de la presencia de un sistema uniforme de poros con capacidad de almacenar una gran cantidad de moléculas orgánicas de diversos tipos.¹¹ En estos sistemas la liberación de la especie encapsulada en el interior de

¹¹ (a) Vallet-Regi, M.; Rámila, A.; del Real, R.P.; Pérez-Pariente, J., *J. Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308-311. (b) Muñoz, B.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Díaz, I.; Vallet-Regi, M., *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 500-503.

los poros es a través de un mecanismo de difusión simple sin control de ningún tipo sobre la cantidad de materia liberada o sobre el tiempo de la liberación.

En los últimos años, y como una evolución natural de estos sistemas primitivos basados en materiales mesoporosos, se ha introducido el concepto de 'puerta molecular'. 'Puerta molecular' engloba a una serie de moléculas orgánicas funcionalizadas en la superficie externa de un soporte sólido mesoporoso, dando lugar a un dispositivo híbrido orgánico-inorgánico nanoscópico. Este dispositivo puede controlar el transporte de materia del interior de los poros al exterior (o viceversa) de forma idealmente reversible, gracias a la aplicación de un estímulo externo, capaz de modificar alguna de las propiedades (carga, tamaño, polaridad, presencia de ciertas especies) de la molécula orgánica anclada en el exterior (que actúa como 'puerta molecular').^{12,13,14,15} El esquema 5 muestra el funcionamiento de una 'puerta nanoscópica molecular'.



Esquema 5. Representación esquemática de una 'puerta nanoscópica molecular'.

Los estímulos externos que han sido empleados para controlar la apertura/cierre de las 'puertas moleculares', se pueden clasificar en:

¹² Fu, Q.; Rao, G.V.R.; Ista, L.K.; Wu, Y.; Andrzejewski, B.P.; Sklar, L.A.; Ward, T.L.; López, G.P. *Adv. Mater.*, **2003**, *15*, 1262-1266.

¹³ Slowing, I.-I.; Vivero-Escoto, J. L.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 7924-7937.

¹⁴ (a) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J.W.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371. (b) Nguyen, T.D.; Tseng, H.-R.; Celeste, P.C.; Flood, A.H.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10029-10034.

¹⁵ Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J.I. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 4-13.

fotoquímicos,^{16,17,18,19,20,21,22} electroquímicos,^{23,24,25,26,27} iónicos (cambios de pH, presencia de determinados cationes y aniones),^{28,29,30,31,32,33} cambios de temperatura,³⁴ cambios de polaridad,³⁵ o la presencia de ciertas biomoléculas (enzimas, sistemas antígeno-anticuerpo, hebras simples de ADN, etc).³⁶ Todos

¹⁶ (a) Johansson, E.; Choi, E.; Angelos, S.; Liong, M.; Zink, J.I. *Sol-Gel Sci Technol*, **2008**, *46*, 313–322. (b) Angelos, S.; Choi, E.; Vögtle, F.; De Cola, L.; Zink, J.I. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 6589-6592.

¹⁷ Park, C.; Lee, K.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275-1278.

¹⁸ Ferris, D.P.; Zhao, Y.-L.; Khashab, N.M.; Khatib, H.A.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1686-1688.

¹⁹ Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10645-10647.

²⁰ Lin, H.-M.; Wang, W.-K.; Hsiung, P.-A.; Shyu, S.-G. *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 3256-3263.

²¹ Lai, J.; Mu, X.; Xu, Y.; Wu, X.; Wu, C.; Li, C.; Chen, J.; Zhao, Y. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7370-7372.

²² Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2101-2110.

²³ Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Giri, S.; Chen, H.T.; Lin, V.S.-Y. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853.

²⁴ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2007**, 3236-3245. (b) Torney, F.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y.; Wang, K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 295-300. (c) Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. (d) Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker, M.P.; Lin, V.S.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044.

²⁵ Fujiwara, M.; Terashima, S.; Endo, Y.; Shiokawa, K.; Ohue, H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4635-4637.

²⁶ Liu, R.; Zhao, X.; Wu, T.; Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14418-14419.

²⁷ Nguyen, T.D.; Liu, Y.; Saha, S.; Leung, K.C.-F.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 626-634.

²⁸ Yang, Q.; Wang, S.; Fan, P.; Wang, L.; Di, Y.; Lin, K.; Xiao, F.-S. *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 5999-6003.

²⁹ (a) Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Pentecost, C.D.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366. (b) Leung, K.C.-F.; Nguyen, T.D.; Stoddart, J.F.; Zink J.I. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5919-5928.

³⁰ Leung, K. C.-F.; Chak, C.-P.; Lo, C.-M.; Wong, W.-Y.; Xuan, S.; Cheng, C. H. K. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 364- 381.

³¹ Park, C.; Oh, K.; Lee, S.C.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1455-1457.

³² Guo, W.; Wang, J.; Lee, S.-J.; Dong, F.; Park, S. S.; Ha, C.-S. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 8641-8646.

³³ Liu, R.; Liao, P.; Zhang, Z.; Hooley, R. J.; Feng, P. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 5797-5799.

³⁴ Thomas, C. R.; Ferris, D. P.; Lee, J.-H.; Choi, E.; Cho, M. H.; Kim, E. S.; Stoddart, J. F.; Shin, J. -S.; Cheon, J.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10623-10625.

³⁵ Coll, C.; Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957-1959.

³⁶ (a) Schlossbauer, A.; Warncke, S.; Gramlich, F. M. E.; Kecht, J.; Manetto, A.; Carell, T.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 4734- 4737. (b) Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Bein,

estos materiales híbridos funcionalizados con ‘puertas nanoscópicas moleculares’ se han aplicado para la liberación controlada de colorantes y/o fluoróforos (ya que es muy fácil comprobar su funcionamiento mediante un cambio de color o mediante el aumento en la señal de emisión) y de moléculas bioactivas (vitaminas, antioxidantes, hormonas, anticancerígenos, etc.).^{37,38,39,40,41} La liberación de moléculas bioactivas puede tener gran interés en el campo de la alimentación, en bioquímica, en farmacología y en medicina.

3.1 ‘Puertas nanoscópicas moleculares’ en liberación controlada.

El empleo de soportes sólidos mesoporosos nanoestructurados para la liberación controlada de especies es muy prometedor, de gran interés y en los últimos años se han descrito numerosos ejemplos, con la clara intención de preparar sistemas que puedan ser empleados en diversos campos de la ciencia. Concretamente, la funcionalización de estos soportes mesoporosos con moléculas orgánicas que puedan actuar como ‘puertas moleculares’, que permitan la entrada-salida de especies químicas dentro o fuera de los mesoporos, es un área que se

T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092-3095. (c) Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614-16615. (d) Climent, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Maquieira, A.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281- 7283. (e) Patel, K.; Angelos, S.; Dichtel, W.R.; Coskun, A.; Yang, Y.-W.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383. (f) Klichko, Y.; Khashab N. -M.; Yang Y. -W.; Angelos S.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Microporous and Mesoporous Materials*, **2010**, *132*, 435-441. (g) Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Máñez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.

³⁷ Descalzo, A. B.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Hoffmann, K.; Rurack, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5924-5948.

³⁸ Saha, S.; Leung, K.C.F.; Nguyen. N.T.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Adv. Func. Mater.*, **2007**, *17*, 685-693.

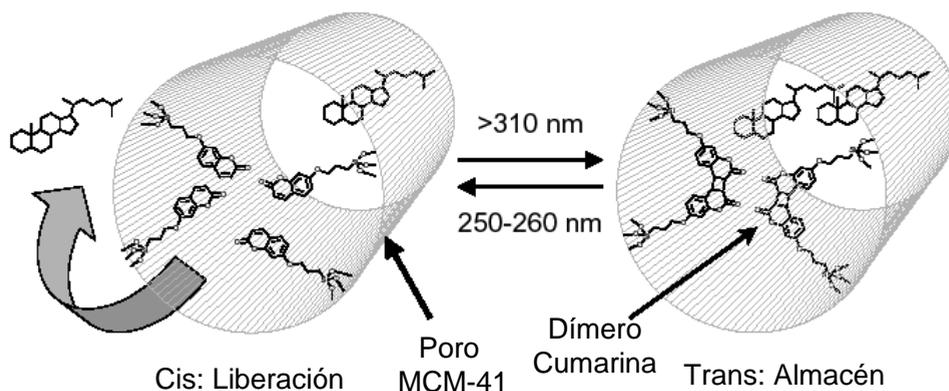
³⁹ Slowing, I.I.; Vivero-Escoto, J.L.; Wu, C.W.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 1278-1288.

⁴⁰ Aznar, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F., *Expert Opinion*, **2009**, *6*, 643-655.

⁴¹ Cotí, K.K.; Belowich, M.E.; Liong, M.; Ambrogio, M.W.; Lau, Y.A.; Khatib, H.A.; Zink, J.I.; Khashab, N.M.; Stoddart, J.F. *Nanoscale*, **2009**, *1*, 16-39.

está mostrando muy activa desde la publicación del trabajo de Mal, Fujiwara y colaboradores⁴² en *Nature* en el año 2003.

El grupo de investigadores japoneses dirigidos por Masahiro Fujiwara funcionalizaron la superficie externa de soportes mesoporosos tipo MCM-41 con derivados de una cumarina. Al irradiar este material con luz ultravioleta ($> 310 \text{ nm}$) se produce una fotodimerización intramolecular [2+2] de la cumarina que da lugar a la formación de un dímero conteniendo un anillo de ciclobutano. Este dímero voluminoso es capaz de obstruir la salida de los poros de la MCM-41, (ver Esquema 6). Para monitorizar la reacción de dimerización, la MCM-41 fue previamente cargada con moléculas de colestano. Así, la irradiación a longitudes de onda superiores 310 nm induce la fotodimerización de las moléculas de cumarina, cerrando los poros por la formación del dímero de ciclobutano y ocluyendo al colestano en el interior de los poros. Al irradiar el material a 250 nm , se revertía la reacción de dimerización dando lugar a la regeneración de las cumarinas y permitiendo la liberación de las moléculas de colestano del interior de los poros del material.

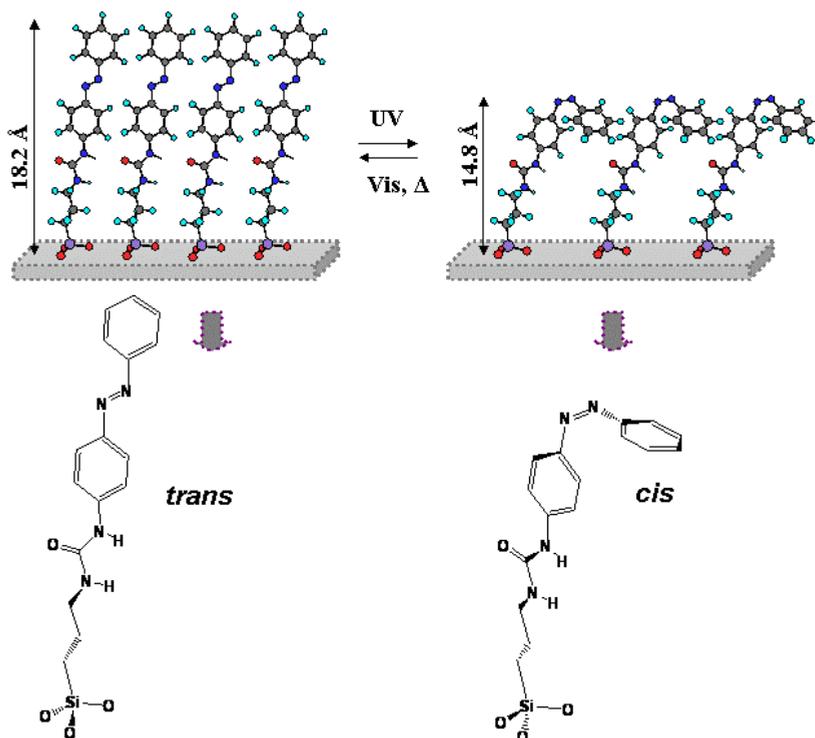


Esquema 6. Representación esquemática de la reacción de dimerización fotoinducida de la cumarina a $\lambda > 310 \text{ nm}$, y la ruptura del dímero y posterior liberación de la carga al irradiar con luz con $\lambda = 250 \text{ nm}$.

⁴² (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, 421, 350-353. (b) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, 15, 3385-3394. (c) Zhu, Y.; Fujiwara, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 2241-2244.

Otro ejemplo del uso de 'puertas nanoscópicas moleculares' con control fotoquímico, fue desarrollado por el grupo de investigación dirigido por Jeffrey Brinker.⁴³ Estos investigadores desarrollaron un material mesoporoso funcionalizado por co-condensación con un grupo activo de la familia de los azobencenos, caracterizados por dar procesos de fotoisomerización *cis-trans* reversibles. La radiación ultravioleta transforma los isómeros de la forma *trans* (estables con luz visible y a temperatura ambiente) en *cis*, mientras que la eliminación de la radiación ultravioleta, la calefacción o la irradiación con luz visible, revierten el sistema hacia la forma *trans*. La incorporación de estas moléculas foto-isomerizables en el interior de los poros en materiales mesoporosos tipo MCM-41, permite controlar el tamaño de los mismos mediante una simple irradiación. Así cuando el azobenceno está en su forma *trans* el poro está cerrado mientras que cuando se encuentra en la forma *cis* el poro se encuentra abierto habiendo una diferencia de tamaño de unos 6.8 Å (Esquema 7). Este foto-control externo del tamaño de poro afecta también al área superficial y a las propiedades de absorción del material.

⁴³ Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y. B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1731-1734.



Esquema 7. Representación esquemática de una ‘puerta nanoscópica molecular’ con control fotoquímico, mediante procesos de fotoisomerización, dando lugar al isómero *cis* del azobenceno con luz UV, y al isómero *trans* con luz visible o con altas temperaturas. Adaptado con permiso de *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 1731-1734. Copyright 2003 John Wiley & Sons.

Otro ejemplo de ‘puerta molecular’ con control fotoquímico, ha sido recientemente desarrollada por el grupo de Ramón Martínez Máñez y colaboradores.⁴⁴ El material preparado consiste en una ‘puerta molecular’ basada en la transformación reversible catalizada con luz que sufren los espirobenzopiranos. Los espirobenzopiranos son moléculas espirocíclicas neutras que, al irradiar con luz UV o en la oscuridad, sufren un proceso de transformación originando una merocianina polar con una carga positiva. La merocianina polar

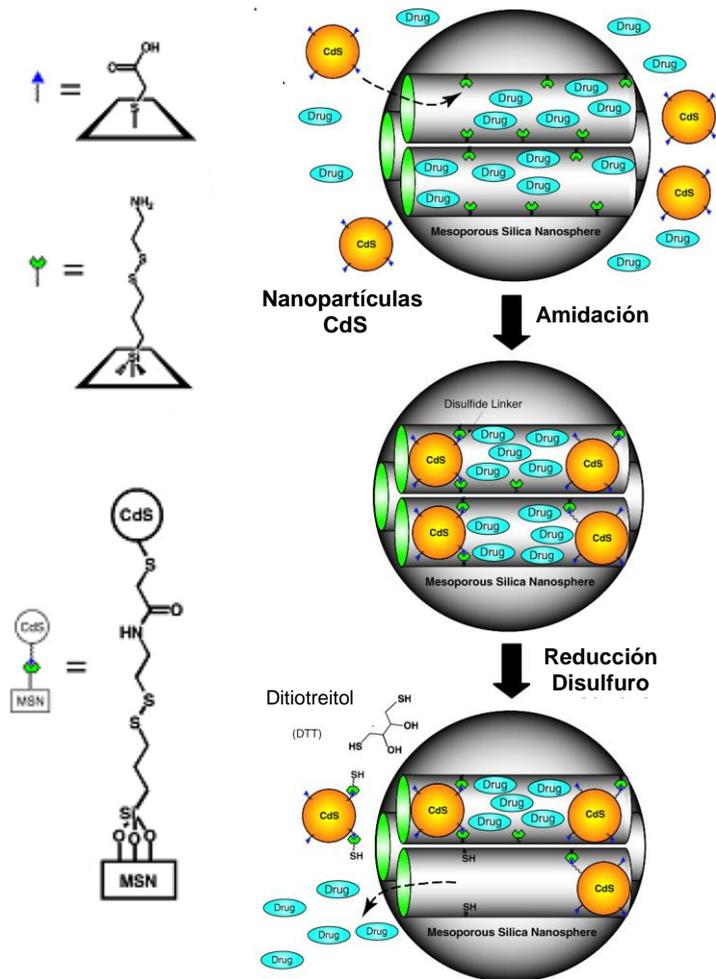
⁴⁴ Aznar, E.; Casasús, R.; García-Acosta, B.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, 19, 2228-2231.

puede ser transformada, de nuevo, en la forma espirocíclica mediante irradiación con luz visible o calentando. El material consiste en un soporte mesoporoso del tipo MCM-41 cuyos poros han sido cargados con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, necesario para la monitorización del funcionamiento del dispositivo. Posteriormente se anclan las moléculas de espirobenzopirano en la entrada de los poros. La 'puerta molecular' se cierra al irradiar el material con luz UV (la forma neutra espiropiránica se transforma en la merocianina que tiene una carga positiva) y al añadir al sistema dendrímeros PAMAM (poliamidoamina conteniendo grupos carboxilatos terminales) de generación 1.5 se produce una interacción electrostática que induce el bloqueo de los poros. La apertura de la 'puerta' se produce al irradiar el material con luz visible, debido a la transformación de la merocianina en el espirobenzopirano neutro que no presenta afinidad por la carga negativa de los dendrímeros, permitiendo la liberación de las moléculas de colorante ocluidas a la disolución (Esquema 8).

control electroquímico pueden ser empleados para liberación controlada de especies bio-activas en células ya que en el interior de estas es posible encontrar moléculas con capacidades redox como el ditiotreitól y el ácido dihidrolipoico.

Uno de los primeros ejemplos de este tipo de materiales con control electroquímico fue desarrollado por el grupo de Víctor S. -Y. Lin y colaboradores en el año 2003.⁴⁵ Este nuevo sistema consiste en nanopartículas de sílice mesoporosa del tipo MCM-41 funcionalizadas, mediante co-condensación, con 2-(propildisulfanil)etilamina. Las partículas mesoporosas fueron cargadas, antes de su funcionalización externa, con compuestos de interés en farmacología como el antibiótico vancomicina o el ATP. La salida de los poros se bloqueó mediante la adición de nanopartículas de sulfuro de cadmio funcionalizadas con el ácido mercaptoacético ya que este ácido da una reacción de amidación con los grupos 2-(propildisulfanil)etilamina presentes en la superficie de las nanopartículas mesoporosas. La adición de agentes reductores como el DTT (ditiotreitól) o el ME (mercaptoetanol), inducen la reducción del puente disulfuro que une las nanopartículas de sulfuro de cadmio con las de sílice permitiendo la liberación de la carga introducida (Esquema 9).

⁴⁵ (a) Lai, C.-Y.; Trewyn, B.G.; Jeftinija, D.M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459. (b) Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Giri, S.; Chen, H.-T.; Lin, V. S.-Y. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 846-853.

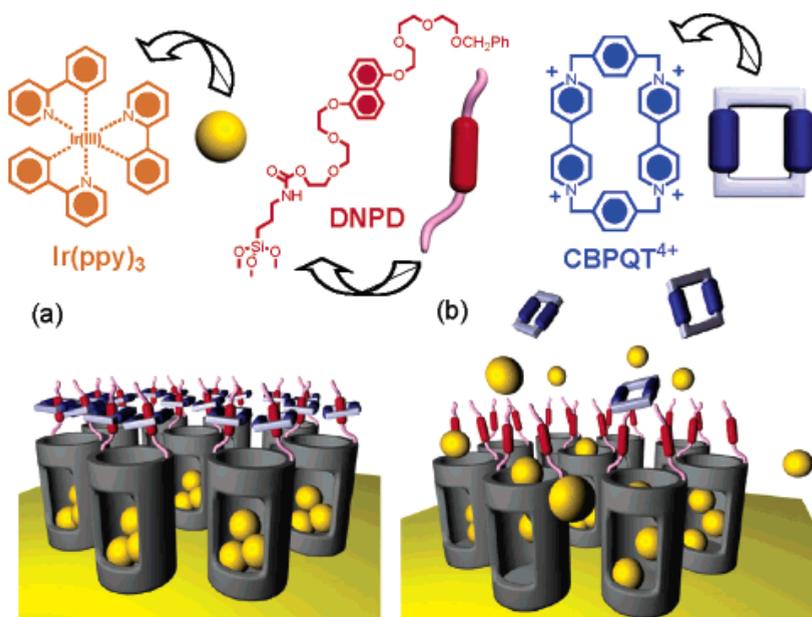


Esquema 9. Representación esquemática de nanopartículas de MCM-41 con nanopartículas de CdS bloqueando los poros. Al añadir un agente reductor se rompen los puentes disulfuro entre las nanopartículas y el sólido mesoporoso permitiéndose la liberación de las moléculas encapsuladas.

En el año 2004, el grupo de investigadores dirigidos por J. Fraser Stoddart prepararon una nanoválvula con mecanismo de ‘puerta molecular’ electroquímica.⁴⁶ Para preparar el material final, el interior de los poros fue

⁴⁶ Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371.

cargado con un complejo de iridio y, posteriormente, la superficie externa del mesoporoso funcionalizada con un derivado del 1,5-dioxonaftaleno (DNPD). La adición de paraquat-*p*-fenileno (CBPQT⁴⁺) induce la formación de un pseudotaxano (entre en DNPD y el CBPQT⁴⁺) sobre la superficie externa del mesoporoso que induce el bloqueo de los poros. Al añadir un agente reductor como el NaCNBH₃ se produce la ruptura del pseudotaxano con la consiguiente liberación del complejo de iridio a la disolución (Esquema 10).



Esquema 10. 'Puerta molecular' controlada electroquímicamente mediante el uso de pseudotaxanos. (a) Los orificios de los nanoporos están bloqueados por los pseudotaxanos, no permitiendo la salida de los mismos del complejo de Iridio. (b) La presencia de un agente reductor, libera la parte móvil CBPQT⁴⁺, permitiendo la liberación del complejo Ir(ppy)₃.

Cambios en la polaridad alrededor de los poros, es otra propiedad que se ha empleado recientemente en el desarrollo de 'puertas moleculares nanoscópicas'. La posibilidad de modular el entorno químico alrededor de los poros puede ser empleada tanto en el desarrollo de nuevos materiales para la

liberación controlada de especies, como en la preparación de materiales híbridos para el reconocimiento óptico de ciertas especies.

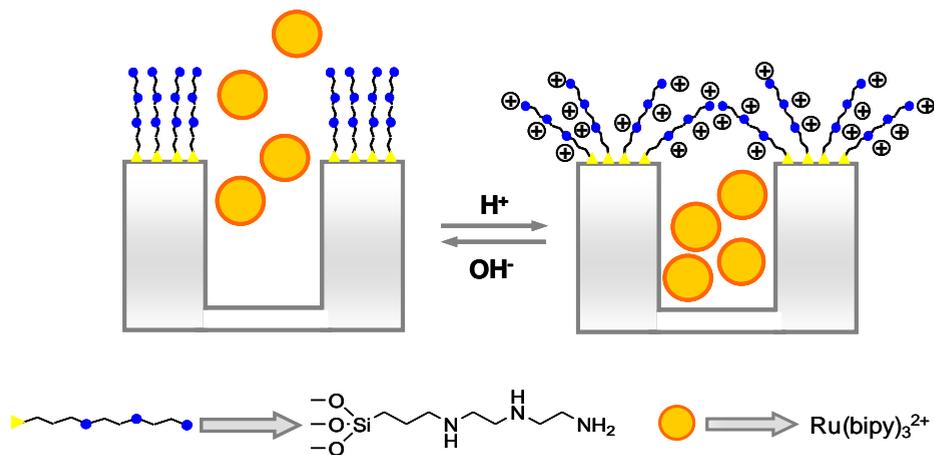
Uno de los pocos ejemplos de este tipo de soportes, esta basado en un material que es empleado como 'puerta molecular' y como sensor.³⁵ Los autores utilizan como soporte inorgánico un material silíceo del tipo MCM-41 calcinado (tamaño de poro de 2.5 nm) cuyos poros son cargados con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. A continuación se funcionalizó la superficie externa del sólido con una unidad coordinante, que en este caso es un derivado de imidazol con carga positiva. El catión imidazolato es capaz de formar complejos, mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, con carboxilatos. El comportamiento del material se ensayo en presencia de diferentes carboxilatos lineales ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$, $n = 0, 2, 4, 6, 8$ y 10). Las diferencias de longitud de la cadena de los carboxilatos empleados se traduce en diferente capacidad para "cerrar" la 'puerta molecular'. La coordinación de carboxilatos de cadena corta (como el acetato o el butanoato) induce la formación de una monocapa de carácter hidrófilo alrededor de los poros que permite la liberación del complejo mientras que la coordinación de carboxilatos de cadena larga (decanoato y dodecanoato) genera una monocapa muy hidrófoba alrededor de los poros inhibiendo la liberación del colorante (Esquema 11). Este material híbrido también puede emplearse como sensor colorimétrico de carboxilatos de cadena larga por que la presencia de estos es capaz de inhibir la liberación del complejo mientras que los carboxilatos de cadena corta no inhiben la liberación.

Esta escuaridina es azul y es capaz de reaccionar con grupos tiol dando lugar a un derivado incoloro.⁴⁸ A pH ácido las aminas se encuentran protonadas por lo que se produce la repulsión electrostática entre ellas y la 'puerta' se encuentra cerrada, el acceso a los poros de la escuaridina no es posible, y la disolución permanece azul. Por el contrario a pH neutro las aminas solo están parcialmente protonadas y la 'puerta' está abierta. Como consecuencia la escuaridina puede acceder al interior de los poros produciéndose la decoloración de la disolución debido a la reacción de esta con los grupos tiol anclados en el interior del material mesoporoso.

Años más tarde el mismo grupo de investigación desarrolló un mecanismo de 'puerta molecular' con control iónico en medio acuoso, funcionalizando por grafting la superficie externa de sólido mesoporoso tipo MCM-41 con poliaminas, previa carga de los poros con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$.⁴⁹ La adición de protones a la suspensión del material híbrido inducía la protonación de las poliaminas con la consiguiente repulsión electrostática entre ellas. Como consecuencia de esta repulsión los poros se bloqueaban y se inhibía la liberación del complejo a la disolución. La posterior basificación hasta pH neutro, hacía desaparecer las repulsiones electrostáticas, permitiendo el movimiento libre del complejo del interior de los poros a la disolución, como se observa en el esquema 12.

⁴⁸ Ros-Lis, J. V.; García-Acosta, B.; Jiménez, D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Gonzalvo, F.; Valldecabres, M. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4064-4065.

⁴⁹ Casasús, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1903-1917.



Esquema 12. Representación esquemática de una 'puerta nanoscópica molecular' en función del pH. Los ciclos de apertura y cierre son debidos a los procesos de protonación/desprotonación de las poliaminas ancladas en el exterior de los poros.

También se observó que el acceso a los poros se podía controlar en función del tamaño de los aniones que compensan las cargas de las aminas protonadas. Así, a pH 6.0, en presencia de aniones pequeños que dan interacciones débiles con aminas (por ejemplo cloruro), las 'puertas' permanecen abiertas, mientras que en presencia de aniones grandes capaces de interactuar fuertemente con las aminas (por ejemplo ATP) las 'puertas' permanecen cerradas. El efecto del ATP de inhibir la liberación del colorante del interior de los poros, ha permitido diseñar un sensor cromogénico para dicho anión.⁵⁰

En una evolución del concepto de material híbrido sensor se ha descrito un sólido capaz de detectar la presencia del anión borato en disolución mediante un cambio de color. Este material sensor se construyó empleando un soporte inorgánico mesoporoso del tipo MCM-41 con el complejo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ ocluido en el interior de los poros y con moléculas de gluconamida ancladas en la superficie

⁵⁰ Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 6661–6664.

externa de los poros.⁵¹ Cuando el material híbrido sensor se suspende en disoluciones acuosas a pH neutro se observa una liberación del complejo. Por el contrario, si en las suspensiones de este material se encuentra presencia de borato no se observa liberación de colorante debido a que este anión es capaz de formar boroésteres con los grupos hidroxilo de la gluconamida produciéndose un bloqueo de los poros. Por otro lado, el sistema actúa también como ‘puerta molecular’ con control iónico ya que a pH ácidos se produce la hidrólisis de los boroésteres. Como consecuencia de esta hidrólisis se observó la liberación del complejo de rutenio a la disolución, pudiéndose cerrar la ‘puerta’ basificando el medio hasta pH neutro.

En los últimos años, el grupo de investigación de J. Frasier Stoddart ha estado desarrollando diferentes nanoválvulas para el control de transporte de masa mediante cambios de pH. Estos nanodispositivos están basados en la formación de rotaxanos y [2]pseudorotaxanos con ciclodextrinas y derivados de cucurbit[6]urilo que inhiben la liberación de ciertas especies atrapadas en el interior de los poros.^{52,53} Al cambiar el pH del medio se induce el desensamblaje de los complejos supramoleculares produciéndose la liberación de la especie atrapada en el interior de los poros.

También se han preparado nanoválvulas con un soporte silíceo y nanopartículas de oro como elemento clave en el control del transporte de materia. El sistema está formado por un soporte inorgánico del tipo MCM-41 cuya superficie externa ha sido funcionalizada con una gluconamida. Los poros se

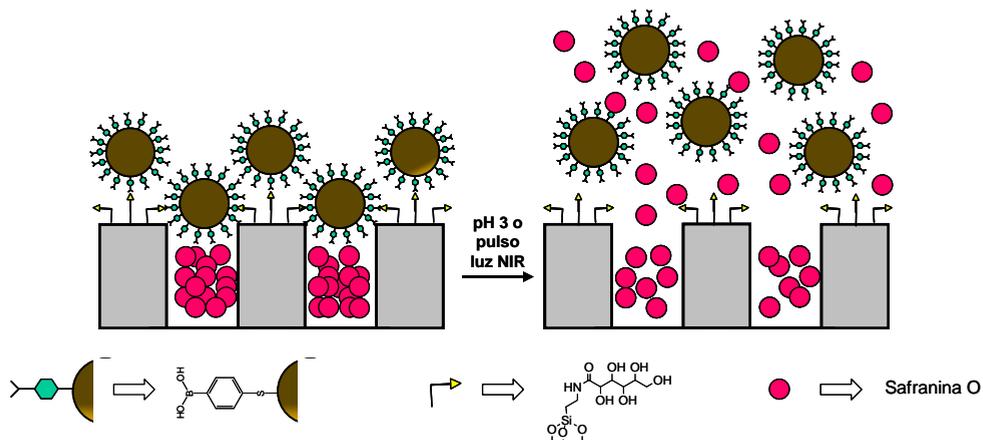
⁵¹ Aznar, E.; Coll, C.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruíz, E. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877-6888. *Chem. Eur. J.* 2009, *15*, 6877 – 6888.

⁵² (a) Angelos, S.; Yang, Y.-W.; Khashab, N.M.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11344-11346. (b) Angelos, S.; Yang, Y.-W.; Patel, K.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2222-2226. (c) Khashab, N.M.; Belowich, M.E.; Trabolsi, A.; Friedman, D.C.; Valente, C.; Lau, Y.; Khatib, H.A.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *Chem. Commun.*, **2009**, 5371-5373. (d) Angelos, S.; Khashab, N.M.; Yang, Y.-W.; Trabolsi, A.; Khatib, H.A.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 12912-12914. (e) Khashab, N.M.; Trabolsi, A.; Lau, Y.A.; Ambrogio, M.W.; Friedman, D.C.; Khatib, H.A.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 1669-1673. (f) Du, L.; Liao, S.; Khatib, H.A.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15136-15142.

⁵³ Liu, R.; Zhang, Y.; Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15128-15129.

bloquean al adicionar nanopartículas de oro funcionalizadas con ácidos borónicos (con un tamaño medio de 3 nm) debido a la formación de boroésteres.⁵⁴ El mecanismo de la 'puerta molecular' se basa en la reacción de hidrólisis reversible de los boroésteres, proceso que es función del pH del medio. Así, a pH neutro la 'puerta' se encuentra cerrada, ya que es un pH óptimo para la formación de los boroésteres, por lo tanto se producirá un bloqueo en la salida del colorante de los mesoporos. Por el contrario, al adicionar protones hasta alcanzar pH 3 se produce la hidrólisis de los boroésteres, permitiendo la liberación del colorante (safranina) que esta encapsulado en el interior de los poros del soporte inorgánico. Cuando se vuelve a aumentar el pH hasta 5 se regeneran los boroésteres y la liberación de la safranina queda inhibida debido al bloqueo de los poros con las nanopartículas de oro (Esquema 13). Los autores observaron que también se puede emplear la luz pulsada de un láser como estímulo para inducir la apertura de la 'puerta'. Esto es debido a que las nanopartículas de oro, que bloquean los poros, son capaces de absorber la radiación láser aumentando su temperatura localmente. Este calentamiento plasmónico es capaz de romper los enlaces boroéster y liberar el colorante atrapado en los poros.

⁵⁴ Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Guillem, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833-6843.



Esquema 13. Representación esquemática de una ‘puerta nanoscópica molecular’ que emplea, como estímulo externo, cambios en el pH del medio. Así la formación de boroésteres bloquea la salida de los poros a pH neutro, y la hidrólisis de este enlace a pH ácido (o en presencia de luz pulsada) permite la liberación de la carga.

En los últimos años han empezado a desarrollarse ‘puertas moleculares nanoscópicas’ que emplean biomoléculas como llaves para controlar el transporte de materia en estos nanodispositivos. En esta nueva aproximación, las biomoléculas son capaces de modificar la superficie de los soportes mesoporosos permitiendo la liberación controlada de especies químicas encapsuladas en el interior de los poros del material. Más concretamente, los soportes de sílice mesoporosos pueden ser funcionalizados con moléculas de naturaleza biológica como azúcares, anticuerpos, péptidos, oligonucleótidos,⁵⁵ capaces de liberar su carga por mecanismos de hidrólisis provocados por enzimas,^{56,57} por la presencia de un oligonucleótido complementario,^{36d} por un antígeno específico, etc.

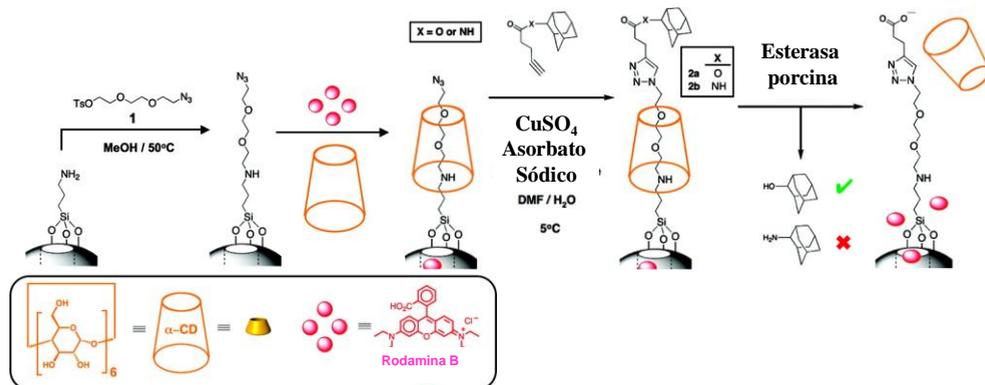
Uno de los primeros ejemplos de estas ‘puertas moleculares’ con carácter biológico fue desarrollado por el grupo de investigadores dirigidos por J. Fraser Stoddart. El material híbrido está basado en nanopartículas mesoporosas de sílice,

⁵⁵ Schlossbauer, A.; Warncke, S.; Gramlich, F. M. E.; Kecht, J.; Manetto, A.; Carell, T.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 4734-4737.

⁵⁶ Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092-3095.

⁵⁷ Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614-16615.

capaces de almacenar pequeñas moléculas en el interior de los poros y liberarlas controladamente por activación catalítica de una enzima hidrolítica como la esterasa de hígado porcino (PLE).^{36e,36f} Concretamente el material contiene rodamina B en el interior de los poros y un rotaxano formado entre el trietilenglicol y una α -ciclodextrina (azúcar cíclico de 6 unidades). Para evitar el proceso de desensamblaje del rotaxano, este se funcionaliza en su parte superior, mediante la formación de un éster, con una molécula de adamantano. De esta forma el rotaxano voluminoso, que está anclado en la superficie de las nanoparticulas, inhibe la liberación de la rodamina B. Al añadir a las suspensiones del material la enzima PLE se produce la hidrólisis del grupo éster liberándose el adamantano y produciéndose el desensamblaje del rotaxano. De esta forma las moléculas de rodamina B pueden difundir libremente del interior de los poros a la disolución (Esquema 14).



Esquema 14. Representación esquemática de una 'puerta nanoscópica molecular' con control enzimático. La hidrólisis de un enlace éster y el desensamblaje de un rotaxano es el mecanismo responsable de la liberación.

Otro ejemplo de 'puerta molecular' de carácter biológico fue recientemente publicado por el grupo de investigación dirigido por Ramón Martínez Mañez.^{36g} El material híbrido preparado está formado por un soporte mesoporoso del tipo MCM-41 que contiene el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en el interior de los poros. La superficie externa se funcionalizó, en un segundo paso, con un hapteno del sulfatiazol (una sulfonamida). Al añadir un anticuerpo policlonal (obtenido por inmunización con el

hapteno del antígeno sulfatiazol) se produce el bloqueo de los poros debido a la interacción hapteno-anticuerpo. Al adicionar el sulfatiazol a suspensiones acuosas del material se produce el desplazamiento del anticuerpo de la superficie del material (la interacción antígeno-anticuerpo es mas fuerte que la hapteno-anticuerpo) con la consiguiente liberación del colorante atrapado en los poros.

Todos estos materiales híbridos que pueden ser abiertos en presencia de biomoléculas pueden ser empleados para la liberación controlada de principios activos, fragmentos de ADN o ARN, marcadores o trazadores y una gran variedad de moléculas de interés farmacológico y médico en células. Gran parte del trabajo que se ha llevado a cabo en la presente tesis doctoral esta encaminado hacia la preparación de este tipo de nanomateriales, al estudio de su internalización en células y a la demostración de que pueden ser empleados para la liberación controlada *in vivo*.

3.2 Liberación controlada intracelular.

En la actualidad, uno de los campos más desarrollados y con mayor proyección en medicina y farmacología, es la aplicación de nanopartículas en el campo de la nanobiomedicina. Uno objetivos de estas nanopartículas será la internalización en células y su aplicación en liberación controlada.

La gran parte de los estudios existentes relacionados con la liberación controlada de antitumorales, péptidos o fragmentos de ácidos nucleicos en un célula específica están basados en el empleo de polímeros orgánicos como soporte. Estos polímeros son capaces de liberar su carga mediante procesos de difusión controlada o por degradación del polímero.^{58,59,60,61,62,63,64}

⁵⁸ Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *277*, 119-131.

⁵⁹ Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K.L. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 3-13.

⁶⁰ Traitel, T.; Goldbart, R.; Kost, J. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2008**, *19*, 755-767.

⁶¹ Puoci, F.; Iemma, F.; Picci, N. *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 85-96.

⁶² Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R.; Bodmeier, R. *J. Control, Release*, **2008**, *125*, 1-15.

⁶³ Harrison, K. *Biomed. Polym.*, **2007**, 33-56.

⁶⁴ Nair, L.S.; Laurenciana, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762-798.

Actualmente se están desarrollando varios sistemas de liberación que emplean soportes de sílice mesoporosos (SMPS), como alternativa a los materiales polímeros, para la encapsulación y liberación controlada de fármacos, antitumorales y moléculas orgánicas.^{65,66,67,68,69,70}

Un ejemplo de internalización celular ha sido descrito por Víctor S. –Y. Lin y colaboradores.⁷¹ Los investigadores citados fueron capaces de demostrar que nanopartículas de sílice mesoporosas son capaces de internalizarse dentro de las células, por mecanismos de endocitosis (Esquema 15).

⁶⁵ Schmaljohann, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2006**, *58*, 1655-1670.

⁶⁶ Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.

⁶⁷ Lu, J.; Choi, E.; Tamanoi, F.; Zink, J.I. *Small*, **2008**, *4*, 421-426.

⁶⁸ (a) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin V. S. –Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845-8849.

(b) Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 1225-1236.

(c) Vivero-Escoto, J.L.; Slowing, I.I.; Wu, C.–Y.; Lin, V.S.–Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*,

3462-3463. (d) Mortera, R.; Vivero-Escoto, J.; Slowing, I.I.; Garrone, E.; Onida, B.; Lin,

V.S.–Y. *Chem. Commun.*, **2009**, 3219-3221. (e) Zhao, Y.; Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Lin,

V.S.–Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8398-8400. (f) Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.;

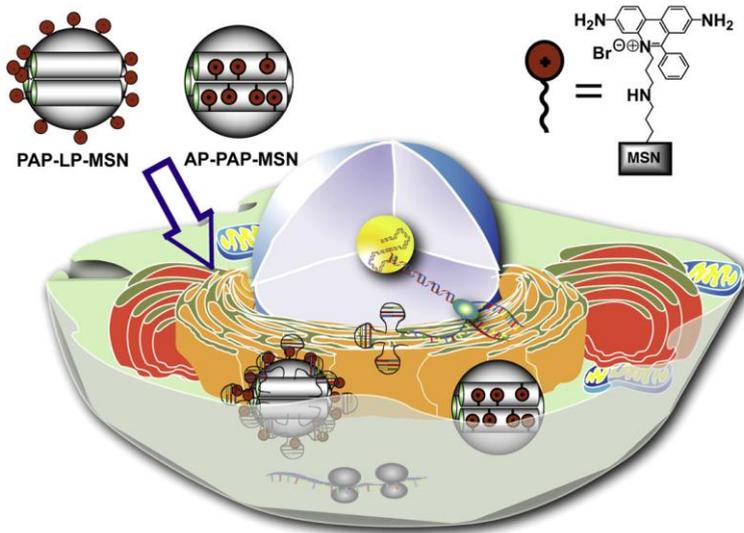
Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Small*, **2010**, *6*(18), 1952-1967. (g) Zhao, Y.; Vivero-Escoto, J.

L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2010**, *7*(9), 1013-1029.

⁶⁹ Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Zhao, Y.- L.; Tamanoi, F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.; Nel, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12690-12697.

⁷⁰ Kim, H.; Kim, S.; Park, C.; Lee, H.; Park, H. J.; Kim, C. *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 4280-4283.

⁷¹ Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Lin, V. S.-Y. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 1325-1333.



Esquema 15. Representación esquemática de los procesos de internalización celular de nanopartículas de sílice mesoporosas. Adaptado con permiso de *Biomaterials*, 2010, 31, 1325-1333. Copyright 2010 Elsevier B.V.

Uno de los objetivos a cumplir, durante la realización de la presente tesis doctoral, va a ser el desarrollo de materiales mesoporosos híbridos orgánico-inorgánicos con ‘puertas nanoscópicas moleculares’ y su aplicación para la liberación controlada de moléculas de interés biológico.

3.3 Biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de un fármaco es un término farmacocinético que indica la fracción de dosis de fármaco administrada, que alcanza su diana terapéutica, es decir, que llega hasta el tejido sobre el que realiza su actividad. Esta cuantificación, necesaria para dar operatividad al concepto, es prácticamente imposible de hallar en el hombre. Por ello, se considera equivalente a los niveles alcanzados en la circulación sistémica del paciente, circulación que va desde el corazón a los tejidos. Así pues, en la práctica, la biodisponibilidad es el porcentaje de fármaco que aparece en plasma. En conclusión, biodisponibilidad se define como la fracción inalterada de un fármaco que llega a la circulación sistémica,

después de su administración por cualquier vía (intravenosa, intramuscular, oral, etc.).

Esa biodisponibilidad sufre en ocasiones una importante disminución en la administración oral, debido a degradación de los fármacos o moléculas bioactivas en la digestión estomacal, por el pH ácido del medio. Por tanto, es de interés, el conseguir materiales que sean capaces de preservar los fármacos de las condiciones ácidas del estómago y que puedan liberar el compuesto activo de forma controlada por ejemplo en el intestino.

El concepto de biodisponibilidad unido a la ciencia de los materiales puede derivar en la preparación de nanomateriales funcionalizados con 'puertas moleculares' que sean capaces de proteger las moléculas bioactivas en ciertas condiciones extremas y permitir la liberación a la carta en los sitios en los que las moléculas encapsuladas tengan que ejercer su acción.

Objetivos.

Objetivos.

El objetivo principal que se pretende alcanzar en la presente tesis doctoral es el *desarrollo de nuevos materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionalizados con moléculas orgánicas que actúen como 'puerta nanoscópica molecular' que se abra o cierre en función de un estímulo externo bajo demanda.*

Dentro de este objetivo principal se pueden enumerar una serie de objetivos más concretos que están relacionados con las aplicaciones para las que se van a desarrollar los materiales con 'puertas moleculares nanoscópicas'. Así se pretende:

- Preparar y caracterizar materiales híbridos orgánico-inorgánicos empleando soportes mesoporosos del tipo MCM-41 funcionalizados con 'puertas moleculares' controladas por pH.

- Estudiar la protección de determinados fármacos y vitaminas de la degradación que sufren en las condiciones ácidas del estómago mediante el uso de materiales con 'puertas moleculares' controladas por el pH. Un requisito fundamental de estos materiales es que la 'puerta molecular' este cerrada a pH ácido (estómago) y que se abra a pH neutro (intestino). De esta forma se preservará a la especie activa hasta que pueda absorberse por las paredes intestinales y llegar al metabolismo celular.

- Desarrollar dispositivos nanoscópicos con mecanismo de 'puerta molecular' empleando moléculas orgánicas de interés biológico y que se abran en presencia de determinadas enzimas. Estos materiales híbridos deben de ser capaces de ocluir la carga en el interior de los mesoporos a su paso por el estómago y que luego liberen la especie encapsulada en presencia de las enzimas que están presentes en el intestino.

- Búsqueda de moléculas bioactivas que puedan ser liberadas controladamente por mecanismos ya estudiados, o por nuevos mecanismos a desarrollar, que sean de interés en diferentes campos como la biología, la bioquímica, la tecnología de los alimentos, la farmacología y la medicina.

- Aplicación de las nanopartículas de sílice mesoporosas como 'puertas nanoscópicas moleculares' en el campo de la biomedicina. Se estudiarán el encapsulado de antitumorales en el interior de los mesoporos, dirección de las nanopartículas a células específicas, procesos de internalización de las nanopartículas en células cancerosas y no cancerosas, estudio de la viabilidad de las mismas en presencia de las nanopartículas, y estudios de liberación controlada del antitumoral ocluido en células cancerosas al aplicar un estímulo capaz de abrir la 'puerta' en el interior celular. Esta liberación se producirá gracias a la presencia de macromoléculas biológicas tipo enzimas, que actuarán como estímulo externo, controlando la apertura o cierre de las 'puertas moleculares' bajo demanda.

Capítulo 1: Liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina, mediante el uso de materiales híbridos funcionalizados con poliaminas.

1 Liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina, mediante el uso de materiales híbridos funcionalizados con poliaminas.

1.1 Introducción.

1.1.1 Liberación controlada.

El estudio de materiales híbridos orgánico-inorgánico es un área de la ciencia que ha despertado un gran interés en los últimos años. Estos materiales híbridos se obtienen al combinar materiales inorgánicos (que pueden actuar como soporte 'pasivo' o 'activo') con moléculas orgánicas que se suelen anclar, mediante un enlace covalente, sobre el soporte. El resultado de esta combinación ha dado lugar a la preparación de multitud de materiales híbridos orgánico-inorgánicos con propiedades sinérgicas, que difícilmente se pueden obtener con el soporte o las moléculas orgánicas por separado y que pueden ser aplicados en diversos campos de la ciencia. Concretamente el interés de la presente tesis se centra en el reconocimiento molecular,^{72,73} y en la liberación controlada de moléculas.⁷⁴

Como se ha comentado arriba, muchos de estos sistemas consisten en materiales inorgánicos que se funcionalizan con moléculas orgánicas, para dar lugar a los materiales híbridos, con características diferentes al material o a la molécula orgánica inicial. Este tipo de materiales híbridos han sido extensamente empleados en catálisis heterogénea,⁷⁵ remediación de especies de interés

⁷² (a) Descalzo, A. B.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Hoffmann, K.; Rurack, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924-5948. (b) Ariga, K.; Vinu, A.; Hill, J. P.; Mori, T.; *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2562-2591.

⁷³ (a) Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081-3093. (b) Ariga, K.; Hill, J. P.; Lee, M. V.; Vinu, A.; Charvet, R.; Acharya, S. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2008**, *9*, 014109-014204.

⁷⁴ Fu, Q.; Rao, G.V.R.; Ista, L.K.; Wu, Y.; Andrzejewski, B.P.; Sklar, L.A.; Ward, T.L.; López, G.P. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1262-1266.

⁷⁵ Corma, A. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 2373-2419.

medioambiental,⁷⁶ en el reconocimiento de cationes y aniones⁷⁷ y para la liberación controlada de especies químicas.^{78,79,80} Un concepto interesante estrechamente relacionado con el empleo de materiales híbridos orgánico-inorgánicos para liberación controlada es el desarrollo de ‘puertas nanoscópicas moleculares’.⁸¹ Estas ‘puertas nanoscópicas moleculares’ son dispositivos formados por un soporte inorgánico poroso con ciertas moléculas orgánicas ancladas en la superficie del material y que permiten un control de la entrada/salida de masa en los poros. Este control (apertura/cierre de la puerta) es idealmente reversible y puede ser conmutado a voluntad mediante la aplicación de un estímulo externo que cambia alguna de las propiedades de las moléculas que actúan como ‘puerta’. En los últimos años se han descrito innumerables aplicaciones del concepto de ‘puerta’ sobre superficies, en membranas,⁸² para el diseño de canales artificiales⁸³ y recientemente en soportes sólidos de sílice mesoporosa, tipo la MCM-41.⁸⁴

⁷⁶ (a) Ros-Lis J. V.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Rurack, K.; Soto, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4405-4407. (b) Lee, S. J.; Bae, D. R.; Han, W. S.; Lee, S. S.; Jung, J. H. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 1559-1564.

⁷⁷ (a) Balaji, T.; El-Safty, S.A.; Matsunaga, H.; Hanaoka, T.; Mizukami, F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7202-1208. (b) El-Safty, S. A.; Ismail, A. A.; Matsunaga H.; Mizukami, F. *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 9245-9255.

⁷⁸ Saha, S.; Leung, K.C.F.; Nguyen. N.T.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Adv. Func. Mater.*, **2007**, *17*, 685-693.

⁷⁹ Slowing, I.I.; Vivero-Escoto, J.L.; Wu, C.W.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 1278-1288.

⁸⁰ Cotí, K.K.; Belowich, M.E.; Liong, M.; Ambrogio, M.W.; Lau, Y.A.; Khatib, H.A.; Zink, J.I.; Khashab, N.M.; Stoddart, J.F. *Nanoscale*, **2009**, *1*, 16-39.

⁸¹ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.* **2007**, 3236-3245. (b) Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225-1236.

⁸² (a) Jung, Y.; Bayley, H.; Movileanu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15332-15340. (b) Joseph, S.; Mashl, R. J.; Jakobsson, E.; Aluru, N.- R. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1399-1403. (c) Jeong, B.; Gutowska, A. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 305-311. (d) Rusell, T. P. *Science*, **2002**, *297*, 964-967. (e) Ding, Z. L.; Fong, R. B.; Long, C. J.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. *Nature*, **2001**, *411*, 59-62. (f) Galaev, I. Y.; Mattiasson B. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 335-340. (g) Okano, T.; Bae, Y. H.; Jacobs, H.; Kim, S. W. *J. Controlled Release* **1990**, *11*, 255-265. (h) Sugawara, M.; Kojima, K.; Sazawa, H.; Umezawa, Y. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2842-2846.

⁸³ (a) Yamaguchi, T.; Ito, T.; Sato, T.; Sginbo, T.; Nakao, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4078-4079. (b) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19-34.

⁸⁴ Aznar, E.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F., *Expert Opinion*, **2009**, *6*, 643-655.

Como ya se ha comentado en la introducción, desde el primer trabajo de aplicación de un material mesoporoso con mecanismo de 'puerta molecular' desarrollado por Fujiwara,⁸⁵ y los posteriores trabajos de Lin,^{86,87} Zink/Stoddart,^{88,89} Martínez Máñez^{90,91} y otros grupos,⁹² se está potenciando actualmente el estudio y desarrollo de estas 'puertas moleculares', con el objeto de mejorar su diseño y para buscar nuevas aplicaciones, dentro de campos como la

⁸⁵ (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, *421*, 350-353. (b) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3385-3394. (c) Zhu, Y.; Fujiwara, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2241-2244. (d) Fujiwara, M.; Terashima, S.; Endo, Y.; Shiokawa, K.; Ohue, H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4635-4637.

⁸⁶ Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Giri, S.; Chen, H.T.; Lin, V.S.-Y. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853.

⁸⁷ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2007**, 3236-3245. (b) Torney, F.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y.; Wang, K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 295-300. (c) Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. (d) Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker, M.P.; Lin, V.S.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044. (e) Lai, C.-Y.; Trewyn, B.G.; Jeftinija, D.M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459. (f) Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Giri, S.; Chen, H.-T.; Lin, V. S.-Y. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 846-853.

⁸⁸ (a) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J.W.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371. (b) Nguyen, T.D.; Tseng, H.-R.; Celeste, P.C.; Flood, A.H.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10029-10034. (c) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371.

⁸⁹ (a) Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J.I. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 4-13. (b) Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Pentecost, C.D.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366. (c) Leung, K.C.-F.; Nguyen, T.D.; Stoddart, J.F.; Zink J.I. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5919-5928.

⁹⁰ (a) Casasús, R.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D.; Guillem, C.; Latorre, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612-8613. (b) Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6661-6664. (c) Casasús, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1903-1917.

⁹¹ (a) Aznar, E.; Casasús, R.; García-Acosta, B.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2228-2231. (b) Coll, C.; Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957-1959. (c) Aznar, E.; Coll, C.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877-6888. (d) Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Guillem, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833-6843. (e) Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Mañez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.

⁹² (a) Park, C.; Lee, K.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275-1278. (b) Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y. B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 1731-1734. (c) Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10645-10647.

nanociencia, la nanotecnología y la nanomedicina. La posibilidad de aplicar distintos estímulos externos (fotoquímicos, electroquímicos, iónicos, cambios de polaridad, presencia de ciertas bio-moléculas, etc) para liberar bajo demanda ciertas especies de interés (fármacos, proteínas, fragmentos de ADN y ARN, enzimas, etc) hace muy atractivo el desarrollo y el estudio de este tipo de materiales híbridos.

Un ejemplo desarrollado para la liberación controlada de moléculas bioactivas, fue desarrollado por Wu y colaboradores. Estos investigadores prepararon un material de sílice mesoporoso, que era capaz de liberar vitamina B₁ o tiamina de forma controlada, en función del tipo de organosilano y la concentración del mismo con el que funcionalizaban la superficie del material. Al aumentar la longitud de la cadena del organosilano y la concentración del mismo, disminuye la liberación de la vitamina. Por el contrario, la presencia de organosilanos de cadena corta en baja concentración, permite la liberación de la vitamina B₁ o tiamina de manera controlada.⁹³

Por otro lado, una de las aplicaciones más atractivas de estos materiales híbridos funcionalizados con 'puertas moleculares' es en el campo de la nanomedicina. Concretamente, la posibilidad de encapsular ciertas sustancias en estos materiales y liberarlas sólo en el órgano o tejido requerido es un concepto innovador que puede dar lugar a tratamientos clínicos a la carta.

Otro factor a tener en cuenta es que la encapsulación de determinados fármacos o especies activas en estos materiales puede servir también como protección frente a medios adversos en los que se pueden degradar antes de alcanzar su diana y ejercer su acción terapéutica. Un caso específico de esta última aproximación sería la preparación de 'puertas moleculares' controladas por pH que posean la capacidad particular de proteger la carga (es este caso moléculas bioactivas sensibles a pH ácidos) de las condiciones ácidas del estómago (puerta cerrada), pero liberar la carga en el intestino a pH neutro (puerta abierta).

⁹³ Wu, Z.; Jiang, Y.; Kim, T.; Lee, K.; *Journal of Controlled Release*. **2007**, *119*, 215-221.

La liberación controlada de moléculas bioactivas es un campo de la ciencia muy estudiado en los últimos años. Un ejemplo de liberación controlada de moléculas bioactivas controladas por el pH usando materiales silíceos fue presentado recientemente por Kawi y colaboradores. Para ello funcionalizaron un soporte de sílice poroso SBA-15 con aminas, en concreto con la 3-aminopropiltriétoxosilano, y posteriormente cubrían las partículas con ácido acrílico.⁹⁴ Este material híbrido se empleó para la liberación controlada de la proteína seroalbúmina bovina (BSA). Los autores encontraron que la proteína se liberaba a pH neutro pero no a pH ácido. Las interacciones por enlace de hidrógeno entre el grupo amino protonado y las moléculas de ácido acrílico, que aparecen a pH ácido, ocluyen a las proteínas en el interior de los poros inhibiendo su liberación mientras que a pH neutro estas interacciones desaparecen permitiendo así la liberación de la carga.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando el interés que tienen las vitaminas desde el punto de vista médico y biológico se decidió estudiar la protección de estos compuestos mediante su encapsulamiento en un material híbrido funcionalizado con 'puertas moleculares' sensibles al pH. Para esta aplicación específica se debe de preparar un material híbrido capaz de estar completamente cerrado a pH ácido, y totalmente abierto a pH neutro. Para ello se debe seleccionar como moléculas que actuarán como puerta aquellas que sean sensibles a cambios de pH como puedan ser aminas (se pueden protonar a pH bajos) o carboxilatos (se pueden desprotonar a pH neutros o básicos). Como consecuencia de estos procesos de protonación/desprotonación se producen cambios de tamaño/forma o la aparición de interacciones de atracción/repulsión electrostática que son la base de los procesos de liberación controlada observados en estos materiales.

1.1.2 Vitaminas.

Las vitaminas son sustancias imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos, son esenciales para la salud

⁹⁴ Song, S. -W.; Hidajat, K.; Kawi, S. *Chem. Commun.* **2007**, 42, 4396-4398.

humana, pero no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que este sólo puede obtenerlos por ingestión directa. Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos hidrosolubles y liposolubles. Como su propio nombre indica las vitaminas hidrosolubles se disuelven en agua y suelen actuar como coenzimas promoviendo distintas funciones químicas en los organismos vivos. Dentro de este grupo están las más conocidas como la tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), el ácido nicotínico (vitamina B₃), el ácido pantoténico, la piridoxina, la biotina, el ácido fólico, la vitamina B₁₂, el ácido lipoico y el ácido ascórbico (vitamina C). Las vitaminas liposolubles son solubles en disolventes apolares como las grasas, solamente deben de ser ingeridas por los animales superiores y no suelen actuar como coenzimas. Dentro de este grupo se pueden citar por su importancia a las vitaminas A, D, E y K. Pese a su importancia estas sustancias son susceptibles a la oxidación, la luz, las altas temperaturas y al pH. Es conocido que la digestión en el estómago, disminuye la concentración de vitaminas y otras muchas moléculas de interés biológico, debido al pH ácido del medio. Una forma de proteger a las vitaminas de este pH ácido es mediante la encapsulación en un soporte que las proteja de agentes externos y que sea capaz de liberarlas en función del pH del medio.

De todas las vitaminas hidrosolubles una de las más importantes es la vitamina B₂ o riboflavina. La vitamina B₂ o riboflavina (ver figura 1.1) es una vitamina hidrosoluble que participa en el metabolismo de proteínas y glúcidos, efectúa una actividad oxigenadora, por ello interviene en la respiración celular, interviene en la integridad de la piel, mucosas y el sistema ocular, por tanto la vista. La vitamina B₂ o riboflavina es además necesaria para activar la vitamina B₆, la cual ayuda a crear la vitamina B₃ o niacina, y al funcionamiento de la glándula suprarrenal. También se emplea para la formación de glóbulos rojos, producción de anticuerpos y ayuda a aumentar el crecimiento. La vitamina B₂ o riboflavina es continuamente excretada en la orina de personas sanas con lo que la deficiencia es relativamente común cuando el consumo de la misma en la dieta es insuficiente. Los síntomas de deficiencia de vitamina B₂ o riboflavina son labios rajados y rojos, inflamación de boca y lengua, úlceras de boca, grietas en las esquinas de la boca, dolor de garganta, etc. La ingesta diaria recomendada de

vitamina B₂ o riboflavina es 1.6 mg por día para los hombres, y 1.2 mg por día para las mujeres.

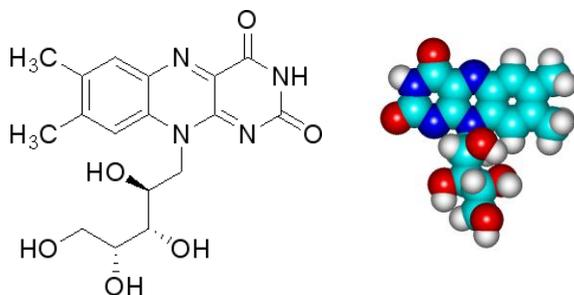


Figura 1.1. Estructura molecular de la vitamina B₂ o riboflavina.

En el presente capítulo se va a desarrollar un material capaz de liberar controladamente la vitamina B₂ o riboflavina, en función del pH. Para ello se seleccionan micropartículas de sílice mesoporosas del tipo MCM-41 como soporte inorgánico. Los poros del soporte inorgánico se cargarán con la vitamina B₂ o riboflavina y la superficie exterior se funcionalizará con poliaminas, que son las moléculas que van a actuar como ‘puerta molecular’ permitiendo la liberación controlada de la vitamina mediante cambios en el pH.⁹⁵ Un sistema similar fue descrito por el grupo de investigación de Ramón Martínez Máñez en 2004,⁹⁰ (ver capítulo introducción).

1.2 Resultados y discusión.

1.2.1 Síntesis del material.

La funcionalización de materiales de sílice mesoporosos con moléculas orgánicas a modo de ‘puerta’, ha demostrado ser un punto de partida prometedor a la hora de desarrollar sólidos nanoscópicos que permitan la liberación controlada de carga ocluida en el interior de los poros. La respuesta de las ‘puertas nanoscópicas moleculares’ está controlada por dos factores diferentes: (i) el

⁹⁵ Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Soto, J. J. *Control. Release*, **2008**, 131, 181-189.

mecanismo de ‘apertura’ o ‘cierre’ inducido mediante la aplicación de ciertos estímulos externos y (ii) la selección del material mesoporoso donde se va a anclar la ‘puerta’. Para este trabajo se ha escogido el material mesoporoso MCM-41 como matriz inorgánica, ya que este soporte presenta una serie de características favorables como su porosidad homogénea, alta inercia química, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización mediante la química de los alcoxisilanos.^{96,97,98,99}

El material MCM-41 contiene una disposición regular de poros de un tamaño comprendido entre 2 y 3 nm que permiten el cargado y liberación de moléculas de manera rápida. Además se puede funcionalizar la superficie externa de los poros con diferentes moléculas orgánicas que pueden actuar como ‘puertas’ permitiendo un control fino en la liberación.

Se ha elegido como moléculas ‘puerta’ poliaminas conteniendo varios átomos de nitrógeno separados por puentes etileno. Las poliaminas son moléculas sensibles al pH (los átomos de nitrógeno que contienen se pueden protonar) y que pueden, adicionalmente, formar complejos con aniones mediante interacciones electrostáticas y/o mediante formación de enlaces de hidrógeno en un amplio rango de pH. Las ‘puertas nanoscópicas moleculares’ son preparadas mediante el anclaje de agrupaciones poliamínicas en la superficie externa de los poros de la MCM-41. La poliamina elegida, es la 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil trimetoxisilano, **N3**, capaz de unirse al material mesoporoso MCM-41, mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos silanol de la superficie de la MCM-41. Esta poliamina ha sido seleccionada por su volumen y por la presencia de tres átomos de nitrógeno protonables con distintos valores de pK_a . El grado de

⁹⁶ (a) El Haskouri, J.; Ortiz de Zarate, D.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A. B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Mañez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2002**, *4*, 330-331. (b) Comes, M.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1783-1786. (c) Comes, M.; Rodríguez-López, G.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2919-2922.

⁹⁷ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C. & Beck, J. S. *Nature*, **1992**, *359*, 710-712.

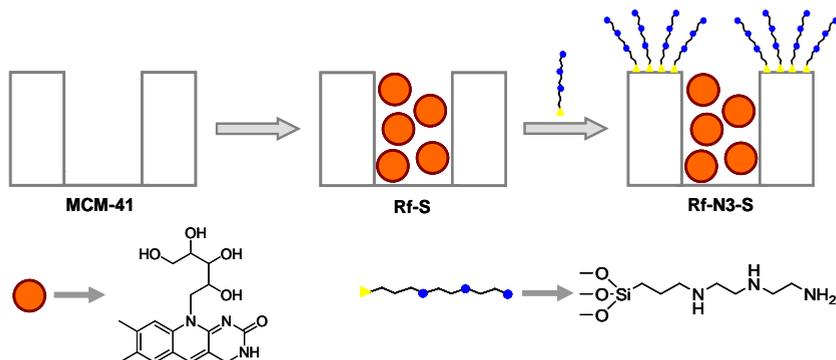
⁹⁸ Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M., *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 1199-1202.

⁹⁹ Vallet-Regí, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5934-5943.

protonación de la poliamina anclada en la superficie del material es función del pH del medio y va a hacer que actúe como puerta permitiendo la liberación de la vitamina atrapada en los poros o inhibiéndola. De la misma forma a un pH en concreto la presencia de ciertos aniones va a modular también el proceso de liberación.

Una vez conocidos y seleccionados todos los componentes individuales que van a formar el material híbrido, hay que ensamblarlos siguiendo un orden determinado para asegurar la funcionalidad final. En este sentido el orden en el que se incorporan los distintos componentes sobre el soporte inorgánico es crítico. Por ello en primer lugar se sintetiza el soporte inorgánico mesoporoso MCM-41 y después se cargan los poros de este con la vitamina B₂ o riboflavina. Posteriormente se procede al anclaje de la **N3** sobre la superficie externa del soporte cargado. Mediante este procedimiento, las moléculas de **N3**, que van a actuar como 'puerta', se anclan preferentemente en la superficie externa del material por que los poros están llenos de moléculas de vitamina B₂ o riboflavina.

El material mesoporoso MCM-41, es sintetizado usando tetraetil ortosilicato (TEOS), que actúa como precursor inorgánico, y como surfactante, el tensoactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr). La eliminación posterior del tensoactivo mediante calcinación en aire a temperatura elevada, deja en el interior de la matriz silícea un conjunto de cavidades. En esos poros del sólido, se introducirán las moléculas de vitamina después de un proceso de cargado durante 24 horas dando lugar al sólido inicial **Rf-S**. A continuación el sólido es lavado y secado a temperatura ambiente durante 36 horas. En un segundo paso, se funcionaliza la superficie externa con las moléculas de poliamina 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil trimetoxisilano que actuarán como 'puerta nanoscópica molecular', dando lugar al sólido **Rf-N3-S**. El sólido final es filtrado, lavado y secado a temperatura ambiente durante 12 horas. Un resumen del proceso de síntesis del sólido final **Rf-N3-S** se muestra en el esquema 1.1.



Esquema 1.1. Esquema del proceso de síntesis del sólido **Rf-N3-S**.

1.2.2 Caracterización del sólido **Rf-N3-S**.

El sólido **Rf-N3-S** se caracterizó, utilizando las técnicas estándar de difracción de Rayos-X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia IR, análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental y análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 .

La figura 1.2 muestra los difractogramas de Rayos X de polvo (PXRD) de los sólidos MCM-41 sintetizada, MCM-41 calcinada y el sólido final **Rf-N3-S**. El PXRD a ángulos bajos, del material silíceo MCM-41 sintetizado, curva a, muestra los cuatro planos de reflexión representativos de la estructura hexagonal, que pueden ser identificados como los planos de Bragg (100), (110), (200), y (210). En la figura 1.2 se puede observar en el PXRD de la muestra MCM-41 calcinada, curva b, un desplazamiento significativo del plano de reflexión (100), con un parámetro de celda a_0 con valor de 52 Å (distancia entre planos $d_{100} = 45$ Å). Este desplazamiento de la reflexión (100) es debido a una contracción de la celda de aproximadamente de 6-8 Å. El desplazamiento y ensanchamiento de los picos (110) y (200) es debido, probablemente, a la condensación de los silanoles de la superficie del material durante el proceso de calcinado. También podemos obtener el parámetro de celda a_0 con vaor de 46 Å, (distancia entre planos $d_{100} = 40$ Å). La figura 1.2 también muestra la curva correspondiente al material **Rf-N3-S**, curva c. El difractograma de este sólido muestra unos planos de reflexión (110) y (200) de baja intensidad. Esta reducción es debida, probablemente, a la presencia de la

vitamina en el interior de los poros de la MCM-41. Sin embargo, la presencia clara del pico d_{100} en este difractograma sugiere que el proceso de carga con la vitamina B₂ o riboflavina y la posterior funcionalización adicional con las poliaminas, que actúan como 'puerta molecular', no ha modificado la estructura mesoporosa de la MCM-41. La estructura mesoporosa del sólido **Rf-N3-S** también se puede observar mediante la utilización de la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica muestra la típica porosidad desordenada hexagonal de la matriz de MCM-41 (figura 1.3).

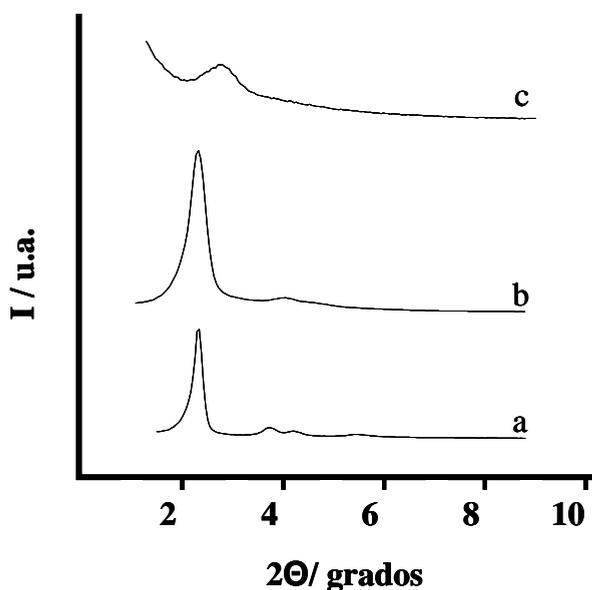


Figura 1.2. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada y (c) el sólido final **Rf-N3-S** conteniendo la vitamina B₂ o riboflavina y funcionalizado con poliaminas actuando como 'puerta nanoscópica molecular'.

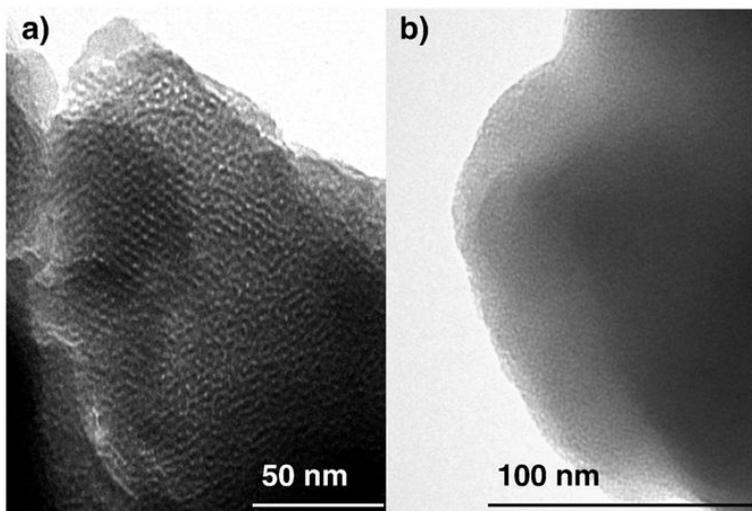


Figura 1.3. Imagen de TEM de (a) MCM-41 calcinada y (b) **Rf-N3-S**, mostrando la porosidad característica del material mesoporoso MCM-41.

Otra de las técnicas utilizadas para la caracterización y seguimiento de los procesos de cargado-funcionalización del sólido **Rf-N3-S**, es la espectroscopia infrarroja, ver figura 1.4. La curva a muestra el espectro infrarrojo de la MCM-41 calcinada en donde se pueden observar las bandas típicas de la matriz de sílice (1250 , 1087 y 802 cm^{-1}) y aquellas relacionadas con vibraciones de moléculas de agua (3420 y 1620 cm^{-1}). Después del cargado con la vitamina B₂ o riboflavina (sólido **Rf-S**, espectro b) y el posterior proceso de funcionalización con la **N3** (sólido **Rf-N3-S**, espectro c) se siguen observando las bandas citadas anteriormente (debidas a la matriz silicea y al agua) pero también aparecen pequeñas bandas a 2964 cm^{-1} que están relacionadas con la parte orgánica de los sólidos. La presencia de los grupos amina en el sólido final **Rf-N3-S** se confirmaba con la aparición de una banda ancha alrededor de 3500 cm^{-1} debida a las vibraciones de deformación del enlace N-H y las bandas debidas a vibraciones de tensión del enlace N-H en el intervalo $1573\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$. Esta asignación se confirma al comparar el espectro infrarrojo de **Rf-N3-S** (curva c) con el de la poliamina **N3** (curva d). Además, también se puede observar una disminución de intensidad de la banda de los grupos silanol (1080 cm^{-1}) en el espectro infrarrojo de

Rf-N3-S. Esta disminución indica que los grupos silanol de la superficie de la MCM-41 se han funcionalizado con poliaminas.

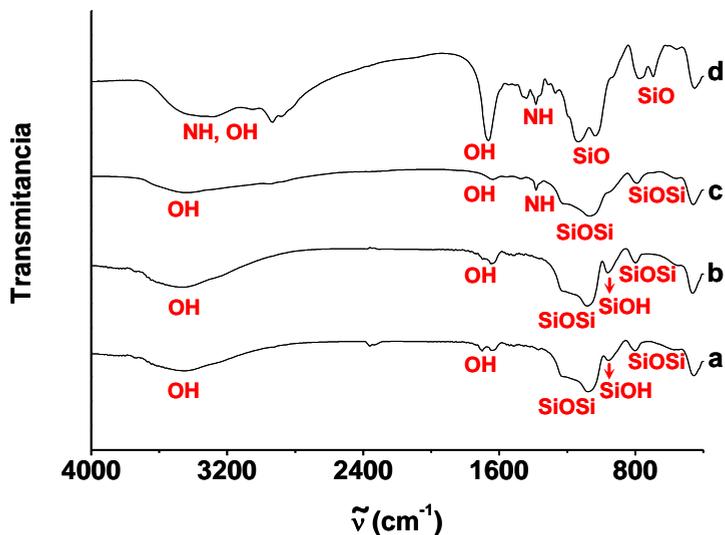


Figura 1.4. Espectro Infrarrojo de (a) MCM-41 calcinada, (b) Rf-S, (c) Rf-N3-S y (d) N3.

El sistema de poros de la MCM-41 y del sólido **Rf-N3-S**, se puede estudiar mediante el análisis de las isotermas de adsorción-desorción de N₂ (figura 1.5). Dicha técnica nos permite obtener a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) el área superficial, el tamaño y el volumen de poro. La isotermas de adsorción-desorción de N₂ de la fase calcinada de la MCM-41, muestra un único proceso de adsorción, característico de los mesoporos de la MCM-41, a valores de presión intermedia ($0.2 < P/P_0 < 0.4$). Este proceso de adsorción es debido a la condensación de nitrógeno por capilaridad dentro de los mesoporos. La ausencia de ciclo de histéresis en este intervalo y la forma de la curva sugiere la existencia de mesoporos uniformes y cilíndricos. El diámetro de poro se calcula mediante el uso del método BJH (Barret-Joyner-Halenda),¹⁰⁰ dando lugar a un diámetro de poro de 1.8 nm, y un volumen de poro de 0.90 cm³g⁻¹. La aplicación del modelo de

¹⁰⁰ Barret, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 373-380.

Brunauer-Emmett-Teller¹⁰¹ (BET) dio un valor para la superficie total específica de $1127 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. En combinación con los datos de RX que nos han permitido obtener un parámetro de celda a_0 de 46 \AA , y un diámetro de poro de 18 \AA , podemos calcular el espesor de la pared de sílice entre poros, siendo de un valor de unos 28 \AA aproximadamente. Por el contrario, las isothermas de adsorción-desorción de N_2 de **Rf-N3-S**, muestran una curva plana indicativa de la ausencia de cualquier porosidad que, que junto con una conservación del orden pseudo-hexagonal deducido por medio de la difracción de RX y el estudio por TEM, evidencian un cargado de la vitamina altamente efectivo. El sólido **Rf-N3-S** posee un diámetro de poro menor de 2 nm , y un volumen de poro de $0.16 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$. La aplicación del modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET) dio un valor para la superficie total específica de $330 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

La aplicación de todas estas técnicas experimentales al material **Rf-N3-S** muestra que tanto el cargado con vitamina B_2 o riboflavina, como la funcionalización posterior con la **N3** no modifican la estructura inicial del material mesoporoso.

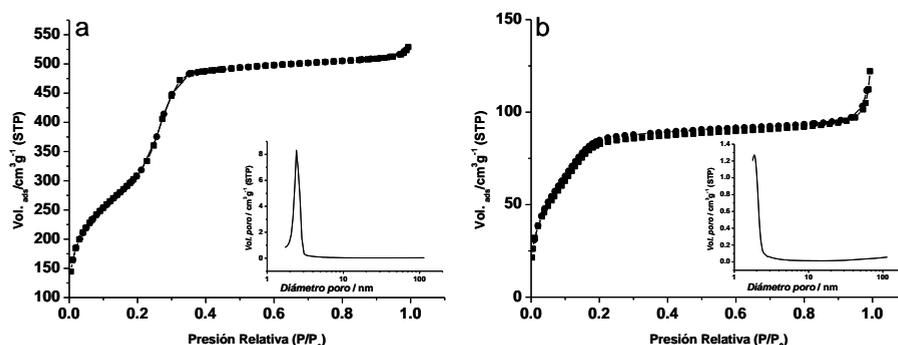


Figura 1.5. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para el sólido (a) MCM-41 y (b) **Rf-N3-S**. (V_{ADS} : Volumen adsorbido en cm^3/g). En la figura interior se muestra la distribución del tamaño de poro para el material MCM-41.

¹⁰¹ Brunauer, S. ; Emmett, P. H. ; Teller, E. J. *Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 309-319.

Para el cálculo de la cantidad de materia en los sólidos **Rf-S** y **Rf-N3-S**, se utilizaron las técnicas de análisis elemental y termogravimétrico obteniéndose un contenido de 0.003 mol vitamina B₂ o riboflavina /mol Sílice y de 0.045 mol amina/mol Sílice (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Contenido (α) de vitamina y de poliamina por milimol y por gramo de SiO₂ para los sólidos **Rf-S** y **Rf-N3-S**.

Sólido	α poliamina (mmol/g SiO ₂)	α vitamina (mmol/g SiO ₂)	α poliamina (g/g SiO ₂)	α vitamina (g/g SiO ₂)
Rf-S	-	0.053	-	0.019
Rf-N3-S	0.748	0.049	0.198	0.018

1.2.3 Mecanismo de la 'puerta': control pH.

Una vez preparado y caracterizado el material híbrido orgánico-inorgánico **Rf-N3-S** se estudian los resultados de la actuación de la poliamina **N3** como 'puerta nanoscópica molecular', en función de la concentración de protones, y de la presencia de ciertos aniones, tales como sulfato, fosfato, GMP y ATP. Se debe tener en cuenta, que ambos mecanismos, tanto el pH como la presencia de diferentes aniones, están estrechamente relacionados y no es fácil conocer con exactitud la participación individual concreta de cada estímulo a la hora de actuar con las poliaminas y controlar la liberación de la vitamina.

Con este objetivo se seleccionan diferentes pHs para estudiar cómo afectan a la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina del interior de los poros a la disolución acuosa. A continuación se explicará detenidamente los resultados obtenidos a dos pH diferentes, pH 2 (medio ácido) y pH 7 (medio neutro). Medidas de liberación de la vitamina a pH superiores a 7 no se realizan por que la matriz silícea podría degradarse. Como se describe a continuación los resultados de la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina a pH 2 y a pH 7 son marcadamente diferentes.

El efecto de la 'puerta molecular' se ha estudiado mediante la liberación de la vitamina desde interior de los poros hacia la disolución acuosa. Para ello se monitoriza la banda de transferencia de carga de la vitamina B₂ o riboflavina centrada a 444 nm en la fase acuosa. También se puede seguir el proceso de liberación mediante la banda de emisión de la vitamina B₂ o riboflavina que aparece a 525 nm al excitar en el máximo de absorción (444 nm). En un experimento típico de liberación de la vitamina, una cantidad determinada de **Rf-N3-S** (ver parte experimental para los detalles) se suspende en agua con sulfatos ($C_{\text{anion}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) a pH 2 y a pH 7 (se acidifica con ácido clorhídrico, ya que los aniones cloruro dan poca interacción con las poliaminas). A un cierto tiempo (2 min, 1 h, 3 h y 5 h), se recoge una alícuota de la suspensión y se mide la intensidad de la banda de emisión centrada a 525 nm (excitación a 444 nm) de la disolución obtenida siendo la misma proporcional a la cantidad de vitamina B₂ o riboflavina liberada. En la Figura 1.6 se muestran los resultados obtenidos para los dos pH. Como se puede observar las dos cinéticas son claramente distintas ya que a pH 2 se observa una liberación de vitamina B₂ o riboflavina muy pequeña (aproximadamente un 15% a las cinco horas) mientras que a pH 7 se alcanza la máxima liberación a las 5 horas.

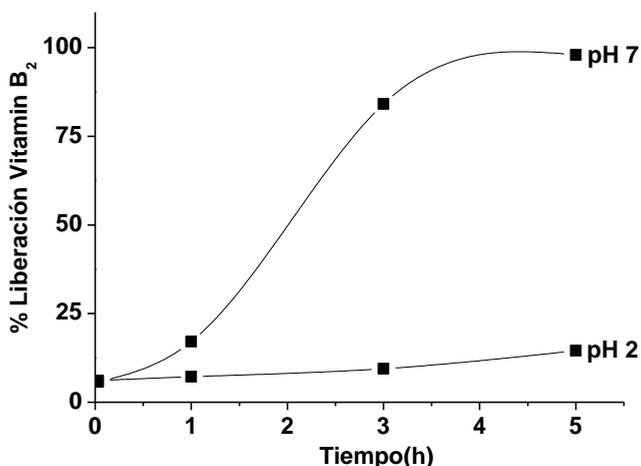
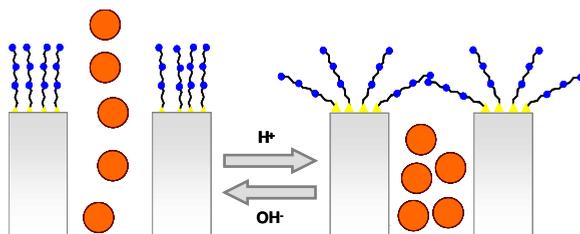


Figura 1.6. Cinética de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina del sólido **RF-N3-S** a pH 2 y 7. ($C_{\text{anion sulfato}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$).

Los resultados de la liberación obtenidos a pH 2 y pH 7 muestran claramente que están relacionados con los distintos grados de protonación de las poliaminas que actúan como ‘puertas’. Así, el sólido **Rf-N3-S** muestra una liberación cercana a 0 al ponerse en contacto con una disolución acuosa a pH 2. A este pH los átomos de nitrógeno de las poliaminas están totalmente protonados con lo que hay repulsiones electrostáticas o coulombicas importantes entre las distintas poliaminas. Como consecuencia las cadenas adoptan una conformación rígida y tienden a estar lo más alejadas unas de otras obteniéndose un entramado complejo que inhibe, completa o parcialmente, la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina (ver Esquema 1.2). Por el contrario, a pH 7 las aminas no están protonadas y ya no hay repulsiones electrostáticas entre ellas. Además, pueden existir enlaces de hidrógeno entre los grupos aminos de distintas cadenas dando lugar a un desbloqueo de los poros. Como se permite la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina atrapada en el interior de los poros la emisión en la disolución aumenta de forma significativa (ver también el Esquema 1.2).



Esquema 1.2. Mecanismo de cierre de la ‘puerta’ debido a la presencia de protones a pH 2 y la apertura de la ‘puerta’ a pH 7 del sólido **Rf-N3-S**.

Como se ha citado arriba, el mecanismo de apertura/cierre de la ‘puerta’ en función del pH, está relacionado con los diferentes grados de protonación de las aminas ancladas en la superficie del sólido mesoporoso. Así, una triamina similar a la anclada en el sólido **Rf-N3-S**, la dietilentriamina ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) tiene valores de pK_a en agua de 9.84, 9.02 y 4.23.¹⁰² Aunque la poliamina anclada en la superficie es similar a la dietilentriamina los valores de pK_a variaran, ya que se debe tener en cuenta que las poliaminas están ancladas muy próximas unas a otras y los procesos de protonación deben estar altamente influenciados por esta cercanía. Así, algunos modelos simples de predicción de pK_a están basados en el concepto de que es más difícil protonar aminas situadas muy cerca de grupos amonio ya protonados y por lo tanto, los valores de pK_a disminuyen poco a poco a medida que el número de aminas protonadas aumenta.¹⁰³ Además, aunque el valor de pK_a de las aminas alifáticas (monoaminas) está alrededor de 9-10, en las poliaminas hay normalmente tantas constantes como número de aminas existentes. Por tanto, las aminas presentan un comportamiento desde muy básico (primera protonación) hasta menos básico (última protonación). De este modo, una monocapa de aminas semejante a la que hay en el sólido **Rf-N3-S** se comportaría como si se tuviera un rango continuo de valores de pK_a .

¹⁰² (a) Smith, R. M.; Martell, A. E. *Critical Stability Constants*, ed. Smith, R. M.; Martell, A. E. Plenum, New York, 1974. (b) Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. M. *NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database*, Texas A & M University, College Station, 1993.

¹⁰³ Lloris, J. M.; Martínez-Máñez, R.; Perales, E.; Soto, J. *J. Chem. Research*, 1998, 432-433.

1.2.4 Mecanismo de la 'puerta': control aniónico.

Como se ha descrito en el apartado anterior la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina del material **Rf-N3-S** puede ser controlada mediante modulación del pH. Al añadir un ácido para cambiar el pH del medio se están introduciendo a la vez ciertos aniones. La coordinación de estos aniones con los átomos de nitrógeno de la poliaminas (que pueden estar protonados o libres) puede afectar a la cinética de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. Así, en este apartado se describen los resultados de la liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina del sólido **Rf-N3-S** en función del pH y de la presencia de ciertos aniones. Los aniones seleccionados son el sulfato, el fosfato, el GMP y el ATP.

El efecto de la 'puerta molecular' en función de diferentes aniones se ha controlado a través de la monitorización de la banda de transferencia de carga de la vitamina B₂ o riboflavina centrada a 444 nm o mediante la banda de emisión de la misma centrada a 525 nm (al excitar la banda de absorción a 444 nm). La intensidad de ambas bandas es proporcional a la cantidad de vitamina B₂ o riboflavina liberada en la fase acuosa. En un experimento típico de liberación de la vitamina el sólido **Rf-N3-S** se suspende en agua a pH 2 y a pH 7 en presencia de los aniones, sulfato, fosfato, GMP y ATP ($C_{\text{anion}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (se acidifica con ácido clorhídrico, ya que los aniones cloruro dan poca interacción con las poliaminas). A cierto tiempo (2 min, 1 h, 3 h y 5 h) se recoge una alícuota de la suspensión y se mide la banda de emisión de la vitamina B₂ o riboflavina a 525 nm en la disolución obtenida. La intensidad de emisión es proporcional a la cantidad de vitamina liberada del interior de los poros de la MCM-41 (ver Figura 1.7). La figura 1.7a muestra como a pH 2 todos los aniones estudiados (sulfato, fosfato, GMP y ATP) impiden la liberación de la vitamina del interior de los poros. En cambio a pH neutro (figura 1.7b) se observa liberación en presencia de los aniones sulfato y GMP, mientras que la 'puerta' se mantiene cerrada en presencia de ATP y fosfato. Por lo tanto se puede concluir que los aniones ejercen distintos efectos sobre la 'puerta' a pH ácido y a pH neutro. Así, en presencia del anión sulfato a pH 2 casi no hay liberación de la vitamina B₂ o riboflavina (la 'puerta' está cerrada), en

cambio a pH 7 hay una liberación considerable de la vitamina (la 'puerta' está abierta).

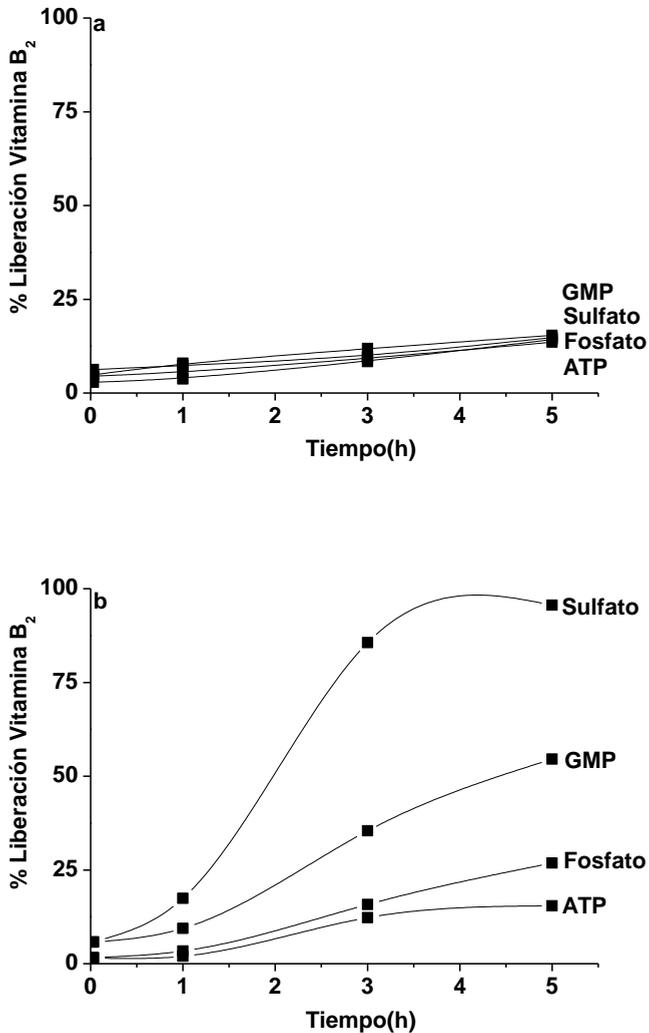


Figura 1.7. Cinética de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina del sólido *Rf-N3-S* en presencia de sulfato, fosfato, GMP y ATP a pH (a) 2 y (b) 7. ($C_{\text{anion}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$).

Los resultados observados en las cinéticas de liberación en presencia de aniones se pueden explicar teniendo en cuenta la facilidad de las poliaminas para coordinarse con los distintos aniones. Así, las poliaminas se han utilizado en numerosas ocasiones como unidades coordinantes de aniones en la síntesis de receptores ópticos y electroquímicos.^{104,105,106} Para entender la formación de estos complejos hay que tener en cuenta que, tanto a pH ácido como a pH neutro, algunos átomos de nitrógeno se encuentran protonados en forma de sales de amonio cuaternario. Estos cationes amonio pueden dar interacciones electrostáticas con los aniones formando complejos. Además, las aminas protonadas (a pH ácido) pueden actuar como grupos dadores mientras que las aminas libres (a pH neutro) pueden actuar como grupos aceptores en la formación de enlaces de hidrógeno. Teniendo en cuenta estos hechos las poliaminas pueden coordinarse con aniones a través de interacciones electrostáticas (a pH ácido) y mediante la formación de enlaces de hidrógeno (a pH neutro).

Otro aspecto importante a la hora de elucidar el papel que tiene los distintos aniones en el mecanismo de la 'puerta' molecular del sólido **Rf-N3-S** es la capacidad de los aniones para cambiar su carga (grado de protonación) en función del pH del medio. Así, los aniones estudiados (sulfato, fosfato, GMP y ATP) tienen distintas constantes de protonación. Estas constantes (ver tabla 1.2) permiten conocer la especie predominante a un pH determinado. Por ejemplo, el fosfato en agua muestra tres grados de protonación, es decir, tres pK_a para la primera, segunda y tercera protonación. El sulfato solamente tiene un proceso de protonación. Además, el ATP y el GMP muestran varios procesos de protonación en el agua. Teniendo en cuenta estos valores de pK_a a pH 2, fosfato, sulfato, GMP y ATP están como mezclas de las siguientes especies: H₂PO₄⁻/H₃PO₄, SO₄²⁻

¹⁰⁴ Albelda, M. T.; Bernardo, M. A.; García-España, E.; Godino- Salido, M. L.; Luis, S. V.; Melo, M. J.; Pina, F.; Soriano, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1999**, 2, 2545-2549.

¹⁰⁵ Sancenón, F.; Benito, A.; Lloris, J. M.; Martínez-Máñez, R.; Pardo, T.; Soto, J. *Helv. Chim. Acta*, **2002**, 85, 1505-1516.

¹⁰⁶ (a) Král, V.; Andrievsky, A.; Sessler, J. L.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 22, 2349-2350. (b) De Stefano, C.; Foti, C.; Gianguzza, A.; Giuffrè, O.; Sammartano, S. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, 9, 1511-1518. (c) Albelda, M. T.; Aguilar, J.; Alves, S.; Aucejo, R.; Diaz, P.; Lodeiro, C.; Lima, J. C.; García-España, E.; Pina, F.; Soriano, C. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3118-3135. (d) Lloris, J. M.; Martínez-Máñez, R.; Padilla-Tosta, M.; Pardo, T.; Soto, J.; Tendero, M. J. L. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 21, 3657-3662.

/HSO₄⁻, H₂GMP²⁻/H₃GMP⁻ y H₂ATP²⁻/H₃ATP⁻, mientras que a pH 7 se tienen las siguientes especies: H₂PO₄⁻, SO₄²⁻, HGMP³⁻ y ATP⁴⁻/HATP³⁻.

Tabla 1.2. Valores de pK_a de los diferentes grados de protonación de los aniones a estudio.

Sulfato	Fosfato	GMP	ATP
HSO ₄ ⁻ ↔ SO ₄ ²⁻ + H ⁺ pK _a = 1.9	H ₃ PO ₄ ↔ H ₂ PO ₄ ⁻ + H ⁺ pK _a = 2.1 H ₂ PO ₄ ⁻ ↔ HPO ₄ ²⁻ + H ⁺ pK _a = 7.7 HPO ₄ ²⁻ ↔ PO ₄ ³⁻ + H ⁺ pK _a = 11.5	H ₃ GMP ⁻ ↔ H ₂ GMP ²⁻ + H ⁺ pK _a = 2.4 H ₂ GMP ²⁻ ↔ HGMP ³⁻ + H ⁺ pK _a = 6.1 HGMP ³⁻ ↔ GMP ⁴⁻ + H ⁺ pK _a = 9.4	H ₃ ATP ⁻ ↔ H ₂ ATP ²⁻ + H ⁺ pK _a = 2.0 H ₂ ATP ²⁻ ↔ HATP ³⁻ + H ⁺ pK _a = 4.0 HATP ³⁻ ↔ ATP ⁴⁻ + H ⁺ pK _a = 6.8

En la bibliografía se encuentran numerosos ejemplos de receptores conteniendo poliaminas como unidades coordinantes de aniones. A pH ácido estas poliaminas están protonadas y forman complejos muy fuertes con el anión fosfato y con nucleótidos (contienen diversos restos de fosfato) mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Esto contrasta con la poca afinidad que presentan las poliaminas hacia los aniones como sulfato, hidrógeno sulfato y cloruro.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente la escasa liberación de vitamina B₂ o riboflavina del sólido **Rf-N3-S** a pH 2 en presencia de los aniones sulfato, fosfato, GMP y ATP se puede explicar fácilmente. Como se ha comentado en el punto 1.2.3, a pH 2 las aminas de las moléculas ‘puerta’ están totalmente protonadas y adoptan una conformación rígida que inhibe la liberación de la vitamina del interior de los poros. Además de esta conformación rígida de las poliaminas hay que tener en cuenta que los cuatro aniones seleccionados son capaces de formar complejos fuertes a pH 2, mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, con los grupos amonio. Los dos efectos se unen con la consecuencia directa de que el cierre de la ‘puerta’ se maximiza y se inhibe la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina de una forma más efectiva. Otro aspecto importante es la alta densidad de aminas presentes en la superficie del

material **Rf-N3-S**. Como consecuencia de esta alta densidad se tienen muchos grupos amonio con capacidad de coordinar con los aniones aumentando más el efecto de 'puerta' con la consiguiente inhibición de la liberación.¹⁰⁷

El comportamiento de la 'puerta' en presencia de los diferentes aniones a pH 7 se puede explicar mediante un análisis similar al aplicado para pH 2. A este pH las poliaminas se encuentran parcialmente protonadas y, por lo tanto, la interacción con aniones sería más débil. Por otra parte, a pH 7 se tienen menos grupos amonio que a pH 2 con la consiguiente reducción en las interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno entre dichos grupos amonio y los aniones. Esta reducción en el número de interacciones hace que los aniones bloqueen en menor medida los poros a pH 7. El porcentaje de liberación de la vitamina en función de los aniones a pH 7 sigue el orden sulfato > GMP > fosfato > ATP, como se puede observar en la figura 1.7 b. El ATP es el anión más grande y también el más cargado y a este pH es capaz de bloquear mucho la salida de los poros siendo el único capaz de cerrar completamente la 'puerta' y evitar la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. También la presencia del anión fosfato es capaz de inhibir la liberación de vitamina B₂ o riboflavina. Por el contrario, el sulfato es el anión que permite liberar más vitamina B₂ o riboflavina a este pH pese a tener dos cargas negativas. Así, aunque a pH 7 el anión sulfato está más cargado que el anión fosfato, el primero parece dar interacciones más débiles con los grupos amonio que el fosfato. Este hecho ha sido constatado por otros investigadores y en la bibliografía se pueden encontrar datos que demuestran que los fosfatos tienen una gran tendencia a formar complejos estables con poliaminas.¹⁰⁸ Estos complejos fosfato-poliamina se producen no sólo mediante interacciones electrostáticas sino también mediante la formación de enlaces de hidrógeno fuertes. La formación de estos enlaces de hidrógeno justifica el hecho de que una especie poco cargada como el fosfato (una carga negativa a pH 7)

¹⁰⁷ (a) Descalzo, A. B.; Jiménez, D.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Soto, J.; El Haskouri, J.; Guillém, C.; Beltrán, D.; Amorós, P. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 966-969. (b) Descalzo, A. B.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Soto, J.; Beltrán, D.; Amorós, P., *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2721-2731.

¹⁰⁸ Izatt, R. M.; Pawlak, K.; Bradshaw, S. S.; Bruening, R. L. *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 1721-2085.

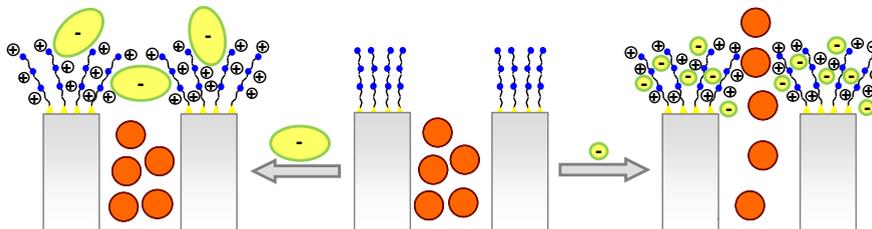
puede formar complejos con poliaminas más fuertes que una especie con el doble de carga como el sulfato (dos cargas negativas a pH 7).¹⁰⁹ Este comportamiento de los aniones fosfato está relacionado con la capacidad del H_2PO_4^- para comportarse como aceptor y dador de hidrógeno, en contraste con SO_4^{2-} que sólo pueden actuar como aceptor de hidrógeno, en las interacciones de enlace de hidrógeno.

En general, los resultados experimentales demuestran que, para un determinado pH, la 'puerta' molecular se encuentra más cerrada en presencia de aniones (debido a las interacciones entre los aniones y las poliaminas) siendo el tamaño de los mismo un factor fundamental. El pH es capaz de controlar la apertura/cierre de la 'puerta' en la superficie del material mesoporoso debido a las interacciones por enlace de hidrógeno entre las aminas ('puerta' abierta) y las repulsiones electrostáticas entre los grupos poliamonio ('puerta' cerrada). Por otra parte, sumando el control de pH con la presencia de determinados aniones se consigue un mejor cerrado de la 'puerta'. Como se puede observar en los datos experimentales, los aniones actúan de diferente manera en función de su tamaño, de su carga o de su afinidad con las aminas para formar complejos, dando lugar a diferentes comportamientos con el sólido **Rf-N3-S**; 'puerta' completamente cerrada con ATP o fosfato, y obstrucción de poro parcial, dependiendo del pH, con GMP y sulfato.

Un modelo del funcionamiento de la 'puerta' molecular en presencia de aniones a pH neutro se puede observar en el esquema 1.3. La coordinación de los distintos aniones con la superficie externa del sólido **Rf-N3-S** afecta al funcionamiento de la 'puerta', especialmente cuando se forman complejos. Así cuando los complejos se forman con aniones grandes (ATP) o con alta capacidad de coordinación (fosfato) se inhibe la liberación mientras que cuando se emplean

¹⁰⁹ (a) Beer, P. D.; Cadman, J.; Lloris, J. M.; Martínez-Mañez, R.; Soto, J.; Pardo, T.; Marcos, M. D.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans* **2000**, 11, 1805-1812. (b) Beer, P. D.; Cadman, J.; Lloris, J. M.; Martínez-Mañez, R.; Padilla-Tosta, M. E.; Pardo, T.; Smith, D. K.; Soto, J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 2, 127-133. (c) Lloris, J. M.; Martínez-Mañez, R.; Padilla-Tosta, M. E.; Pardo, T.; Soto, J.; García-España, E.; Ramírez, J. A.; Burguete, I. M.; Luis, S. V.; Sinn, E. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 11, 1779-1784. (d) Lloris, J. M.; Martínez-Mañez, R.; Padilla-Tosta, M. E.; Pardo, T.; Soto, J. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 1445-1453.

aniones pequeños o poco coordinantes (sulfato) la puerta está abierta permitiéndose la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina.



Esquema 1.3. Mecanismo de cierre de la 'puerta' debido a la presencia de ciertos aniones, grandes, 'puerta' cerrada, y pequeños, 'puerta' abierta, a pH 7, del sólido **Rf-N3-S**.

Por todo lo expuesto anteriormente parece que el mecanismo de la 'puerta' molecular está controlado por el pH y por la coordinación de aniones con las aminas/amonio presentes en la superficie externa del sólido. Pese a esto, no es descartable que existan interacciones entre las poliaminas y las moléculas de vitamina B₂ o riboflavina liberada. Si embargo, estas interacciones no van a ser muy importantes cuando se comparan con las intensas fuerzas de atracción existentes entre las poliaminas y los aniones. Además, estas interacciones vitamina B₂ o riboflavina-poliamina tienen un efecto limitado y claramente no controlan el proceso de apertura/cierre del material **Rf-N3-S**. Si esta interacción vitamina B₂ o riboflavina-poliamina fuera significativa para el funcionamiento de la 'puerta' la presencia de aniones no afectaría al funcionamiento de la misma, hecho que no se observa experimentalmente.

Finalmente, se podría pensar que los resultados obtenidos son debidos exclusivamente a la adsorción de los aniones en la superficie del material **Rf-N3-S**. Aquellos aniones que se adsorban más inhibirán más la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina mientras que los que se adsorban menos darán lugar a cierto grado de liberación. Para confirmar que las poliaminas juegan un papel importante en el material **Rf-N3-S** se han realizado estudios de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina a diferentes pH, en presencia del anión sulfato, con un material (**Rf-S**) que contiene MCM-41 cargado con la vitamina pero sin funcionalizar con la

poliamina **N3**. Los experimentos demuestran que tanto a pH 7 como a pH 2 la liberación de la vitamina es similar a ambos pHs y constante en función del tiempo (figura 1.8). Los experimentos también se realizaron utilizando **Rf-S** en presencia de ATP, a pH 2 y pH 7 y de nuevo se observaba la misma liberación a pH 7 y a pH 2, por tanto no se observaba efecto 'puerta'. Estos experimentos demuestran que la presencia de las moléculas de poliaminas es fundamentales en el mecanismo de la 'puerta' molecular por las interacciones supramoleculares que tienen con los aniones.

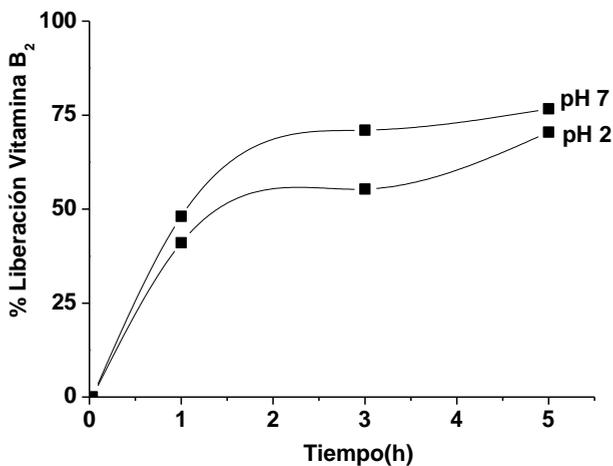


Figura 1.8. Cinética de liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina del interior de los poros del sólido **Rf-S** a pH 2 y pH 7 en presencia de aniones sulfato.

Como se ha explicado en la introducción del capítulo, una posible aplicación de estos materiales es su uso para la protección de la carga oculta en el interior de los poros de la MCM-41 de las condiciones las ácidas del estomago y, a la vez permitir la liberación en las condiciones neutras del intestino. Para esta aplicación se va a necesitar una estructura que actué a modo de 'puerta', capaz de estar completamente cerrada en medio ácido y abrirse completamente a pH neutro. Esto se ha logrado para el sólido **Rf-N3-S** en presencia de ciertos aniones (ver la figura 1.7). Sin embargo, el sólido debe cumplir también una característica

adicional, es decir, debe ser posible abrir la 'puerta' a voluntad (por ejemplo a través de un cambio en el pH) después de que la 'puerta' haya sido cerrada. Por lo tanto, y con el fin de explorar más a fondo el posible control de la puerta en el material **Rf-N3-S**, se realizó una liberación de vitamina B₂ o riboflavina desde los poros de **Rf-N3-S** a pH 2 en presencia de sulfatos, ('puerta' cerrada), y en un momento determinado se modificó el pH 2 a pH 7 ('puerta' abierta). El efecto obtenido se muestra en la figura 1.9. El cambio a pH 7 abre la 'puerta' y se observa una importante liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. Este experimento demuestra la posibilidad real de controlar la apertura de la 'puerta' en agua, con un simple cambio en el pH del medio, en presencia de aniones sulfato.

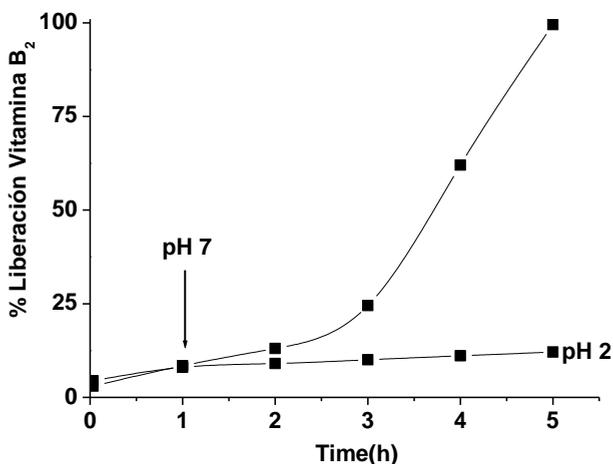


Figura 1.9. Cinética de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina en el sólido **Rf-N3-S**, en presencia de aniones sulfato ($C_{\text{sulfato}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) a pH 2 hasta 1 hora (indicado con una flecha en la figura) en que se modifica el pH a pH 7. Se incluye la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina en **Rf-N3-S** en presencia de aniones sulfato a pH 2 hasta 5 horas de liberación.

1.2.5 Efecto de la 'puerta' con diferentes concentraciones de aniones.

Se ha demostrado en los apartados anteriores que la poliamina anclada en la superficie externa del sólido **Rf-N3-S** puede actuar a modo de 'puerta' molecular para la liberación controlada de vitamina B₂ o riboflavina cuya actuación puede ser modulada por el pH y por la presencia de ciertos aniones. El efecto de los aniones se debe a las interacciones existentes entre las poliaminas ancladas en la superficie del material mesoporoso y el anión correspondiente, es decir, la formación de complejos estables que pueden obstruir la salida de los poros. Si se trata de aniones grandes se produce una inhibición de la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. Por otro lado, se puede pensar que un modo más para controlar el proceso de apertura/cierre de la puerta se puede lograr mediante el control de la concentración del anión. Para su comprobación, se realizaron estudios de liberación de la vitamina B₂ o riboflavina en **Rf-N3-S**, a pH 2 y 7 en presencia de los aniones ATP y GMP a las concentraciones 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} mol dm⁻³. Los resultados se recogen en las figuras 1.10 y 1.11. Se pueden observar dos claros efectos: (i) a una cierta concentración del anión y a un cierto pH el ATP es mucho más eficiente para cerrar la 'puerta' que el GMP y (ii) a mayor concentración de anión más efectiva es la inhibición de la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina desde **Rf-N3-S**. El primer efecto observado se debe a que el ATP forma complejos más fuertes con las poliaminas que el GMP. El segundo efecto apoya la conclusión de que la interacción anión-poliamina es un factor fundamental en el mecanismo de la 'puerta'. En las figura 1.10 y 1.11 también se puede observar que el ATP y el GMP se pueden emplear para controlar la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina a pH neutro y la inhibición a pH ácido. En el caso de GMP se necesitan concentraciones de 1×10^{-3} mol dm⁻³ para conseguir ambos efectos mientras que para ATP solamente se necesita una concentración de 1×10^{-4} mol dm⁻³.

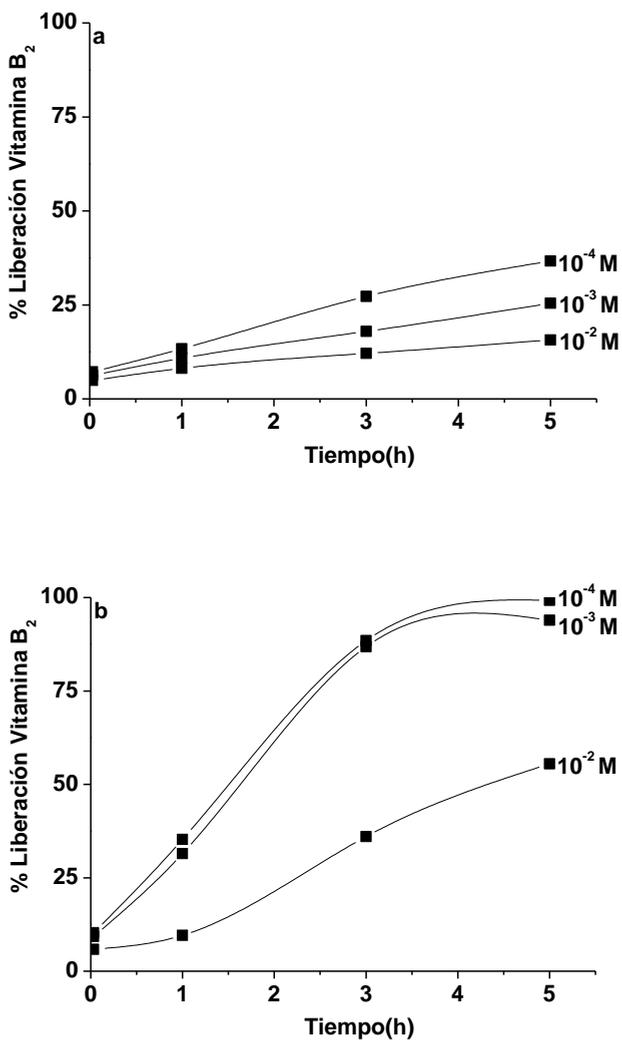


Figura 1.10. Cinéticas de liberación de vitamina B₂ o riboflavina del sólido RF-N3-S en presencia de GMP a 10⁻⁴ M, 10⁻³ M y 10⁻² M a pH 2 (a) y 7 (b).

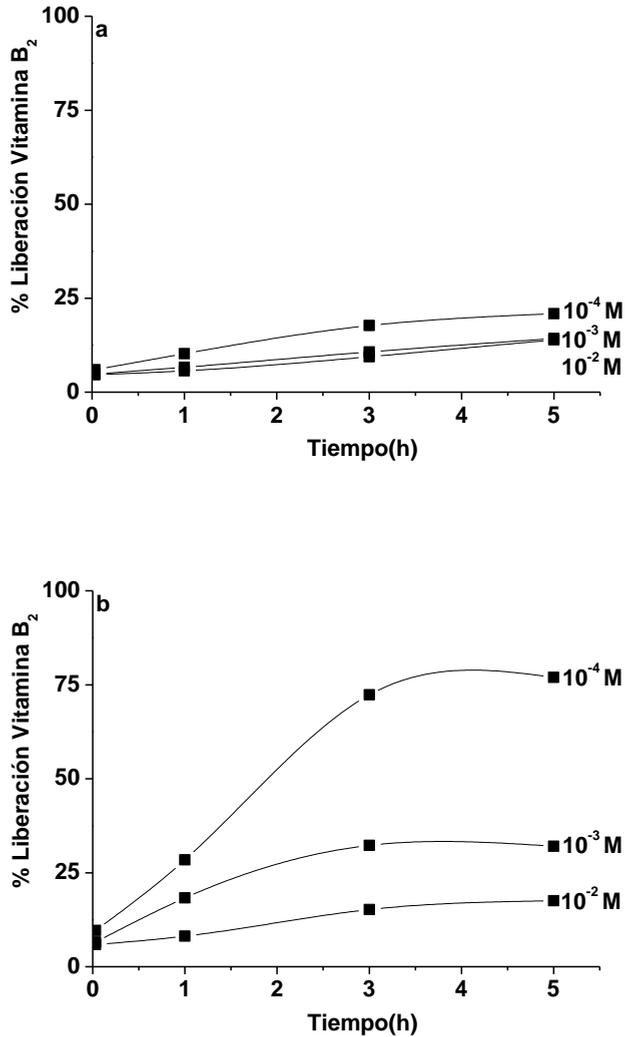


Figura 1.11. Cinéticas de liberación de vitamina B₂ o riboflavina del sólido **Rf-N3-S** en presencia de ATP a 10⁻⁴ M, 10⁻³ M y 10⁻² M a pH 2 (a) y 7 (b).

1.2.6 Cinéticas de liberación.

Los patrones de selectividad en la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina del sólido **Rf-N3-S**, en presencia de los distintos aniones, se calcularon mediante la medición de las cinéticas de liberación. La liberación de la vitamina al seno de la

disolución en un sistema de 'puertas moleculares' se analizó, en un primer momento, considerando que el proceso ocurría por difusión simple. Esto puede ser sólo aplicado cuando la 'puerta molecular' (conjunto de: poliaminas + anión + pH determinado) no ejerce ningún tipo de impedimento cinético o termodinámico sobre el proceso de liberación del colorante. De hecho, el término difusión implica que el proceso debería ser esencialmente reversible. Por tanto, si la liberación siguiese un proceso de difusión, las cinéticas de liberación molecular del interior de los poros del material mesoporoso **Rf-N3-S** podrían ser explicadas mediante el modelo de Higuchi.¹¹⁰ De acuerdo con este modelo, la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina podría ser descrita como la raíz cuadrada de un proceso dependiente del tiempo basado en la difusión de Fick. La cantidad de carga liberada, Q_t , por unidad de área expuesta, en un tiempo t puede ser descrita por la relación simple:

$$Q_t = k_H \sqrt{t} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde k_H es la constante de liberación para el modelo de Higuchi. Cuando la vitamina es dispersada dentro de la matriz y el proceso de difusión tiene lugar a través del relleno de los poros con el disolvente, la constante de liberación dependerá de varios factores:

$$k_H = f(D, \varepsilon, \tau, C, A) \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde D es la difusividad de la vitamina, τ es el factor de tortuosidad del sistema, ε es la porosidad de la matriz, A es la cantidad total de vitamina presente en la matriz y C es la solubilidad del huésped en el disolvente usado. Esta ecuación ha sido utilizada habitualmente de forma satisfactoria para describir la liberación de fármacos de sílices porosas.¹¹¹

¹¹⁰ (a) Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 874-875. (b) Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1963**, *52*, 1145-1149.

¹¹¹ (a) Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308-311. (b) Muñoz, B.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Díaz, I.; Vallet-Regí, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 500-503. (c) Anderson, J.; Rosenholm, J.; Areva, S.; Linden, M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4160-4167.

Se ha aplicado este modelo para la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina a pH 7, en presencia de sulfato, GMP, fosfato y ATP. El buen ajuste observado (ver Figura 1.12) sugiere que a este pH la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina de los poros del sólido **Rf-N3-S** es básicamente un proceso de difusión. Se observa un rango de linealidad bueno hasta un tiempo de 300 minutos, después se observaba una cierta desviación de la linealidad (no mostrado). Esto podría ser debido a procesos derivados de la solubilidad parcial de la matriz de sílice a pH neutro.

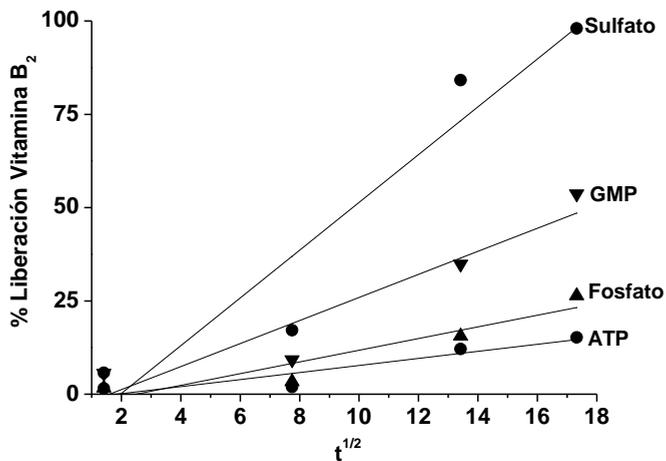


Figura 1.12. Medidas de fluorescencia a 525nm de la liberación de vitamina B₂ o riboflavina del interior de los poros del sólido **Rf-N3-S** a pH 7 en presencia de sulfato, GMP, fosfato y ATP ($C_{anion} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$).

Este efecto (dos o más pasos en los perfiles de liberación) también se ha descrito en procesos de cinéticas de liberación no controlada de algunos huéspedes (por lo general drogas) a partir de materiales de soporte poroso.¹⁰⁹ Se han calculado los valores de la constante de liberación para el modelo de Higuchi, k_H , utilizando la ecuación 1.1, dando los siguientes valores a pH 7: 7682, 3709, 1884 y 1130 para el sulfato, GMP, fosfato y ATP, respectivamente. También se aplicó el modelo de Higuchi para estudiar la cinética de liberación a pH 2, pero los datos experimentales no se ajustaban a la ecuación difusiva. Esto puede ser

debido a la conformación de las aminas ancladas en el sólido y a la rigidez adicional impuesta por su interacción con los aniones. Como consecuencia de esta coordinación anión-poliamina se impone una restricción asimétrica en relación a la movilidad de la vitamina a través del poro. Desde el punto de vista molecular, se podría concluir que, a pH neutro, las aminas actúan como simples filamentos mientras que a pH ácido la estructura nanoscópica de filamentos (aminas) rígidos actuarían básicamente como una válvula, inhibiendo parcialmente el acceso al interior de los poros pero permitiendo transporte de masa de los poros a la disolución.

1.3 Conclusiones.

Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la coordinación química de poliaminas con diferentes aniones en la superficie de materiales mesoporosos silíceos de tipo MCM-41. Estas interacciones supramoleculares se pueden emplear para desarrollar nuevos materiales híbridos funcionalizados con 'puertas nanoscópicas moleculares'. En concreto, se ha establecido que cuando se emplean poliaminas lineales ancladas a materiales mesoporosos del tipo MCM-41 estas pueden actuar como 'puerta' para la liberación controlada de moléculas bioactivas ocluidas en el interior de los poros.

Así, se ha desarrollado un sólido **Rf-N3-S** que consiste en una estructura mesoporosa MCM-41 que contiene agrupaciones poliaminicas anclada en la superficie externa y vitamina B₂ o riboflavina ocluida en el interior de los poros. Con este material se puede controlar la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina mediante cambios en el pH del medio y también añadiendo un anión adecuado.

En medio ácido los grupos amino se protonan apareciendo repulsiones electrostáticas. Las aminas adoptan una conformación rígida con lo que se produce un bloqueo de los poros y la inhibición de la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. A pH neutro los grupos amino están desprotonados observándose una liberación de la carga ('puerta' abierta). En relación a los distintos aniones, a pH 2 todos los aniones estudiados (sulfato, fosfato, GMP y ATP) inhiben la liberación de la carga ($C_{\text{anion}} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). En cambio a pH neutro, se observa liberación

con sulfato y GMP, pero la 'puerta' se mantiene cerrada con ATP y fosfato. La liberación selectiva a pH neutro, y la escasa liberación en condiciones ácidas, pueden ser controladas también con distintas concentraciones de los aniones GMP y ATP. La liberación controlada de la vitamina B₂ o riboflavina en presencia de aniones a distintos pH puede ser explicada por la formación de complejos anión-poliamina de distinta intensidad.

**Capítulo 2: Liberación controlada con respuesta
enzimática, mediante el uso de sílice
mesoporosa funcionalizada con lactosa.**

2 Liberación controlada con respuesta enzimática, mediante el uso de sílice mesoporosa funcionalizada con lactosa.

2.1 Introducción.

Como se viene explicando en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral un campo de investigación en auge en los últimos años es el desarrollo de materiales híbridos mesoporosos funcionalizados con ‘puertas moleculares’ que permiten la liberación controlada de carga ocluida en su interior mediante la aplicación de un estímulo externo.¹¹² Muchos de estos materiales híbridos están inspirados en bio-canales, bio-puertas y en general en bio-herramientas, capaces de generar movimiento gracias a la presencia de estímulos externos. Una de las aplicaciones de estos sistemas sensibles a diferentes estímulos, es su uso como almacén de carga para su posterior liberación controlada en ciertas condiciones externas.¹¹³ Los sistemas de liberación controlada tradicional, basados en polímeros, normalmente no responden a ningún estímulo externo. Estos polímeros son capaces de liberar su carga mediante procesos de difusión controlada o por degradación de la matriz polimérica.^{114,115,116,117,118,119,120} Actualmente se están desarrollando varios sistemas de liberación que emplean soportes de sílice mesoporosos (SMPS), como alternativa a los materiales poliméricos, para la

¹¹² (a) Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081-3093.

(b) Ariga, K.; Hill, J. P.; Lee, M. V.; Vinu, A.; Charvet, R.; Acharya, S. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2008**, *9*, 014109-014204.

¹¹³ (a) Descalzo, A. B.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Hoffmann, K.; Rurack, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924-5948. (b) Ariga, K.; Vinu, A.; Hill, J. P.; Mori, T.; *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2562-2591.

¹¹⁴ Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *277*, 119-131.

¹¹⁵ Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K.L. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 3-13.

¹¹⁶ Traitel, T.; Goldbart, R.; Kost, J. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2008**, *19*, 755-767.

¹¹⁷ Puoci, F.; Lemma, F.; Picci, N. *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 85-96.

¹¹⁸ Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R.; Bodmeier, R. *J. Control, Release*, **2008**, *125*, 1-15.

¹¹⁹ Harrison, K. *Biomed. Polym.*, **2007**, 33-56.

¹²⁰ Nair, L.S.; Laurenciana, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762-798.

encapsulación y liberación controlada de fármacos, antitumorales y moléculas orgánicas.^{121,122,123,124,125,126,127} Muchos de estos sistemas consisten en materiales de sílice mesoporosos que se funcionalizan con moléculas dando lugar a materiales híbridos orgánico-inorgánico conteniendo 'puertas nanoscópicas moleculares'.¹²⁸ Estas 'puertas' se construyen mediante el anclaje de ciertas moléculas orgánicas, en la superficie de un material silíceo mesoporoso, que son capaces de controlar el transporte de masa de forma reversible. Así, mediante la aplicación de un estímulo externo, se puede controlar la 'apertura' o 'cierre' de la 'puerta molecular' permitiendo la liberación controlada de la carga, ocluida en el interior de los poros o la entrada a los mismos. El campo de investigación relacionado con la preparación de materiales híbridos con 'puertas moleculares' es bastante reciente. Así, desde el trabajo pionero de Fujiwara¹²⁹ en el año 2003 desarrollando la primera 'puerta' con control fotoquímico, han sido muchos los

¹²¹ Schmaljohann, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2006**, *58*, 1655-1670.

¹²² Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548-7558.

¹²³ Lu, J.; Choi, E.; Tamanoi, F.; Zink, J.I. *Small*, **2008**, *4*, 421-426.

¹²⁴ (a) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin V. S. -Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845-8849.

(b) Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 1225-1236.

(c) Vivero-Escoto, J.L.; Slowing, I.I.; Wu, C.-Y.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*,

3462-3463. (d) Mortera, R.; Vivero-Escoto, J.; Slowing, I.I.; Garrone, E.; Onida, B.; Lin,

V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2009**, 3219-3221. (e) Zhao, Y.; Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Lin,

V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8398-8400. (f) Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.;

Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Small*, **2010**, *6*(18), 1952-1967. (g) Zhao, Y.; Vivero-Escoto, J.

L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2010**, *7*(9), 1013-1029.

¹²⁵ Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Zhao, Y.-L.; Tamanoi, F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.; Nel, A. E.

J. Am. Chem. Soc., **2010**, *132*, 12690-12697.

¹²⁶ Kim, H.; Kim, S.; Park, C.; Lee, H.; Park, H. J.; Kim, C. *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 4280-4283.

¹²⁷ Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3216-3251.

¹²⁸ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.* **2007**, 3236-3245.

(b) Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225-1236.

¹²⁹ (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, *421*, 350-353. (b) Mal, N. K.;

Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3385-3394. (c)

Zhu, Y.; Fujiwara, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2241-2244. (d) Fujiwara, M.;

Terashima, S.; Endo, Y.; Shiohara, K.; Ohue, H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4635-4637.

trabajos publicados por los grupo de Lin,^{130,131} Zink/Stoddart,^{132,133} Martínez Mañez^{134,135} y otros investigadores.¹³⁶

A pesar de estos ejemplos prometedores la utilización de SMPS funcionalizados con moléculas que actúan a modo de 'puerta' para desarrollar sistemas reales de liberación controlada se encuentra todavía en una etapa inicial.

¹³⁰ Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Giri, S.; Chen, H.T.; Lin, V.S.-Y. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853.

¹³¹ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2007**, 3236-3245. (b) Torney, F.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y.; Wang, K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 295-300. (c) Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. (d) Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker, M.P.; Lin, V.S.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044. (e) Lai, C.-Y.; Trewyn, B.G.; Jeftinija, D.M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459. (f) Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Giri, S.; Chen, H.-T.; Lin, V. S.-Y. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 846-853.

¹³² (a) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J.W.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371. (b) Nguyen, T.D.; Tseng, H.-R.; Celeste, P.C.; Flood, A.H.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10029-10034. (c) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371.

¹³³ (a) Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J.I. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 4-13. (b) Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Pentecost, C.D.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366. (c) Leung, K.C.-F.; Nguyen, T.D.; Stoddart, J.F.; Zink J.I. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5919-5928.

¹³⁴ (a) Casasús, R.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D.; Guillem, C.; Latorre, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612-8613. (b) Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6661-6664. (c) Casasús, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903-1917. (d) Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Soto, J. *J. Control. Release*, **2008**, *131*, 181-189.

¹³⁵ (a) Aznar, E.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F., *Expert Opinion*, **2009**, *6*, 643-655. (b) Aznar, E.; Casasús, R.; García-Acosta, B.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2228-2231. (c) Coll, C.; Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957-1959. (d) Aznar, E.; Coll, C.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877-6888. (e) Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Guillem, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833-6843. (f) Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Mañez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.

¹³⁶ (a) Park, C.; Lee, K.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275-1278. (b) Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y. B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 1731-1734. (c) Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10645-10647. (d) Song, S. -W.; Hidajat, K.; Kawi, S. *Chem. Commun.* **2007**, *42*, 4396-4398. (e) Wu, Z.; Jiang, Y.; Kim, T.; Lee, K.; *Journal of Controlled Release*. **2007**, *119*, 215-221.

Por ejemplo, algunos de los trabajos publicados presentan materiales híbridos que funcionan en disolventes no acuosos o emplean estímulos externos que no se pueden utilizar en condiciones fisiológicas. Muy recientemente se han empezado a aplicar estos materiales híbridos funcionalizados con 'puertas moleculares' en el campo de la nanomedicina. La posibilidad de liberar una determinada carga bajo demanda simplemente aplicando un estímulo externo (fotoquímico, electroquímico, iónico, cambios de polaridad, presencia de ciertas biomoléculas, etc) en células o tejidos abre muchas expectativas para estos materiales funcionales. En especial, son muy interesantes los materiales híbridos con 'puertas moleculares' que puedan ser abiertas mediante un estímulo de tipo biológico. En este sentido, muy recientemente, se han desarrollado materiales que emplean hebras simples de ADN,¹³⁷ antígenos^{135f} y enzimas como moléculas clave para inducir la liberación controlada de carga. Dentro de este campo, el desarrollo de materiales híbridos con 'puertas moleculares' que puedan ser abiertas mediante el empleo de enzimas es especialmente atractivo, teniendo en cuenta que las moléculas que van a controlar el transporte de masa se pueden sintetizar a la carta y pueden otorgar una selectividad muy alta al proceso de liberación. Pese a las interesantes aplicaciones que pueden tener estos materiales se han descrito pocos ejemplos de sólidos funcionalizados con 'puertas moleculares' que puedan liberar su carga en presencia de enzimas.

El primer trabajo en el que se describe un material mesoporoso funcionalizado con 'puertas moleculares' con apertura enzimática fue publicado recientemente por el grupo de Zink y colaboradores.¹³⁸ El material híbrido está formado por nanopartículas mesoporosas de sílice cuya superficie externa está funcionalizada con un [2]rotaxano y el interior de los poros cargados con rodamina B. El [2]rotaxano se forma mediante una interacción supramolecular (de tipo van der Waals) entre el polietilenglicol y una α -ciclodextrina (azúcar cíclico de 6 miembros). Además, una molécula voluminosa de adamantano conteniendo un

¹³⁷ Climent, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Maquieira, A.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281- 7283.

¹³⁸ Patel, K.; Angelos, S.; Dichtel, W.R.; Coskun, A.; Yang, Y.-W.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383.

grupo éster se incorpora a la parte final del [2]rotaxano, mediante una reacción click, con el fin de evitar la escisión del complejo supramolecular. El material final obtenido es estable bajo condiciones fisiológicas pero es capaz de liberar la carga en presencia de la enzima PLE (esterasa de hígado de cerdo) ya que esta induce la hidrólisis del grupo éster que conecta el adamantano con el [2]rotaxano produciéndose la escisión del complejo supramolecular.

En un segundo ejemplo publicado en el año 2009, Bein y colaboradores, han desarrollado un material mesoporoso cuyos poros se bloquean mediante el empleo del complejo biotina-avidina y que puede liberar la carga ocluida en los poros en presencia de la proteasa tripsina.¹³⁹ Para ello los autores emplean nanopartículas de sílice mesoporosa cuyos poros se cargan con fluoresceína y la superficie externa se funcionaliza con un derivado de biotina. La adición posterior de avidina da lugar al cierre de la 'puerta molecular' ya que se forman los complejos avidina-biotina en la superficie de las nanopartículas. La adición de tripsina induce la hidrólisis de la proteína avidina con la consiguiente liberación de la fluoresceína.

También en el año 2009, Kim y colaboradores describen la preparación de nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con calceína y funcionalizadas en su superficie externa con β -ciclodextrinas (azúcar cíclico de 7 miembros).¹⁴⁰ De esta forma se preparan dos materiales en los cuales la β -ciclodextrina se ancla a la superficie externa a través de una reacción click. Uno de los materiales conecta la β -ciclodextrina mediante un 1,2,3-triazol mientras que en el otro material la conexión contiene además un éster *o*-nitrobencílico. En ambos materiales la adición de la enzima α -amilasa induce la liberación de calceína debido a la reacción de hidrólisis de las ciclodextrinas. Además, el material que contiene el éster *o*-nitrobencílico es capaz de liberar calceína en presencia de la enzima lipasa que hidroliza el enlace éster y al irradiar con luz UV, por que este grupo es fotosensible. Cuando los dos estímulos se aplican a la vez (la presencia de α -

¹³⁹ Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092-3095.

¹⁴⁰ Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614-16615.

amilasa y la irradiación con luz UV) la intensidad de emisión de la calceína aumenta significativamente debido a un efecto sinérgico entre la enzima y la radiación UV.

Finalmente, en el año 2010, Heise y colaboradores describen un sistema de liberación controlada altamente específico basado en nanopartículas de sílice mesoporosas recubiertas de péptidos.¹⁴¹ Los autores sintetizan una determinada secuencia peptídica, que puede ser hidrolizada con una enzima seleccionada, empleando fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como grupo protector. Los poros de las nanopartículas se cargan con dextrano derivatizado con fluoresceína y, después, la superficie externa se funcionaliza con los péptidos conteniendo grupos terminales Fmoc. Este material híbrido es incapaz de liberar la carga ya que los poros están cerrados por que los fragmentos peptídicos coordinan entre ellos mediante interacciones de tipo π - π . Al adicionar termolisina se observa liberación de carga debido a la ruptura enzimática de la secuencia peptídica.

Una posible aplicación de estas 'puertas moleculares' controladas por la presencia de enzimas podría ser el desarrollo de sistemas de liberación de moléculas bioactivas sensibles a las condiciones ácidas del estómago. Estos materiales híbridos serían capaces de proteger la carga en estas condiciones ácidas y liberarla en el intestino. Para este uso específico se debe preparar un material capaz de estar completamente cerrado en el estómago y totalmente abierto en el intestino. Una posibilidad de apertura en el intestino y no en el estómago podría ser el empleo de una 'puerta' capaz de bloquear la carga en presencia de las enzimas presentes en el estómago, pero que pudiera liberar controladamente la carga en presencia de una enzima intestinal específica. Un estudio pormenorizado de la composición enzimática del estómago y del intestino nos muestra que una de las biomoléculas que puede cumplir todas las premisas es la lactosa ya que este disacárido se hidroliza exclusivamente en el intestino en presencia de la enzima β -D-galactosidasa.

¹⁴¹ Thornton, P.D., Heise, A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 2024-2028.

Por todo ello se decide abordar la preparación de un material mesoporoso (SMPS) funcionalizado con un derivado del disacárido lactosa que actúa como 'puerta molecular'. La idea subyacente es que la lactosa anclada en el exterior de los poros del soporte puede controlar la liberación de un colorante ocluido en el interior del material y que puede ser empleado para monitorizar el funcionamiento del nanodispositivo. La presencia de la enzima intestinal β -D-galactosidasa permite liberar la carga bajo condiciones fisiológicas mediante la hidrólisis de la lactosa en sus componentes (glucosa y galactosa).

El trabajo que se describe a continuación, fue la tercera 'puerta molecular' enzimática descrita, tras los trabajos previos de Zink y colaboradores en 2008¹³⁸ y de Bein y colaboradores en 2009.¹³⁹

2.2 Resultados y discusión.

2.2.1 Síntesis de materiales.

Como se ha comentado en la introducción, se describe aquí el diseño, síntesis, caracterización y funcionamiento de un material mesoporoso funcionalizado con un disacárido, que actúa como 'puerta nanoscópica molecular', que se abre en presencia de enzimas que actúan en el intestino. En este material, y debido al impedimento estérico que representan los azúcares, la salida de los poros se encuentra bloqueada. La presencia de una enzima capaz de hidrolizar el enlace O-glicosídico que une a los monosacáridos será capaz de 'abrir' los poros permitiendo así la liberación de las moléculas ocluidas en el interior.

El material híbrido desarrollado consiste en un soporte de sílice mesoporoso microparticulado tipo MCM-41 cuyos poros han sido cargados con un colorante (el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$). Este complejo va a servir para monitorizar el funcionamiento del sistema 'puerta'. La superficie externa de este material se funcionalizará con un derivado trialcoxisilánico de la lactosa. Como consecuencia de su tamaño, la lactosa va a ser capaz de bloquear los poros e impedir la

liberación del colorante.¹⁴² Como se ha comentado en el capítulo anterior, se ha escogido el material mesoporo MCM-41 como matriz inorgánica, debido a su porosidad homogénea, alta inercia química, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización mediante el uso de la química de los alcoxisilanos.^{143,144,145,146}

Además, el material MCM-41 contiene poros de un tamaño comprendido entre 2-3 nm que permiten el cargado y liberación de moléculas del interior al exterior de los poros de manera rápida. Por otra parte, su alta superficie específica permite el anclaje de diferentes moléculas orgánicas en el exterior de los poros.

El segundo componente importante del material híbrido final son las moléculas orgánicas que van a actuar como 'puerta'. Para esta función se ha elegido al disacárido lactosa. La lactosa esta formada por una β -galactopiranososa y una α -glucopiranososa unidas a través de un enlace O-glicosídico entre los carbonos 1 de la galactosa y 4 de la glucosa (ver Figura 2.1). Además, la lactosa posee un hidroxilo hemiacetálico reactivo que se puede funcionalizar fácilmente. Otro factor importante que ha inducido a elegir la lactosa, es el hecho que el enlace O-glicosídico puede ser hidrolizado selectivamente con β -D-galactosidasa. La enzima β -D-galactosidasa es una enzima hidrolasa glicosídica que es capaz de hidrolizar selectivamente el disacárido lactosa en los monosacáridos β -galactosa y α -glucosa. En humanos, la β -D-galactosidasa está presente predominantemente en las vellosidades a lo largo de la membrana del intestino delgado.

¹⁴² Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5884-5887.

¹⁴³ (a) El Haskouri, J.; Ortiz de Zarate, D.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A. B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2002**, *4*, 330-331. (b) Comes, M.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1783-1786. (c) Comes, M.; Rodríguez-López, G.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2919-2922.

¹⁴⁴ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C. & Beck, J. S. *Nature*, **1992**, *359*, 710-712.

¹⁴⁵ Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M., *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 1199-1202.

¹⁴⁶ Vallet-Regí, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5934-5943.

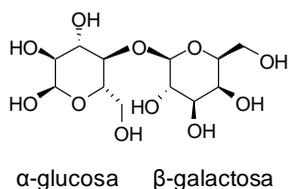


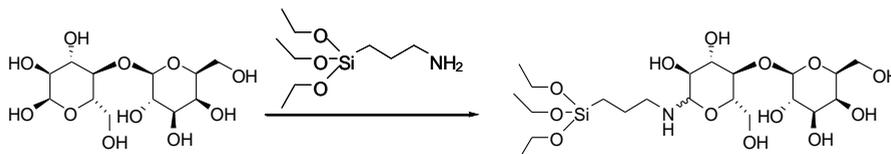
Figura 2.1. Figura de la molécula de Lactosa.

Una vez conocidos y seleccionados todos los componentes individuales que van a formar el material híbrido, hay que ensamblarlos siguiendo un orden determinado para asegurar la funcionalidad final. En primer lugar se sintetiza el soporte inorgánico mesoporoso MCM-41 y después se cargan los poros de éste con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. Posteriormente se procede al anclaje de la lactosa sobre la superficie externa del soporte cargado. Mediante este procedimiento, las moléculas de lactosa, que van a actuar como ‘puerta’, se anclan preferentemente en la superficie externa del material ya que los poros están llenos de moléculas de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$.

El material mesoporoso MCM-41, que actuará como soporte inorgánico, es sintetizado usando tetraetil ortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico y el tensoactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr) como agente director de estructura. La eliminación posterior del tensoactivo, mediante calcinación en aire a temperatura elevada, deja en el interior de la matriz silíceica un conjunto de cavidades. En esos poros del sólido mesoporoso MCM-41 se introducen las moléculas de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. Para ello la MCM-41 se suspende en una disolución acuosa conteniendo el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. De esta manera el complejo difunde de la disolución al interior de los poros. El material final obtenido se denomina **Ru-S**.

Posteriormente se procede al anclaje de la lactosa en la superficie externa de **Ru-S**. Para el anclaje de la lactosa se va a emplear la técnica de la sililación. Esta técnica se basa en la reacción de los grupos silanoles superficiales, situados en la pared del material mesoporoso, con moléculas orgánicas que han sido previamente derivatizadas con grupos alcoxido o halogenuros de silicio. Así pues, para poder anclar la lactosa en la superficie externa de **Ru-S** se derivatiza con

grupos trialcoxisilano. En concreto se va a emplear la reacción entre el 3-aminopropiltriethoxisilano (**N1**) con la lactosa en etanol. Como se puede observar en el esquema 2.1, el alcóxido **N1** se une al hidroxilo hemiacetal de la glucosa, presente en la lactosa, dando lugar a la formación de una *N*-alquil lactosilamina (**N1-Lact**).¹⁴⁷ El compuesto **N1-Lact** ya está derivatizado con tres grupos etoxisilano y se puede emplear para la funcionalización externa de **Ru-S**.



Esquema 2.1. Reacción de aminación para la obtención de **N1-Lact**.

El producto **N1-Lact** se ha caracterizado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (ver Figura 2.2). El espectro de ¹H-RMN del compuesto **N1** se caracteriza por la presencia de dos tripletes anchos centrados a 0.6 y 2.4 ppm y un quintuplete a 1.4 ppm. Estas tres señales pertenecen a tres metilenos unidos. Así la señal a 0.6 ppm corresponde al metileno unido al átomo de silicio, la centrada a 2.4 ppm al metileno contiguo al grupo amino y el quintuplete a 1.4 se asigna al metileno situado en el centro de la cadena. Además aparecen un triplete a 1.0 ppm y un cuadruplete a 3.4 ppm que pertenecen a los grupos etoxi. El espectro de ¹H-RMN del compuesto **N1-Lact** muestra las señales correspondientes a los protones de los azúcares como multipletes en el intervalo 3.0-5.0 ppm, el triplete y el cuadruplete de los etoxi centrados a 1.0 y 3.0 ppm respectivamente y el triplete del metileno contiguo al átomo de silicio a 0.6 ppm. Los cambios más significativos en el espectro de de ¹H-RMN del compuesto **N1-Lact**, cuando se compara con el de **N1**, son el quintuplete centrado a 1.5 ppm y, sobre todo, el triplete del metileno contiguo al átomo de nitrógeno que aparece a 2.7 ppm. El desplazamiento a campo más bajo de este metileno (pasa de 2.4 en **N1** a 2.7 en **N1-Lact**) es claramente debido a la

¹⁴⁷ Auvray, X.; Petipas, C.; Anthore, R. Ricco-Lates, I.; Lattes, A. *Langmuir*, **1995**, *11*, 433-439.

reacción del grupo amino de **N1** con el hidroxilo hemiacetálico de la lactosa dando lugar a la *N*-alquil lactosilamina **N1-Lact**.

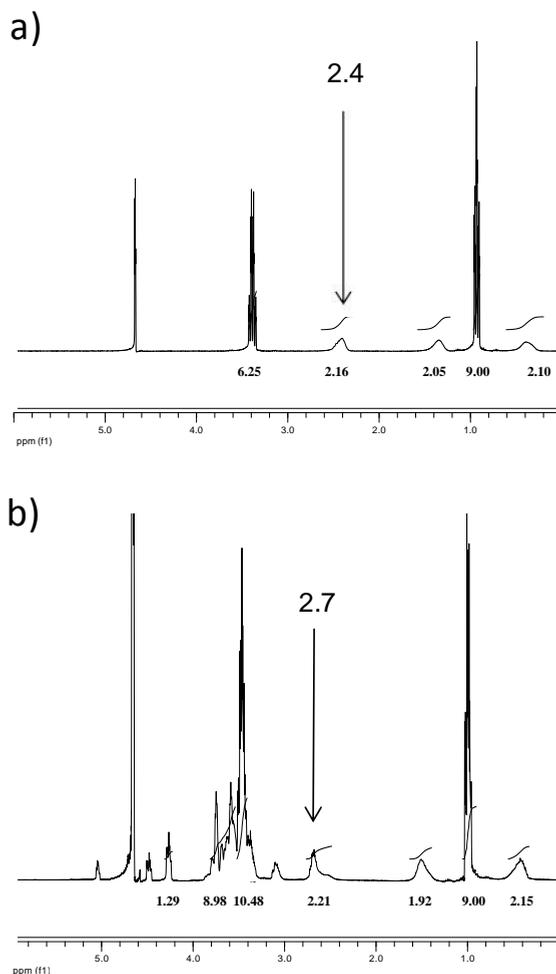
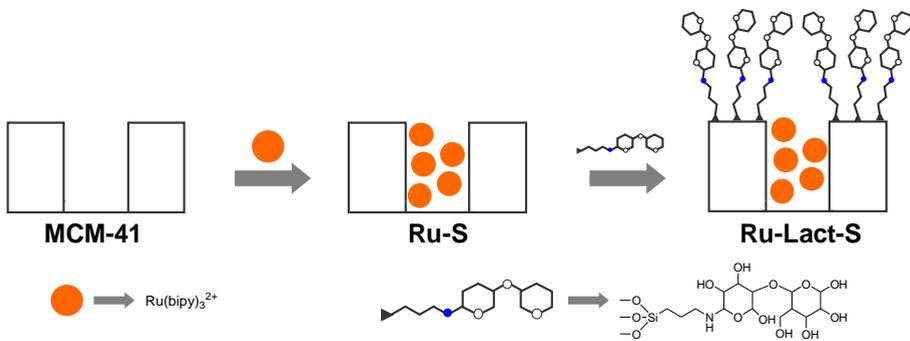


Figura 2.2. ^1H -RMN de (a) reactivo de partida **N1** y (b) del derivado final **N1-Lact**.

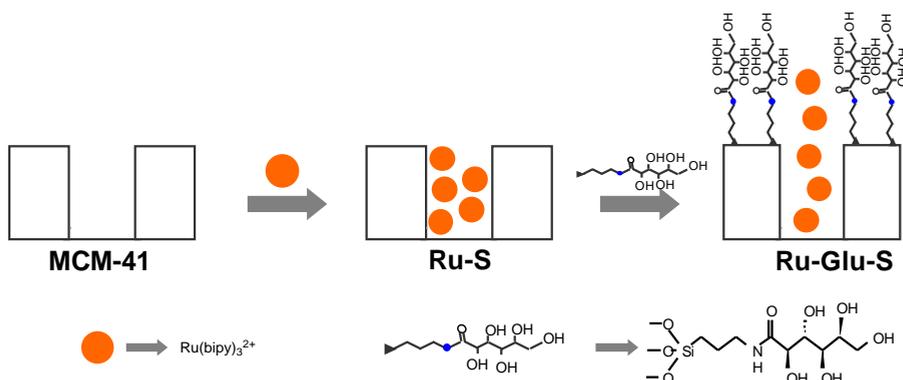
Una vez se han preparado los componentes individuales (**Ru-S** y **N1-Lact**) estos se ensamblan para obtener el material híbrido final. Así, el derivado de lactosa **N1-Lact** se ancla en la superficie externa de **Ru-S** mediante la reacción de

los trialcoxilanos con los silanoles de la superficie. Este proceso se puede observar en el esquema 2.2. El sólido final **Ru-Lact-S** es filtrado, lavado y secado a 37°C durante 12 horas. La presencia de las diferentes lactosas en la superficie del material híbrido **Ru-Lact-S** impiden la salida del complejo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ del interior de los poros. Este hecho se puede asignar a dos factores distintos pero complementarios entre ellos como son: (i) el volumen de la lactosa que de por sí bloquea parcialmente la salida de los poros y (ii) la formación de una red de enlaces de hidrógeno muy densa entre los grupos hidroxilo de las distintas moléculas de lactosa ancladas en la superficie externa de los poros que también dificulta la salida del complejo.



Esquema 2.2. Esquema del proceso de síntesis del sólido **Ru-Lact-S**.

Con el objetivo de determinar el papel clave que tiene la lactosa en el sólido **Ru-Lact-S** se sintetiza un material híbrido funcionalizado con un solo monosacárido **Ru-Glu-S**. Este material híbrido se prepara a partir del sólido **Ru-S** funcionalizado en su superficie externa con un monosacárido comercial el *N*-(3-trietoxisililpropil)gluconamida (ver esquema 2.3). Se ha seleccionado este monosacárido por que tiene un tamaño similar a la molécula de glucosa que queda anclada en la superficie del sólido **Ru-Lact-S** después de la hidrólisis de la lactosa.



Esquema 2.3. Esquema del proceso de síntesis del sólido **Ru-Glu-S**.

2.2.2 Caracterización de materiales.

Los sólidos preparados en el presente capítulo son caracterizados utilizando las técnicas estándar en la química del estado sólido: difracción de Rayos-X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental y análisis de las isotermas de adsorción-desorción de N_2 .

En la figura 2.3, se pueden observar los difractogramas de Rayos X de polvo (PXRD) de los sólidos MCM-41 sintetizada, MCM-41 calcinada y los sólidos finales **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S**. El PXRD a ángulos bajos, de la MCM-41 sintetizada, antes de la calcinación, curva a, muestra los cuatro planos de reflexión representativos de la estructura hexagonal, que pueden ser asignados a los planos de Bragg (100), (110), (200), y (210), con un parámetro de celda a_0 con valor de 43.83 Å (distancia entre planos $d_{100} = 38$ Å). En la figura 2.3 se puede observar en el PXRD de la muestra MCM-41 calcinada, curva b, un desplazamiento significativo de la reflexión (100). Este desplazamiento es debido a una contracción de la celda de aproximadamente 6-8 Å. El desplazamiento y ensanchamiento de los picos (110) y (200) es debido, probablemente, a la condensación de los silanoles de la superficie del material durante el proceso de calcinado. La figura 2.3 también muestra la curva correspondiente al material **Ru-Lact-S**, curva c. Este sólido muestra unos planos de reflexión (110) y (200) muy

pequeños. Esta reducción es debida, probablemente, a la presencia del colorante de Rutenio en el interior de los poros de la MCM-41. Sin embargo, la presencia clara de la reflexión (100) en este difractograma sugiere que el proceso de carga con el colorante y la posterior funcionalización adicional con el derivado de lactosa, que actúa como 'puerta molecular', no ha modificado la estructura mesoporosa de la MCM-41. **Ru-Glu-S** muestra un difractograma similar al medido para la muestra **Ru-Lact-S** (curva d). La estructura mesoporosa de los sólidos **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S** también se puede observar mediante la utilización de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes de TEM de los sólidos **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S** muestra la típica porosidad desordenada hexagonal de la matriz MCM-41 (figura 2.4). Los datos obtenidos de los difractogramas de Rayos X de polvo y de TEM demuestran que tanto el cargado de los poros como la posterior funcionalización externa no modifican la estructura tridimensional inicial del material mesoporoso.

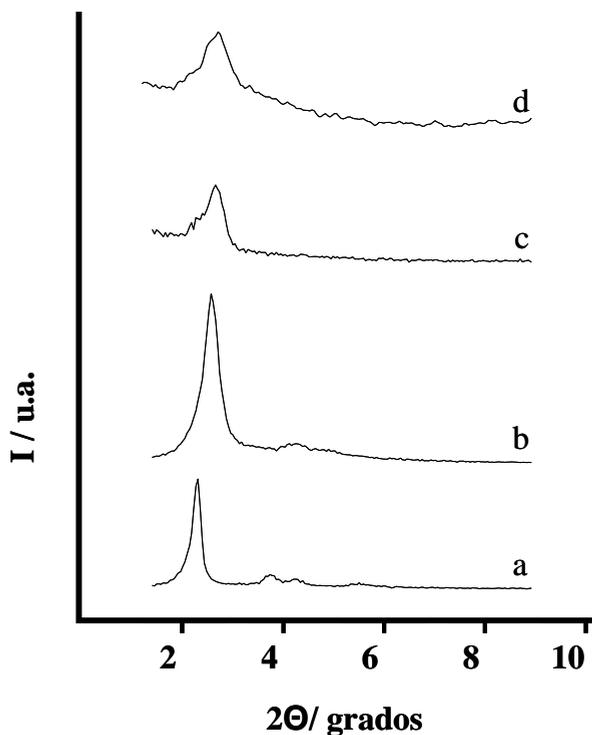


Figura 2.3. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada, (c) *Ru-Lact-S* y (d) *Ru-Glu-S*.

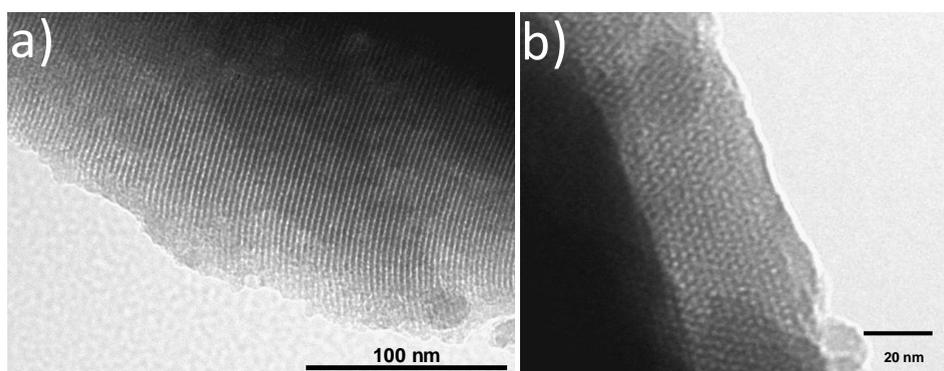


Figura 2.4. Imagen de TEM de (a) *Ru-Lact-S* y (b) *Ru-Glu-S*, mostrando la porosidad característica del material mesoporoso MCM-41.

Otra técnica utilizada para la caracterización del sistema de poros de la MCM-41 y de los diferentes sólidos preparados es el análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 (figura 2.5). Dicha técnica permite obtener a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) el área superficial, el tamaño y el volumen de poro de los distintos materiales. Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 de la fase calcinada de la MCM-41 (figura 2.5, curva a) muestra un salto característico de los mesoporos de la MCM-41 a valores de presión intermedia ($0.2 < P/P_0 < 0.4$) que corresponde a una isoterma del tipo IV. Este salto es debido a la condensación de nitrógeno por capilaridad dentro de los mesoporos. La ausencia de ciclo de histéresis en este intervalo y la forma de la curva sugiere la existencia de mesoporos uniformes y cilíndricos con un diámetro de poro, calculado mediante el uso del método Barrett-Joyner-Halenda (BJH),¹⁴⁸ de 2.4 nm y un volumen de poro de $0.47 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$. El uso del método Brunauer-Emmett-Teller¹⁴⁹ (BET), dio un valor para la superficie total específica de $1200 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, ver tabla 2.1. En combinación con los datos de RX, que nos han permitido obtener un parámetro de celda a_0 de 37.2 Å (distancia entre planos $d_{100} = 32$ Å), podemos calcular que el espesor de la pared de sílice entre poros es de 13.3 Å. Por otro lado, las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para el sólido **Ru-Lact-S** muestran la típica curva con los meoporoso llenos (figura 2.5 curva b). Esa curva plana, cuando se compara con la de la MCM-41 calcinada, es indicativa de la ausencia de cualquier porosidad que, junto con una conservación del orden pseudo-hexagonal deducido por medio de la difracción de RX y el estudio por TEM, evidencian un cargado del colorante altamente efectivo. Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 del sólido **Ru-Glu-S** (ver figura 2.5 curva c) también muestra una curva típica de los materiales MCM-41 con los mesoporos llenos de carga juntamente con una disminución significativa en el volumen de N_2 adsorbido. Por este motivo el sólido presenta una curva plana, cuando se compara (a la misma escala) con la curva de la MCM-41 calcinada. Este hecho es indicativo de la ausencia de porosidad debido al cargado de los poros con el colorante y la consiguiente funcionalización con la gluconamida.

¹⁴⁸ Barret, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 373-380.

¹⁴⁹ Brunauer, S. ; Emmett, P. H. ; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 309-319.

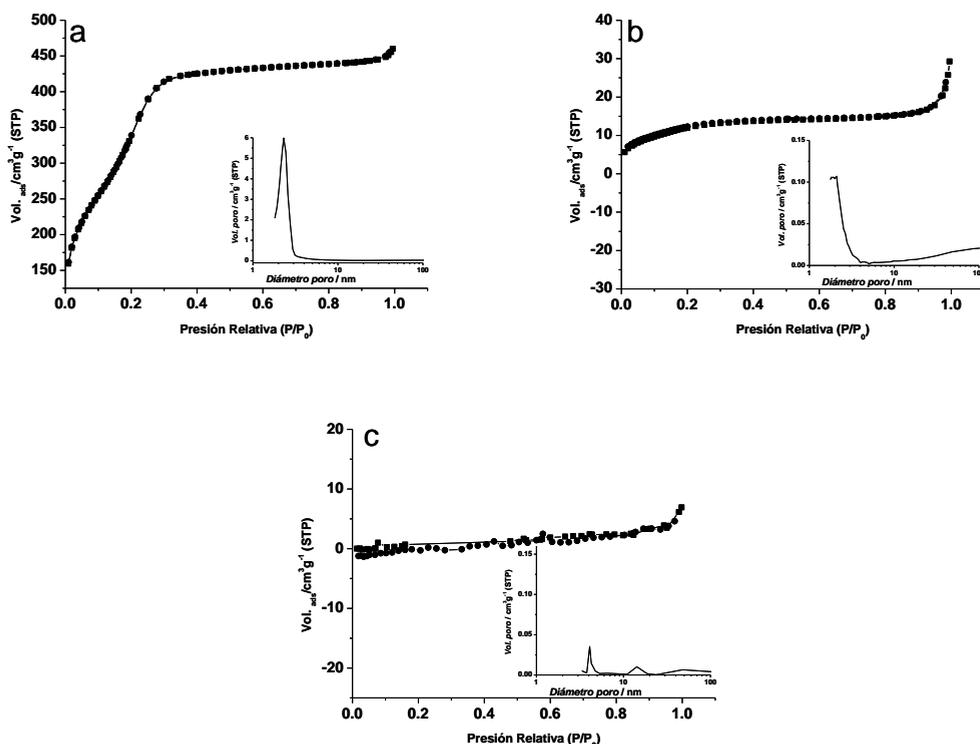


Figura 2.5. *Isotermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para los sólidos (a) MCM-41, (b) Ru-Lact-S y (c) Ru-Glu-S. (V_{ADS} : Volumen Adsorbido en cm^3/g).*

Tabla 2.1. *Valores de la superficie total específica BET, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de las isotermas de adsorción-desorción de N_2 para los materiales seleccionados.*

Sólido	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	Volumen de poro ^a ($cm^3 g^{-1}$)	Tamaño de poro ^a (nm)
MCM-41	1200	0.47	2.40
Ru-Lact-S	45	0.04	< 2
Ru-Glu-S	10	0.01	< 2

^a Volumen (V) y diametro (D) del mesoporo.

Para determinar la cantidad de materia orgánica de los diferentes sólidos sintetizados se utilizaron las técnicas de análisis elemental y termogravimetría. Los contenidos se recogen en la tabla 2.2. El sólido final **Ru-Lact-S** contiene 0.283 mmol de lactosa por gramo de SiO₂ y 0.194 mmol de complejo de rutenio por gramo de SiO₂. La diferencia en la cantidad de complejo cargado en los dos materiales finales es debida al lavado más intensivo al que se somete al material **Ru-Lact-S**. El material **Ru-Glu-S** se lava menos para evitar la difusión del complejo al exterior ya que la gluconamida no es capaz de cerrar de una manera eficiente los poros del soporte inorgánico. En cuanto a la cantidad de azúcar pegado en ambos materiales (ver tabla 2.2) es mayor en el sólido **Ru-Lact-S** que en el **Ru-Glu-S**. Esta discrepancia no puede ser asignada a diferencias en el tamaño de las moléculas que actúan de ‘puerta’ ya que el compuesto **N1-Lact** mide unos 14 Å mientras que el tamaño de la gluconamida es de aproximadamente 12 Å. Estos datos apuntan en la dirección de que el factor clave para explicar las diferencias observadas es el volumen de las moléculas y no su longitud.

Tabla 2.2. Contenido (α) de colorante y de derivado de lactosa por mol y por gramo de SiO₂ para los sólidos **Ru-S**, **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S**.

Sólido	$\alpha_{\text{sacárido}}$ (mmol/g SiO ₂)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (mmol/g SiO ₂)	$\alpha_{\text{sacárido}}$ (g/g SiO ₂)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (g/g SiO ₂)
Ru-S	-	0.491	-	0.367
Ru-Lact-S	0.283	0.194	0.102	0.145
Ru-Glu-S	0.177	0.477	0.031	0.357

2.2.3 Mecanismo de ‘puerta’ con respuesta enzimática.

Una vez caracterizado el material híbrido **Ru-Lact-S** se procede a estudiar el funcionamiento del derivado de lactosa **N1-Lact** como ‘puerta nanoscópica molecular’. Para ello se estudia la liberación del complejo Ru(bipi)₃²⁺ desde el interior de los poros en ausencia y en presencia de la enzima β -D-galactosidasa. Esta enzima es capaz de hidrolizar el enlace O-glicosídico que une la β -galactosa

y la α -glucosa. La ruptura del disacárido lactosa va a reducir el tamaño de la molécula anclada en la superficie y va a controlar la accesibilidad del poro. Como se ha comentado anteriormente el efecto de la 'puerta molecular' se monitoriza mediante el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ liberado. Así, se va a medir la banda de emisión de dicho complejo a 610 nm, previa excitación a 453 nm (banda de transferencia de carga del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$).

En un primer lugar se estudia la liberación del material híbrido **Ru-Lact-S** en ausencia de la enzima β -D-galactosidasa a pH 7.5 (pH intestinal donde ocurren típicamente las reacciones enzimáticas de degradación de azúcares). En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Ru-Lact-S** era suspendida en agua a pH 7.5. A continuación la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas y 5 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación era monitorizada registrando la intensidad de emisión del complejo de rutenio, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 610 nm.¹⁵⁰ La figura 2.6 muestra que la liberación del complejo desde el sólido **Ru-Lact-S** es prácticamente cero. También se demostró que la liberación de la carga del material **Ru-Lact-S** a pH 2.0 (condiciones de pH encontradas en el estómago) era cercana a cero.

En contraste con el ensayo anterior, la liberación del complejo desde el sólido **Ru-Lact-S** en presencia de la enzima β -D-galactosidasa a pH 7.5 es marcadamente diferente. En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Ru-Lact-S** era suspendida en una disolución de la enzima β -D-galactosidasa en agua a pH 7.5 y, a continuación, la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas y 5 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación era monitorizada midiendo la intensidad de emisión del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 610 nm (excitando a 453 nm). Como se puede observar en la figura 2.6 la presencia de la enzima induce un aumento importante de la intensidad de emisión que es indicativo de una liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. En la figura 2.6 también se observa como el

¹⁵⁰ (a) Felix, F.; Ferguson, J.; Guedel, H. U.; Ludi, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4096-4102. (b) Lytle, F. E.; Hercules, D. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 253-257.

aumento de la intensidad de emisión es proporcional a la cantidad de colorante liberado del interior de los poros del material híbrido **Ru-Lact-S**. Así, a pH 7.5 y en ausencia de enzima se observa una liberación del colorante de no más del 5% a las 5 horas de liberación. En cambio se observa la máxima liberación, en presencia de la enzima y a ese mismo pH, después de 5 horas. Además, el perfil de liberación de **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa muestra una liberación constante de la carga ocluida en los poros durante al menos 5 horas. Este comportamiento es especialmente interesante en ciertas aplicaciones para evitar picos de liberación.

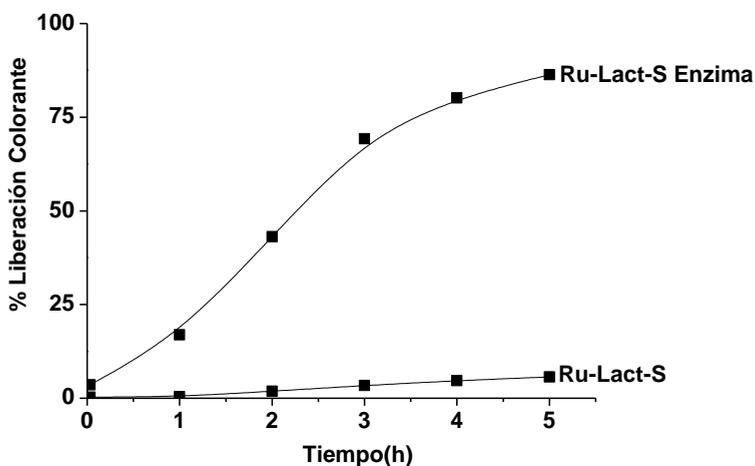


Figura 2.6. Cinética de liberación del complejo $Ru(bipi)_3^{2+}$, desde una suspensión del sólido **Ru-Lact-S** en ausencia y presencia de la enzima β -D-galactosidasa, en agua a pH 7.5.

La liberación del complejo desde el material híbrido **Ru-Lact-S** puede seguirse incluso a simple vista. Como se puede observar en la figura 2.7, la liberación del complejo en ausencia de enzima es prácticamente nula y la disolución es incolora. En cambio, en presencia de la enzima β -D-galactosidasa se observa la aparición de un color amarillo que indica la liberación del complejo $Ru(bipi)_3^{2+}$.

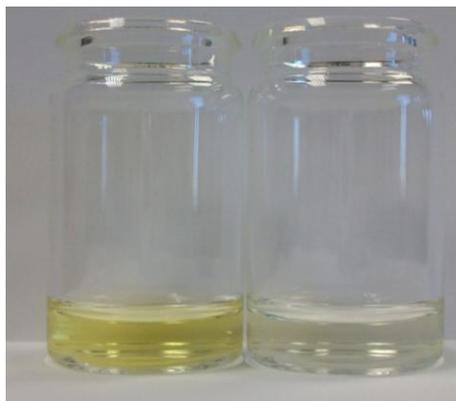
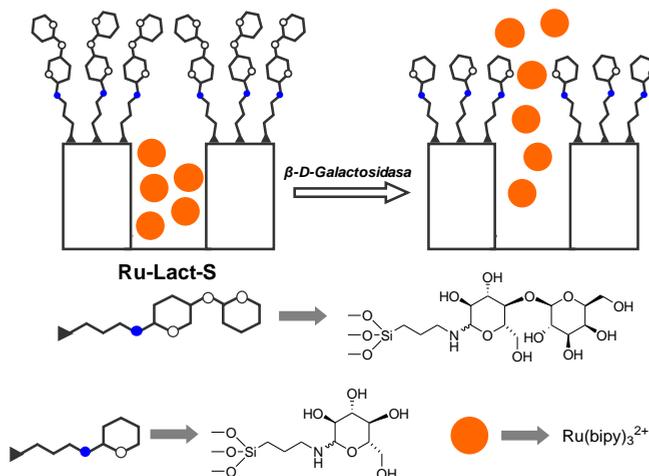


Figura 2.7. Liberación del complejo $Ru(bpi)_3^{2+}$ del sólido **Ru-Lact-S**. La fotografía muestra una suspensión del material híbrido en presencia de la enzima β -D-galactosidasa (izquierda) y en ausencia de la enzima (derecha) a las 5 horas.

Como se ha comentado anteriormente y se puede observar en la cinética de liberación de la figura 2.6, el material **Ru-Lact-S** muestra una liberación cercana a 0 al ponerse en contacto con una disolución acuosa a pH 7.5 en ausencia de la enzima β -D-galactosidasa. En estas condiciones la ‘puerta molecular’ esta cerrada debido a que el anclaje del disacárido lactosa en la superficie externa de los poros inhibe la liberación del colorante. Esta inhibición es una consecuencia directa del volumen de las lactosas y de la formación de una red de enlaces de hidrógeno, entre los hidroxilos de distintas moléculas de lactosa, sobre los poros. Por el contrario, este hecho no ocurre en presencia de la enzima β -D-galactosidasa ya que la hidrólisis del enlace O-glicosídico, que une los monosacáridos β -galactosa y α -glucosa, libera galactosa (una mezcla del anómero α y β) a la disolución. Como consecuencia de esta hidrólisis enzimática, un derivado de glucosa se queda anclado en la superficie del sólido. Esta importante reducción de tamaño del azúcar, unida a la disminución en el número de enlaces de hidrógeno, permite la liberación del complejo de rutenio del interior de los poros. El mecanismo de liberación enzimática con β -D-galactosidasa en el sólido **Ru-Lact-S** se puede observar en el esquema 2.4.



Esquema 2.4. Esquema del proceso de liberación del sólido **Ru-Lact-S** en presencia de la enzima β -D-galactosidasa.

Para confirmar que el mecanismo de liberación es la ruptura del enlace O-glicosídico de la lactosa por acción de la enzima β -D-galactosidasa, se realizaron ensayos de ¹H-RMN y HPLC. Así, utilizando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón, ¹H-RMN, se estudia la disolución obtenida después de la hidrólisis enzimática del material **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa, y en el espectro ¹H-RMN se puede observar las señales correspondientes a los protones de la galactosa en el intervalo comprendido entre 3.0 y 5.0 ppm. En cuanto al estudio realizado mediante HPLC, la disolución obtenida después de la hidrólisis enzimática del material **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa, se registra en un HPLC de índice de refracción con columna analítica, utilizando agua como eluyente. En primer lugar se registraron cromatogramas de disoluciones patrón de β -galactosa y lactosa. Como se puede observar en la figura 2.8, el cromatograma de la β -galactosa muestra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 4.2 minutos y uno minoritario a 6 minutos (este debido al anómero α de la galactosa). En cuanto a la disolución patrón de lactosa se puede observar un único pico con un tiempo de retención de 4.8 minutos. A continuación, se procedió al análisis de las aguas de liberación del material **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa. En el cromatograma (c, figura 2.8) se puede observar la presencia

de dos picos con tiempos de retención de 4.2 y 6.0 minutos y que corresponden con los anómeros α y β de la galactosa. Por lo tanto, queda confirmado que el mecanismo que controla la liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ del interior de los poros del sólido **Ru-Lact-S** es la hidrólisis enzimática del enlace O-glicosídico de la lactosa.

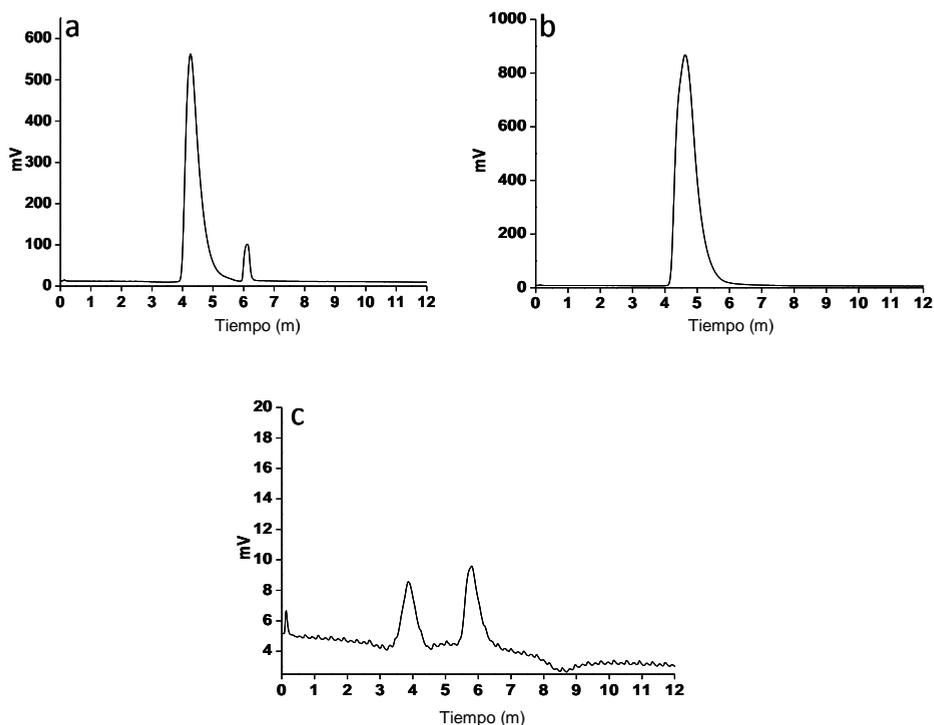


Figura 2.8. Cromatogramas de HPLC (detector de índice de refracción) de: (a) patrón de β -galactosa, (b) patrón de lactosa y (c) cromatograma de la disolución obtenida después de la liberación del sólido **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa.

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados anteriormente se puede concluir que pequeños cambios en la estructura de la molécula que actúa como 'puerta' (la transformación de un disacárido en un monosacárido) producen cambios notables en el comportamiento de la liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$

(desde liberación 'cero' a una liberación total de la carga). Para demostrar este hecho se ha estudiado el comportamiento del material híbrido **Ru-Glu-S**. Este material consiste en un soporte MCM-41 cuyos poros se han cargado con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y la superficie externa funcionalizada con el monosacárido comercial *N*-(3-trietoxisililpropil)gluconamida. En la figura 2.9 se muestran las cinéticas de liberación de los materiales **Ru-Glu-S** y **Ru-Lact-S** en ausencia de la enzima β -D-galactosidasa a pH 7.5. Como se puede observar, mientras que el sólido **Ru-Lact-S** muestra una liberación cercana a 0, el material **Ru-Glu-S** muestra máxima liberación al mismo tiempo. Además, se puede observar como la liberación desde el material **Ru-Glu-S** en ausencia de enzima es prácticamente idéntica a la que presenta el material **Ru-Lact-S** en presencia de β -D-galactosidasa. Estos resultados recalcan que la liberación del complejo, en presencia de la enzima β -D-galactosidasa, se debe a la ruptura enzimática del enlace O-glicosídico y por tanto a la reducción del tamaño de la cadena de sacáridos en la superficie (paso de un disacárido a un monosacárido).

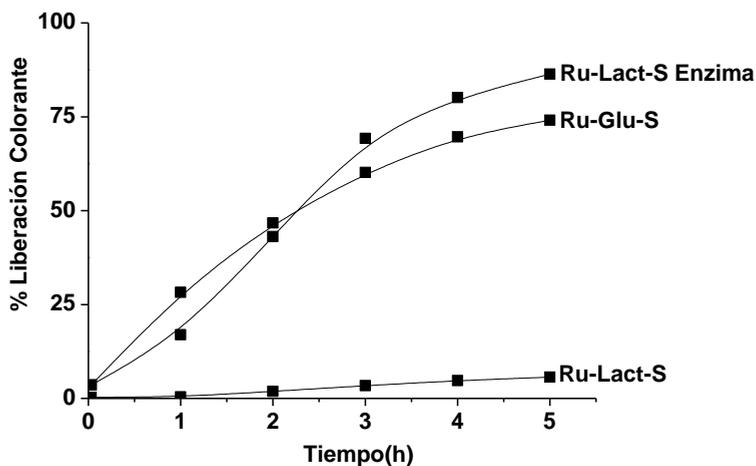


Figura 2.9. Cinética de liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ desde una suspensión del sólido **Ru-Lact-S** en ausencia y presencia de la enzima β -D-galactosidasa en agua a pH 7.5 y desde una suspensión del sólido **Ru-Glu-S** en agua a pH 7.5.

Para estudiar más en profundidad el efecto que produce la reacción de hidrólisis de la lactosa inducida por la β -D-galactosidasa en la accesibilidad de los poros, se preparan y caracterizan los materiales **Ru-Lact-S-L** y **Ru-Glu-S-L**. El sólido **Ru-Lact-S-L** fue obtenido a partir del sólido **Ru-Lact-S** después de ponerlo en contacto con la enzima β -D-galactosidasa y permitir la liberación del complejo del interior de los poros durante 24 horas. El material **Ru-Lact-S-L** tiene un color amarillo pálido debido a que parte del complejo no se libera por estar adsorbido en las paredes de la matriz silícea. El sólido **Ru-Glu-S-L** fue obtenido a partir del sólido **Ru-Glu-S**, después de permitir la liberación del colorante del interior de los poros durante 24 horas. En este caso el material **Ru-Glu-S-L** también presenta una coloración amarilla residual del complejo adsorbido en las paredes de la matriz silícea que no ha sido liberado.

Ambos materiales fueron caracterizados mediante difracción de Rayos X de polvo y mediante porosimetría. El difractograma de Rayos X de polvo del material **Ru-Lact-S-L** muestra un aumento de intensidad de la reflexión asociada al plano 100, cuando se compara con el medido para **Ru-Lact-S** (ver figura 2.10), esto indica que la liberación del complejo del interior de los poros, se relaciona con el aumento del contraste y por tanto con la recuperación casi total de la matriz previa al llenado del poro. Prácticamente los mismos resultados se obtienen al comparar los difractogramas de los materiales híbridos **Ru-Glu-S-L** y **Ru-Glu-S**.

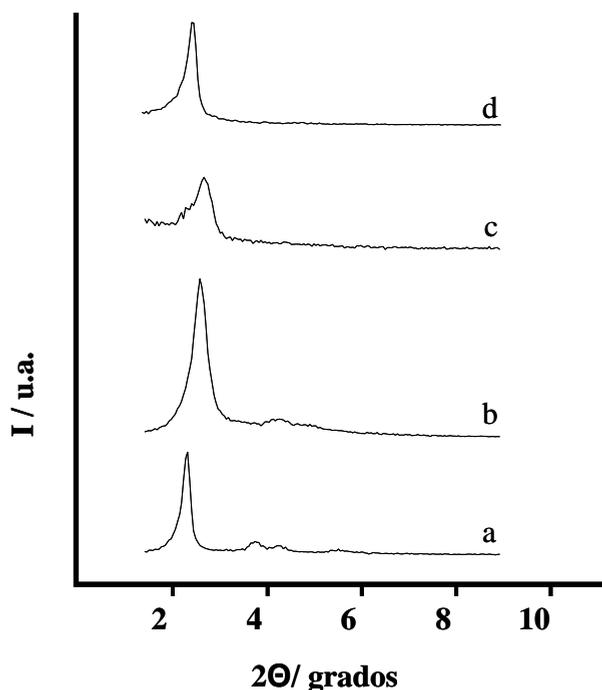


Figura 2.10. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada, (c) **Ru-Lact-S** y (d) **Ru-Lact-S-L**.

También se determinan las isotermas de adsorción-desorción de N_2 de los materiales **Ru-Lact-S-L** y **Ru-Glu-S-L**, ver figura 2.11. La isoterma de adsorción-desorción del sólido **Ru-Lact-S-L** da, a valores de presión parcial media, una curva que muestra un ciclo de histéresis pequeño de tipo H2. Esta curva es compatible con un proceso de adsorción en multicapas característico de materiales con poros vacíos. Teniendo en cuenta las condiciones de secado a las que se llega durante el proceso de vaciado del material inicial podemos atribuir esta absorción a una porosidad textural entre partículas debida a los restos de sacárido anclado en la superficie externa de las micropartículas de MCM-41. Por otra parte, tanto el área superficial BET como el volumen de poro BJH (véase tabla 2.3) aumentan de forma significativa después de la liberación del complejo. Estos valores indican claramente que parte de la porosidad de la matriz silícea se recupera después del proceso de liberación del complejo de rutenio. Sin embargo,

parte de la superficie se ha perdido (se pasa de $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para la MCM-41 a $450 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para el material **Ru-Lact-S-L**) debido, probablemente, a que hay una parte del colorante que no se ha liberado y a que quedan restos de sacárido anclado en el soporte inorgánico. Las isothermas de adsorción-desorción del sólido **Ru-Glu-S-L** presentan una forma similar a la del material **Ru-Lact-S-L** y los datos del área superficial y volumen de poro indican también una recuperación parcial del sistema poroso.

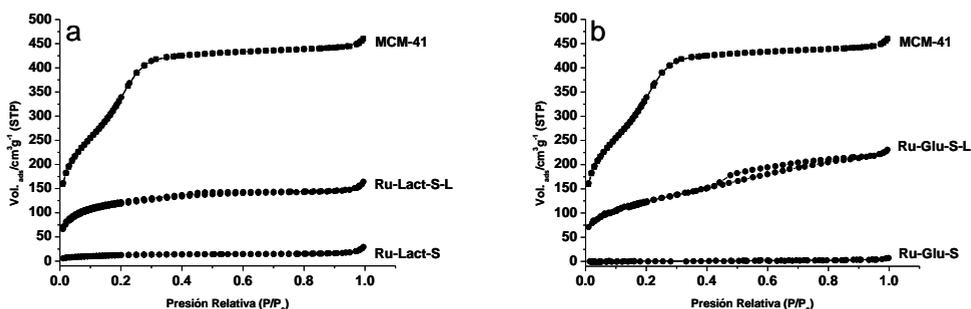


Figura 2.11. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 para los sólidos (a) MCM-41, **Ru-Lact-S-L** y **Ru-Lact-S** y (b) MCM-41, **Ru-Glu-S-L** y **Ru-Glu-S**. (V_{ADS} : Volumen Adsorbido en cm^3/g).

Tabla 2.3. Valores de la superficie total específica BET, volumen de poro y tamaño de poro calculados mediante las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para los materiales seleccionados.

Sólido	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	Volumen de poro ^a ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	Tamaño de poro ^a (nm)
MCM-41	1200	0.47	2.40
Ru-Lact-S	45	0.04	< 2
Ru-Lact-S-L	450	0.15	< 2
Ru-Glu-S	10	0.01	< 2
Ru-Glu-S-L	452	0.11	< 2

^a Volumen (V) y diametro (D) del mesoporo.

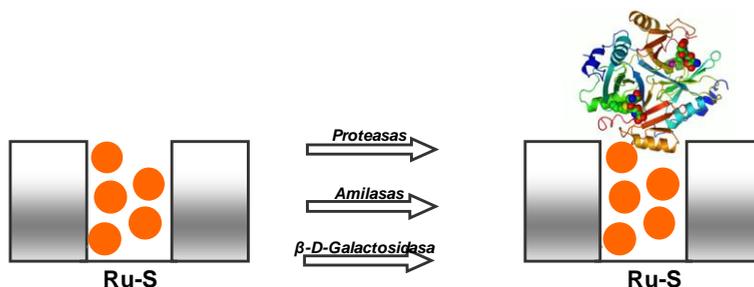
En relación con el cálculo del diámetro de poro del material **Ru-Lact-S-L** se observaba, en su curva de distribución de tamaño de poro BJH, unos picos no muy bien definidos pero con dos hombros apreciables (a 2.0 y 2.15 nm) que podría estar relacionado con poros en la frontera entre los meso y microporos (supermicroporos). Los valores obtenidos están relacionados con un bloqueo parcial no homogéneo de los poros, debido, fundamentalmente, a los monosacáridos anclados en la entrada de los mismos y a la presencia de colorante residual no liberado que está adsorbido en las paredes de la MCM-41.

Finalmente se determina el contenido en materia orgánica, mediante análisis elemental y termogravimétrico, del material **Ru-Lact-S-L**. El contenido en sacárido medido es de 0.295 mmol / g de SiO₂ mientras que el de complejo de rutenio es de 0.038 mmol / g SiO₂. Estos valores indican que se ha producido una liberación elevada del complejo de rutenio del interior de los poros (liberación del 80%), ya que el material de partida **Ru-Lact-S** tiene un contenido de colorante de 0.194 mmol / g SiO₂.

Además de las pruebas anteriores, que evidencian que la ruptura del enlace O-glicosídico es el mecanismo de liberación, se han llevado a cabo diferentes experiencias para demostrar la especificidad de la enzima β -D-galactosidasa en el proceso de apertura de la 'puerta nanoscópica molecular' y la consiguiente liberación controlada del complejo Ru(bipy)₃²⁺.

Para ello, se sintetizó el material híbrido **Ru-S** que está formado por una matriz silíceo de MCM-41 con el complejo de rutenio Ru(bipy)₃²⁺ en el interior de los poros y sin estar funcionalizado con un azúcar en la superficie. Este material se ha sintetizado con el fin de evaluar el efecto de la lactosa anclada en el exterior de los poros del material **Ru-Lact-S**. Suspensiones acuosas a pH 7.5 del sólido **Ru-S** mostraron una rápida liberación del complejo de acuerdo con la ausencia de lactosa anclada en la superficie del material. Sin embargo, se observaba como la liberación del complejo se inhibía completamente cuando el sólido **Ru-S** se ponía en contacto con una disolución de β -D-galactosidasa a pH 7.5. Esta inhibición se asigna a una adsorción no selectiva de la enzima en la superficie del material **Ru-S** a través de interacciones con los grupos silanol (ver esquema 2.5). Se observó

el mismo fenómeno (inhibición de la liberación del complejo) al añadir otras enzimas (pepsinas proteasas digestivas o amilasas del páncreas) a suspensiones acuosas a pH 7.5 del material **Ru-S**. Estos resultados muestran el papel crucial desempeñado por el derivado de lactosa en el mecanismo de la 'puerta molecular'. Así, la lactosa anclada en la superficie impide la adsorción no específica de la enzima β -D-galactosidasa y permite, al mismo tiempo, la liberación del complejo atrapado en el interior de los poros al hidrolizarse.



Esquema 2.5. Esquema del proceso de bloqueo del sólido **Ru-S**, en presencia de otras enzimas como son: proteasas, amilasas y β -D-galactosidasa.

Por último, para demostrar que la β -D-galactosidasa es la responsable de la liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, se llevaron a cabo dos experimentos adicionales. En un primer experimento la enzima β -D-galactosidasa fue desnaturalizada, calentando la solución enzimática a pH 7.5 a 60 ° C durante 60 minutos, antes de la adición a la suspensión acuosa del sólido **Ru-Lact-S**. En estas condiciones no se observa liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ ya que la β -D-galactosidasa desnaturalizada es incapaz de hidrolizar el enlace O-glicosídico de la lactosa. En un segundo experimento se añadieron las enzimas pepsina proteasa digestiva y amilasas del páncreas sobre suspensiones acuosas del material **Ru-Lact-S**. Se pudo comprobar la inhibición de la liberación en presencia de estas enzimas. Por tanto, los resultados obtenidos en ambos experimentos demuestran, de nuevo, que la hidrólisis enzimática selectiva de la lactosa por parte de la enzima β -D-galactosidasa es la responsable del mecanismo de apertura de la 'puerta molecular'.

2.3 Conclusiones.

Se ha demostrado que el anclado de un derivado de lactosa en la superficie de un soporte de sílice mesoporoso da lugar a la preparación de un material híbrido funcionalizado con una ‘puerta nanoscópica molecular’ que permite la liberación controlada de un complejo coloreado empleando la enzima específica intestinal β -D-galactosidasa como ‘llave’.

Se ha preparado el sólido **Ru-Lact-S** que consiste en una estructura mesoporosa MCM-41 que contiene un derivado de lactosa anclado en la superficie externa y un complejo de rutenio ocluido en el interior de los poros. Gracias a la presencia de la enzima β -D-galactosidasa es posible controlar la liberación del complejo debido a la hidrólisis de la lactosa. Se ha demostrado la especificidad de la enzima β -D-galactosidasa comparándola con diferentes enzimas presentes en el aparato digestivo (amilasas del páncreas y las pepsinas del estómago). La desnaturalización de la enzima β -D-galactosidasa (calentando a 60° C) impide la hidrólisis de la lactosa en el sólido **Ru-Lact-S** con la consiguiente inhibición de la liberación del complejo.

El desarrollo de dispositivos nanoscópicos mesoporosos conteniendo moléculas que actúan como ‘puertas nanoscópicas moleculares’ y que permitan la liberación controlada de carga en presencia de una molécula biológica es un área de investigación importante. El desarrollo y la posible aplicación de estos nanodispositivos en el campo de la biomedicina se explorará en el próximo capítulo de esta tesis doctoral.

**Capítulo 3: Liberación controlada intracelular
con respuesta enzimática, basada en
nanopartículas de sílice mesoporosa
funcionalizadas con polisacáridos.**

3 Liberación controlada intracelular con respuesta enzimática, basada en nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con polisacáridos.

3.1 Introducción.

La liberación controlada de antitumorales, péptidos o fragmentos de ácidos nucleicos en una célula específica es un campo de investigación nuevo y prometedor en las ciencias biomédicas, como ya se ha venido comentando en la presente tesis doctoral. Los sistemas de liberación tradicionales están basados en muchos casos en polímeros orgánicos, que normalmente liberaban la carga mediante procesos de difusión controlada, o por degradación de la matriz polimérica.^{151,152,153,154,155,156,157} Cómo se ha descrito anteriormente, actualmente se está utilizando otro tipo de sistemas de liberación controlada como alternativa a los materiales poliméricos, basados en el uso de soportes de sílice mesoporosa (SMPS). Estos materiales inorgánicos están siendo utilizados como almacén de drogas y moléculas orgánicas con capacidad de liberar su carga a voluntad.^{158,159,160,161,162,163,164} Los soportes de sílice mesoporosa proporcionan

¹⁵¹ Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *277*, 119-131.

¹⁵² Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K.L. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 3-13.

¹⁵³ Traitel, T.; Goldbart, R.; Kost, J. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2008**, *19*, 755-767.

¹⁵⁴ Puoci, F.; Iemma, F.; Picci, N. *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 85-96.

¹⁵⁵ Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R.; Bodmeier, R. *J. Control. Release*, **2008**, *125*, 1-15.

¹⁵⁶ Harrison, K. *Biomed. Polym.*, **2007**, 33-56.

¹⁵⁷ Nair, L.S.; Laurenciana, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762-798.

¹⁵⁸ Schmaljohann, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2006**, *58*, 1655-1670.

¹⁵⁹ (a) Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548-7558. (b) Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P. ; Pérez-Pariente, J. *J. Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308-311.

¹⁶⁰ Lu, J.; Choi, E.; Tamanoi, F.; Zink, J.I. *Small*, **2008**, *4*, 421-426.

¹⁶¹ (a) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S. -Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845-8849. (b) Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 1225-1236.

características únicas tales como alta estabilidad física y química, biocompatibilidad, gran capacidad de carga, y facilidad de funcionalizar su superficie externa con diferentes moléculas. La inclusión de ciertas agrupaciones moleculares en la superficie externa puede dar lugar a la preparación de materiales conteniendo 'puertas nanoscópicas moleculares' que pueden ser empleados en procesos de liberación controlada.^{165,166,167}

Por todo ello, el desarrollo de materiales mesoporosos con 'puertas moleculares' que permiten la liberación a voluntad de carga ocluida en su interior al aplicar diferentes estímulos externos, está actualmente considerado uno de los campos de investigación más en auge en los últimos años.¹⁶⁸ Muchos de estos sistemas están inspirados en bio-canales, bio-puertas y en general en bio-herramientas capaces de generar movimiento gracias a la presencia de estímulos externos. Una de las aplicaciones más importantes de estos sistemas es su uso como almacén de carga para su posterior liberación bajo la aplicación de un estímulo externo.¹⁶⁹ Cómo ya se ha explicado en los capítulos anteriores, el

(c) Vivero-Escoto, J.L.; Slowing, I.I.; Wu, C.-Y.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3462-3463. (d) Mortera, R.; Vivero-Escoto, J.; Slowing, I.I.; Garrone, E.; Onida, B.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2009**, 3219-3221. (e) Zhao, Y.; Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8398-8400. (f) Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Small*, **2010**, *6*(18), 1952-1967. (g) Zhao, Y.; Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2010**, *7*(9), 1013-1029.

¹⁶² Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Zhao, Y.-L.; Tamanoi, F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.; Nel, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12690-12697.

¹⁶³ Kim, H.; Kim, S.; Park, C.; Lee, H.; Park, H. J.; Kim, C. *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 4280-4283.

¹⁶⁴ Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3216-3251.

¹⁶⁵ Muñoz, B.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 500-503.

¹⁶⁶ Saha, S.; Leung, K. C. F.; Nguyen, N. T.; Stoddart, J. F.; Zink, J.I. *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 685-693.

¹⁶⁷ Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J.L.; Wu, C.-Y.; Lin, V.S.-Y. *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 1278-1288.

¹⁶⁸ (a) Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081-3093.

(b) Ariga, K.; Hill, J. P.; Lee, M. V.; Vinu, A.; Charvet, R.; Acharya, S. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2008**, *9*, 014109-014204.

¹⁶⁹ (a) Descalzo, A. B.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Hoffmann, K.; Rurack, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924-5948. (b) Ariga, K.; Vinu, A.; Hill, J. P.; Mori, T.; *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2562-2591.

desarrollo de ‘puertas nanoscópicas moleculares’,¹⁷⁰ permite el transporte de masa controlando la entrada y/o salida de moléculas del interior de los mesoporos al exterior. El control de la ‘apertura’ o ‘cierre’ de los poros se puede llevar a cabo aplicando estímulos externos como cambios del pH del medio, potencial redox, o irradiando con luz. Desde la publicación del primer trabajo, que describía un material mesoporoso funcionalizado con una ‘puerta molecular’ con control fotoquímico, en el año 2003 por el grupo de investigación dirigido por Fujiwara,¹⁷¹ han sido muchos los grupos de investigación, que han desarrollado estrategias similares para la preparación de sistemas para liberación controlada basados en soportes silíceos porosos.^{172,173,174,175,176,177,178}

¹⁷⁰ Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.* **2007**, 3236-3245.

¹⁷¹ (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, *421*, 350-353. (b) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3385-3394. (c) Zhu, Y.; Fujiwara, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2241-2244. (d) Fujiwara, M.; Terashima, S.; Endo, Y.; Shiokawa, K.; Ohue, H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4635-4637.

¹⁷² Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Giri, S.; Chen, H.T.; Lin, V.S.-Y. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853.

¹⁷³ (a) Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.*, **2007**, 3236-3245. (b) Torney, F.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y.; Wang, K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 295-300. (c) Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. (d) Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker, M.P.; Lin, V.S.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044. (e) Lai, C.-Y.; Trewyn, B.G.; Jeftinija, D.M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459.

¹⁷⁴ (a) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J.W.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371. (b) Nguyen, T.D.; Tseng, H.-R.; Celeste, P.C.; Flood, A.H.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10029-10034. (c) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371.

¹⁷⁵ (a) Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J.I. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 4-13. (b) Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Pentecost, C.D.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366. (c) Leung, K.C.-F.; Nguyen, T.D.; Stoddart, J.F.; Zink J.I. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5919-5928.

¹⁷⁶ (a) Casasús, R.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D.; Guillem, C.; Latorre, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612-8613. (b) Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6661-6664. (c) Casasús, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903-1917. (d) Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Soto, J. *J. Control. Release*, **2008**, *131*, 181-189.

¹⁷⁷ (a) Aznar, E.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F., *Expert Opinion*, **2009**, *6*, 643-655. (b) Aznar, E.; Casasús, R.; García-Acosta, B.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2228-2231. (c) Coll, C.; Casasús, R.; Aznar,

Una tendencia actual sobre SMPS es potenciar el uso de estos materiales para desarrollar sistemas reales de liberación controlada intracelular. Estos estudios están todavía en las etapas iniciales de desarrollo. Así, algunos de los sistemas publicados funcionan en disolventes no acuosos o emplean estímulos externos no compatibles bajo condiciones fisiológicas. Por ese motivo, se está potenciando la búsqueda de aplicaciones prácticas, en el campo de la nanomedicina, para estos soportes mesoporosos funcionalizados con 'puertas moleculares'. La idea es que la carga ocluida en el interior de los poros pueda ser liberada, bajo demanda, mediante la aplicación de diferentes estímulos biocompatibles en células o tejidos. Dentro de los distintos tipos de estímulos que se pueden aplicar para el control de las 'puertas moleculares', el empleo de bio-moléculas parece uno de los más interesantes y puede dar lugar a la preparación de materiales con posibles aplicaciones biomédicas.

Revisando la bibliografía de los últimos años sólo podemos encontrar unos pocos trabajos relacionados con materiales híbridos con 'puertas moleculares' controladas por bio-moléculas. Así, hebras simples de ADN,¹⁷⁹ interacciones antígeno-anticuerpo¹⁸⁰ o enzimas han sido utilizadas como moléculas clave para inducir la liberación controlada de la carga. Ya se ha explicado en el capítulo anterior que el desarrollo de materiales híbridos con 'puertas moleculares' que puedan ser abiertas mediante el empleo de enzimas es especialmente interesante. Esto es debido a que las 'puertas' pueden sintetizarse a la carta para que se abran

E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957-1959. (d) Aznar, E.; Coll, C.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruíz, E. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877-6888. (e) Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Guillem, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833-6843.

¹⁷⁸ (a) Park, C.; Lee, K.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275-1278. (b) Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y. B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 1731-1734. (c) Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10645-10647. (d) Song, S. -W.; Hidajat, K.; Kawi, S. *Chem. Commun.* **2007**, *42*, 4396-4398. (e) Wu, Z.; Jiang, Y.; Kim, T.; Lee, K.; *Journal of Controlled Release.* **2007**, *119*, 215-221.

¹⁷⁹ Climent, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Maquieira, A.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281- 7283.

¹⁸⁰ Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Máñez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.

en presencia de una determinada enzima (incorporando grupos funcionales hidrolizables) confiriendo una selectividad muy alta al proceso de liberación. Aunque se conocen las características importantes que pueden presentar estos materiales, se han descrito pocos ejemplos de sólidos funcionalizados con 'puertas moleculares' que puedan liberar su carga en presencia de enzimas. Como se comentó en la introducción del capítulo anterior algunos ejemplos de materiales mesoporosos con 'puertas moleculares' que pueden controlarse con enzimas han sido descritos por Zink y colaboradores,¹⁸¹ Bein,¹⁸² Martínez-Mañez,¹⁸³ Kim,¹⁸⁴ y Heise.¹⁸⁵

Los trabajos preliminares desarrollados en la presente tesis doctoral sugieren que la degradación enzimática de soportes mesoporosos funcionalizados, con carga ocluida en su interior, es un mecanismo adecuado para la liberación controlada de la carga. De hecho, la posibilidad de usar enzimas para aplicaciones de liberación selectiva, abre una amplia variedad de nuevas perspectivas en el desarrollo de sistemas de liberación biocompatibles, usando soportes de sílice mesoporosos.

En este capítulo de la tesis se va a presentar lo que fue el primer ejemplo de liberación controlada de un anticancerígeno en células mediante el uso de SMPS funcionalizados con 'puertas nanoscópicas moleculares' que se abren en presencia de una enzima específica.

En concreto en el siguiente capítulo se estudiará la preparación de nanopartículas de sílice mesoporosas funcionalizadas con polisacáridos derivados de la glucosa, para su empleo en la liberación controlada de anticancerígenos en células. La presencia de amilasas en los lisosomas celulares, capaces de hidrolizar los polisacáridos anclados en la superficie de las nanopartículas, va a permitir la liberación de la carga ocluida en los mesoporos del soporte inorgánico.

¹⁸¹ Patel, K.; Angelos, S.; Dichtel, W.R.; Coskun, A.; Yang, Y.-W.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383.

¹⁸² Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092-3095.

¹⁸³ Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5884-5887.

¹⁸⁴ Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614-16615.

¹⁸⁵ Thornton, P.D., Heise, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 2024-2028.

Como paso previo a la liberación de anticancerígenos en células, se prepararán una serie de SMPS funcionalizados con distintos polisacáridos y cargados con un colorante. Estos materiales con capacidad de liberar un colorante van a ser empleados para la monitorización del mecanismo de la 'puerta molecular'. Con estos materiales (cargados con un colorante y con anticancerígenos) se estudiará el proceso de internalización celular mediante la vía endosomal hasta los autolisosomas, donde la presencia de amilasas inducirá la apertura de la 'puerta'. Del mismo modo, se efectuarán estudios de viabilidad celular que demuestren la liberación controlada de la carga del interior de las nanopartículas así como su eficacia en la eliminación de células tumorales (en el caso de la liberación de anticancerígenos).

3.2 Resultados y discusión.

En el presente capítulo se va a describir la síntesis, caracterización y funcionamiento de una serie de materiales de sílice funcionalizados con polisacáridos para su aplicación en procesos de liberación controlada. Primero se estudiarán una serie de nanomateriales cargados con un colorante (el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$), utilizado para la monitorización del sistema de 'puerta molecular', y posteriormente se cargará uno de los materiales con un citotóxico (doxorubicina) y se estudiará la aplicación de ambos materiales en la liberación controlada intracelular.¹⁸⁶

3.2.1 Síntesis de materiales.

Los materiales híbridos que se presentan en este capítulo consisten en nanopartículas de sílice mesoporosas que contienen, en el interior de los poros, el colorante de rutenio $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y que están funcionalizadas en la superficie externa con diferentes polisacáridos. Como polisacáridos se utilizan una serie de hidrolizados de almidón, los cuáles actúan como 'puerta nanoscópica molecular'. El gran tamaño de los hidrolizados de almidón, anclados en la superficie externa

¹⁸⁶ Bernardos, A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Bara, J.M.; Pérez-Payá, E.; Guillem, C.; Amorós, P. *ACS Nano*, **2010**, 4, 6353-6368.

del soporte, junto con la posibilidad de formar una red densa de enlaces de hidrógeno entre ellos va a inhibir la salida del colorante del interior de los poros. La presencia de una enzima específica capaz de hidrolizar el enlace O-glicosídico que une las moléculas de glucosa en el almidón, será capaz de 'abrir' los poros permitiendo así la liberación de las moléculas ocluidas en el interior.

Para la preparación de estos materiales se selecciona, como soporte inorgánico, nanopartículas de sílice mesoporosa del tipo MCM-41 debido a su porosidad homogénea, alta inercia química, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización mediante el uso de la química de los alcoxisilanos.^{187,188,189,190} El soporte MCM-41 contiene mesoporos de 2 a 3 nm que permiten la encapsulación de diferentes moléculas. Por otra parte, su alta superficie específica permite el anclaje de diferentes moléculas orgánicas en el exterior de los poros. La superficie externa de este material se funcionalizará con diferentes derivados trialcoxisilánicos de almidón.

La elección de polisacáridos como 'puertas moleculares' es debido a que estos compuestos son biocompatibles, fáciles de preparar y de bajo coste. En concreto, se seleccionan una serie de hidrolizados de almidón disponibles comercialmente (ver figura 3.1). El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de moléculas de glucosa unidos por enlaces O-glicosídicos. El almidón es un producto del metabolismo de las plantas y esta formado por dos tipos de moléculas, la amilosa que es un polisacárido lineal (el 20-25 %) y la amilopectina que es un polisacárido ramificado (el 75-80 %). La estructura química de la amilosa contiene monosacáridos de α -D-glucosa unidos por enlaces O-

¹⁸⁷ (a) El Haskouri, J.; Ortiz de Zarate, D.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A. B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Mañez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2002**, *4*, 330-331. (b) Comes, M.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1783-1786. (c) Comes, M.; Rodríguez-López, G.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2919-2922.

¹⁸⁸ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C. & Beck, J. S. *Nature*, **1992**, *359*, 710-712.

¹⁸⁹ Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M., *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 1199-1202.

¹⁹⁰ Vallet-Regí, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5934-5943.

glicosídicos α 1→4, mientras que la amilopectina contiene monosacáridos de α -D-glucosa unidos por enlaces O-glicosídico α 1→4 y ramificaciones α 1→6 cada 24 a 30 unidades de glucosa. El grado de hidrólisis del almidón, se indica por el equivalente de dextrosa (DE),¹⁹¹ que indica la fracción de azúcares reducidos en una muestra (DE 1 equivalente al almidón no hidrolizado, mientras que DE 100 equivalente a la glucosa). Para el presente trabajo se eligieron diferentes hidrolizados de almidón con las siguientes fracciones DE: Glucidex[®] 47 (**GLU47**) (5 % glucosa, 50 % maltosa, 45 % oligosacáridos y polisacáridos), Glucidex[®] 39 (**GLU39**) (3 % glucosa, 37 % maltosa, 60 % oligosacáridos y polisacáridos) y Glucidex[®] 29 (**GLU29**) (10 % glucosa, 9 % maltosa, 81 % oligosacáridos y polisacáridos). Todos estos derivados de almidón, poseen un hidroxilo hemiacetálico reactivo, que se puede funcionalizar fácilmente. Otra característica importante de los derivados de almidón, es que se hidrolizan específicamente con amilasas, las cuales se producen principalmente en las glándulas salivares (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas, y también están presentes en los lisosomas celulares.

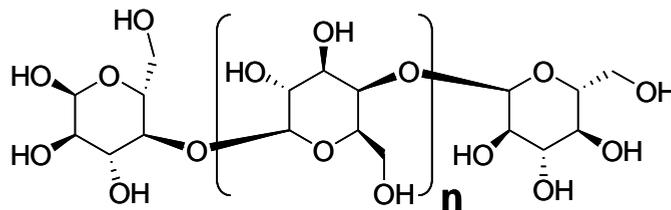


Figura 3.1. Estructura del polisacárido Almidón.

Los materiales finales, que se describen en este capítulo, se van a preparar siguiendo un orden determinado para asegurar su funcionalidad final. En primer lugar se sintetizan las nanopartículas mesoporosas MCM-41 y después se cargan los poros de éstas con el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. A continuación, se unen los derivados de almidón sobre la superficie externa del soporte cargado. Mediante este procedimiento, los derivados de almidón, que van a actuar como 'puerta', se

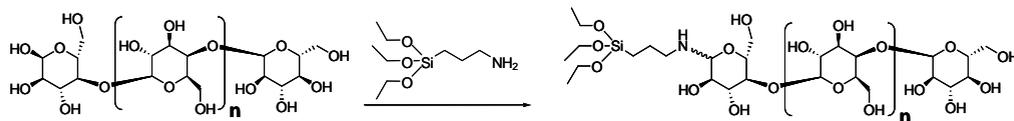
¹⁹¹ Chronakis, I.S. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrition*, **1998**, 38, 599-637.

anclan preferentemente en la superficie externa del material ya que los poros están llenos de moléculas de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$.

La MCM-41 (soporte inorgánico) se sintetiza mediante la polimerización del tetraetil ortosilicato (TEOS), que actúa como precursor inorgánico, sobre moléculas del tensoactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), surfactante que actúa como agente director de estructura. La eliminación posterior del tensoactivo, mediante calcinación en aire a temperatura elevada, deja en el interior del material de sílice un conjunto de cavidades. En esas cavidades o poros del sólido mesoporoso MCM-41 se introducen las moléculas de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. Para ello, la MCM-41 se suspende en una disolución acuosa conteniendo el complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Así el colorante de rutenio difunde de la disolución al interior de los poros. El material final obtenido se denomina, al igual que en el capítulo 3, **Ru-S**.

A continuación, se procede al anclaje de los diferentes derivados de almidón sobre el material mesoporoso MCM-41 cargado con el complejo de rutenio, es decir, sobre **Ru-S**. Como técnica de anclaje de los derivados de almidón, al igual que ocurría en el caso del derivado de lactosa del capítulo anterior (ver esquema 3.1), se va a emplear la sililación. Esta técnica esta basada en la reacción de los grupos silanoles superficiales, situados en la pared del material mesoporoso, con moléculas orgánicas que han sido previamente derivatizadas con grupos alcoxido o halogenuros de silicio. Por ese motivo, para poder anclar los derivados de almidón en la superficie externa de **Ru-S** se derivatizan previamente con grupos trialcóxidosilano. Así, los hidrolizados de almidón (**GLU47**, **GLU39** y **GLU29**) reaccionan con 3-aminopropiltrióxidosilano (**N1**) en etanol, ver esquema 3.1, para dar los correspondientes derivados trialcóxidosilánicos de almidón. El esquema 3.1 muestra como el alcóxidosilano **N1** se une al hidroxilo hemiacetalico de la glucosa, presente en el hidrolizado de almidón, dando lugar a la formación de una *N*-alquil lactosilamina (**N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-**

GLU29).¹⁹² Así, se podrá funcionalizar la superficie externa de **Ru-S** mediante el empleo de los derivados **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29**.



Esquema 3.1. Reacción de aminación entre **N1** y los hidrolizados de almidón para la obtención de **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29**.

Los productos **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29**, al igual que ocurría con **N1-Lact**, se han caracterizado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (ver Figura 3.2 para el producto **N1-GLU47**). Como se explicó en el capítulo anterior, el espectro de ¹H-RMN del compuesto **N1** se caracteriza por la presencia de dos tripletes anchos centrados a 0.6 y 2.4 ppm y un quintuplete a 1.4 ppm. La señal a 0.6 ppm corresponde al metileno unido al átomo de silicio, la centrada a 2.4 ppm al metileno contiguo al grupo amino y el quintuplete a 1.4 se asigna al metileno situado en el centro de la cadena. Además aparecen un triplete a 1.0 ppm y un cuadruplete a 3.4 ppm que pertenecen a los grupos etoxi. Los espectros de ¹H-RMN registrados para los compuestos **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29** mostraban un desplazamiento significativo de la señal del metileno unido al grupo amino que pasa de estar centrado a 2.4 ppm (en **N1**) a 2.7 ppm. El desplazamiento a campo más bajo de este metileno es compatible con la reacción del grupo amino de **N1** con el hidroxilo hemiacetálico de los derivados de almidón dando lugar a la correspondiente lactosilamina. También se pueden observar las señales correspondientes a los protones contiguos a los grupos hidroxilos de los azúcares como multipletes en el intervalo 3.0-5.0 ppm.

¹⁹² Auvray, X.; Petipas, C.; Anthore, R. Ricco-Lates, I.; Lattes, A. *Langmuir*, **1995**, *11*, 433-439.

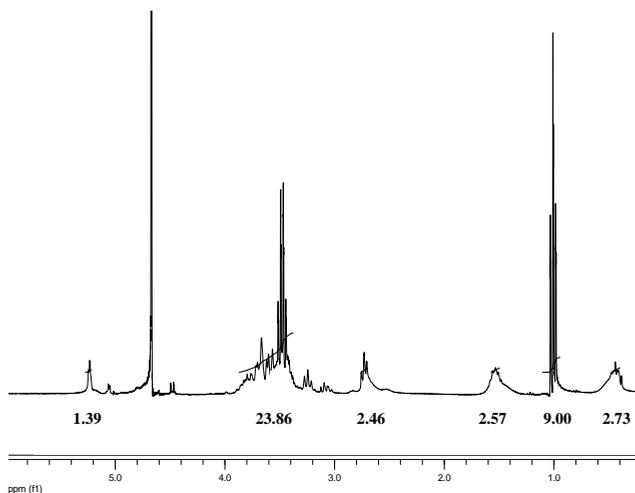
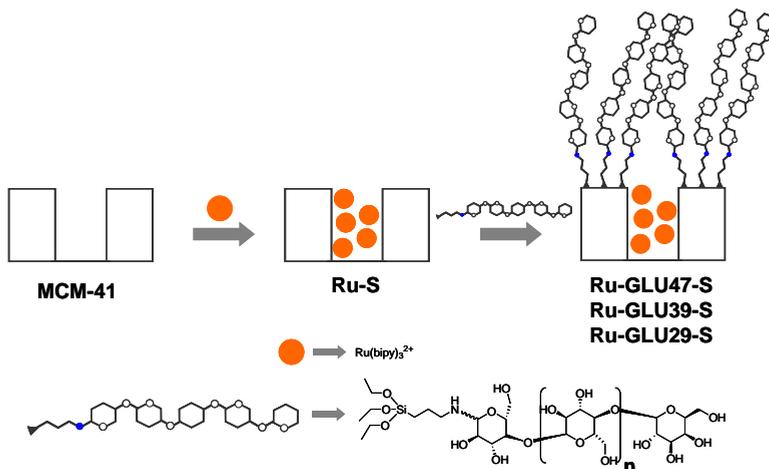


Figura 3.2. ¹H-RMN del producto **N1-GLU47**.

Los sólidos finales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** se obtienen mediante el anclaje de los derivados trialxosisilánicos **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29** en la superficie externa del sólido **Ru-S**. Este proceso de anclaje se lleva a cabo añadiendo los derivados trialxosisilánicos sobre suspensiones del sólido **Ru-S** a temperatura ambiente, con agitación y durante cinco horas y media (ver esquema 3.2). Los sólidos finales se guardan, previo lavado-filtrado, a 37°C durante 12 horas. El resultado de este proceso de funcionalización son materiales híbridos en los que la salida del complejo de rutenio, del interior de los poros al exterior, esta dificultada o inhibida en su totalidad. Esto es debido al efecto conjunto del volumen de los derivados de almidón anclados y a la formación de una red de enlaces de hidrógeno muy densa, como consecuencia de la presencia de un gran número de grupos hidroxilo en los polisacáridos situados en los alrededores de los poros.



Esquema 3.2. Proceso de síntesis de los materiales híbridos **Ru-Glu47-S**, **Ru-Glu39-S** y **Ru-Glu29-S**.

Además, en el presente capítulo se hará referencia a los sólidos desarrollados en el capítulo anterior: **Ru-Lact-S** (MCM-41 cargada con el colorante de rutenio y funcionalizada con un derivado del disacárido lactosa) y **Ru-Glu-S** (MCM-41 funcionalizada con un derivado del monosacárido glucosa y cargada en su interior con el colorante de rutenio).¹⁸³ Ver esquemas 3.2 y 3.3 para la síntesis de los materiales **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S**.

3.2.2 Caracterización de materiales.

Para la caracterización de los sólidos sintetizados en el presente capítulo se utilizarán las técnicas estándar en la química del estado sólido: difracción de Rayos-X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental y análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N₂.

Los difractogramas de Rayos X de polvo (PXRD) de los sólidos MCM-41 sintetizada, MCM-41 calcinada y los sólidos finales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** se pueden observar en la figura 3.3. El PXRD a ángulos bajos, del material silíceo MCM-41 sintetizado, curva a, muestra cuatro reflexiones que pueden ser asignados a los planos de Bragg (100), (110), (200), y (210),

representativos de la estructura hexagonal. Se calcula un parámetro de celda a_0 de 46.4 Å. ($d_{100} = 40.21$ Å). El material MCM-41 calcinada, curva b, muestra un desplazamiento significativo de la reflexión (100) representativo de los sólidos mesoporosos que utilizan surfactantes como agentes directores de la estructura. Este desplazamiento es debido a una contracción de la celda de aproximadamente 6-8 Å. El desplazamiento y ensanchamiento de los picos (110) y (200) es debido, probablemente, a la condensación de los silanoles de la superficie del material durante el proceso de calcinado. Los difractogramas de los sólidos sintetizados **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** se muestran también en la figura 3.3 (curvas c, d y e). Estos sólidos muestran unos planos de reflexión (110) y (200) más pequeños que en el caso de la MCM-41 calcinada. Esto podría deberse a la presencia del complejo de rutenio en el interior de los poros de la MCM-41. En los materiales tipo MCM-41 el aumento o disminución de la intensidad del pico de difracción de rayos X no es necesariamente una indicación de un cambio en la regularidad de la ordenación de los canales. La generación de los picos de difracción de rayos X de polvo es consecuencia de la diferencia en el poder de dispersión entre los dos componentes estructurales (la pared de sílice y los canales) de la estructura de MCM-41. La introducción de grupos orgánicos en los canales puede ocasionar la pérdida de contraste, y por tanto causar la disminución de la intensidad de los picos observada. En cualquier caso, la presencia inequívoca de la reflexión (100) en los tres sólidos, sugiere que el proceso de carga con el colorante y la posterior funcionalización adicional con los derivados de almidón (que actúan como 'puerta molecular') no ha modificado la estructura mesoporosa de la MCM-41.

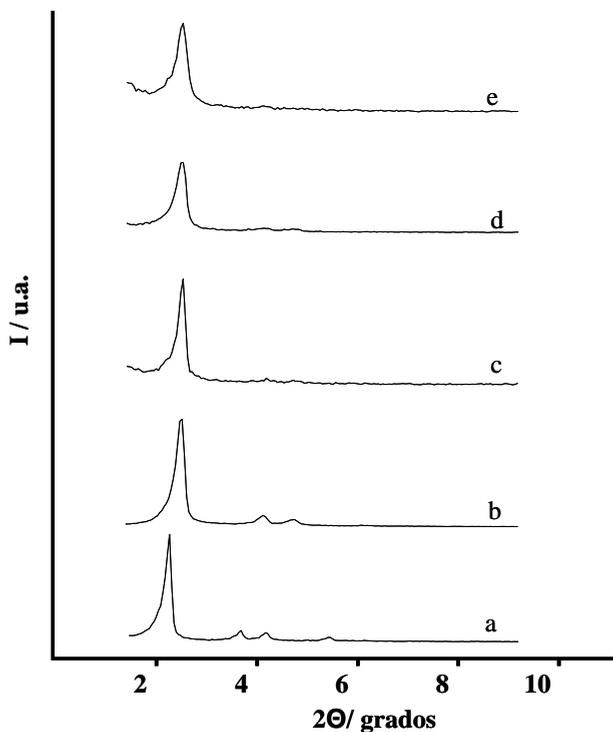


Figura 3.3. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada, (c) **Ru-GLU47-S**, (d) **Ru-GLU39-S** y (e) **Ru-GLU29-S**.

La estructura mesoporosa del sólido **Ru-GLU29-S** también se puede observar mediante la utilización de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes de TEM de la MCM-41 calcinada de partida y del sólido final **Ru-GLU29-S** muestran la típica porosidad de la matriz MCM-41 (figura 3.4). En la figura se pueden observar los canales típicos de la matriz MCM-41 como rayas blancas y negras alternas. La figura también muestra que los materiales MCM-41 sintetizados son partículas esféricas con diámetros de 100 a 200 nm. Los datos obtenidos de los difractogramas de Rayos X de polvo y de TEM demuestran que tanto el cargado de los poros como la posterior funcionalización externa no modifican la estructura tridimensional inicial del material mesoporoso. El análisis

de TEM de los materiales **Ru-GLU47-S** y **Ru-GLU39-S** mostró las mismas características morfológicas que las observadas para **Ru-GLU29-S**.

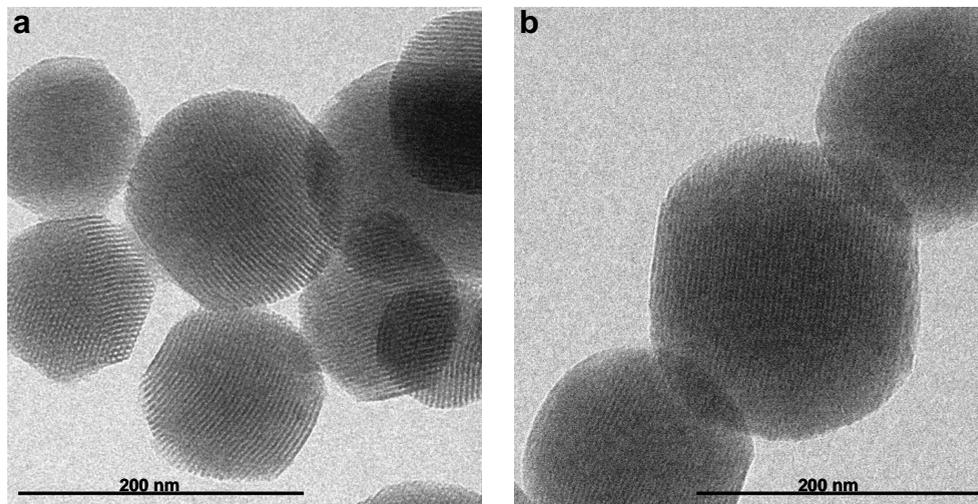


Figura 3.4. Imagen de TEM de (a) MCM-41 calcinada y (b) **Ru-GLU29-S**, mostrando la porosidad característica del material mesoporoso MCM-41.

El posterior análisis de las isotermas de adsorción-desorción de N_2 a la temperatura del nitrógeno líquido ($-196^\circ C$) permitirá obtener el área superficial, tamaño y volumen de poro de los sólidos preparados. La isoterma de adsorción-desorción de N_2 de las nanopartículas de MCM-41 calcinadas se muestra en la figura 3.5, curva a. Se puede observar la curva típica para los sólidos mesoporosos con un proceso de adsorción claro a valores de presión intermedia P/P_0 (0.1-0.3). Esta curva es típica de una isoterma de tipo IV, en la que el proceso de adsorción es debido a la condensación de nitrógeno dentro de los mesoporos de la MCM-41. La ausencia de ciclo de histéresis en este intervalo y la distribución estrecha de poro sugiere la existencia de mesoporos cilíndricos uniformes. El diámetro de poro se calcula mediante el uso del método BJH (Barret-Joyner-Halenda),¹⁹³ obteniéndose un valor de 2.29 nm y un volumen de poro de $0.62 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, calculado usando el modelo de BJH en la rama de la isoterma de adsorción.

¹⁹³ Barret, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 373-380.

La aplicación del modelo de BET (Brunauer-Emmett-Teller)¹⁹⁴ dio un valor de la superficie total específica de $975 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, ver tabla 3.1. Del PXRD, la porosimetría y los estudios de TEM, se pueden calcular el parámetro de celda a_0 (3.98 nm), distancia entre planos d_{100} (3.45 nm), el diámetro de poro (2.29 nm) y el espesor de la pared de sílice entre poros (1.69 nm). Además del proceso de adsorción asociado a los mesoporos generados por micelas de surfactante, se puede observar una segunda adsorción a presión relativamente alta ($P/P_0 > 0.8$). Esta adsorción corresponde al relleno de los huecos grandes que hay entre partículas (usando el modelo de BJH se calcula un volumen de $0.48 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y por lo tanto debe ser considerada como una porosidad textural. En este caso, las curvas muestran un ciclo de histéresis de tipo H1 con una amplia distribución de tamaño de poro.

La isoterma de adsorción-desorción de N_2 para **Ru-GLU47-S** es típica de sistemas mesoporosos con los mesoporos prácticamente llenos (ver figura 3.5 b). El sólido presenta un volumen de adsorción de N_2 relativamente bajo (volumen del mesoporo BJH = $0.13 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y poca área superficial ($231 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Esa curva plana, cuando se compara con la de la MCM-41 calcinada, es indicativa de la ausencia de porosidad que, junto con una conservación del orden hexagonal deducido por medio de la difracción de RX y el estudio por TEM, evidencian un cargado del colorante altamente efectivo. A pesar de la disminución significativa del volumen de poro BJH, todavía se pueden observar algunos rasgos en la distribución de tamaño de poro (figura interior de la figura 3.5 b) como un máximo en 1.8 nm (frontera entre meso y microporo) y varios hombros en el intervalo entre los 2-3 nm. Además, la porosidad textural se conserva ($0.31 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) aunque con una pequeña disminución del volumen, cuando se compara con la MCM-41 calcinada de partida.

¹⁹⁴ Brunauer, S. ; Emmett, P. H. ; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 309-319.

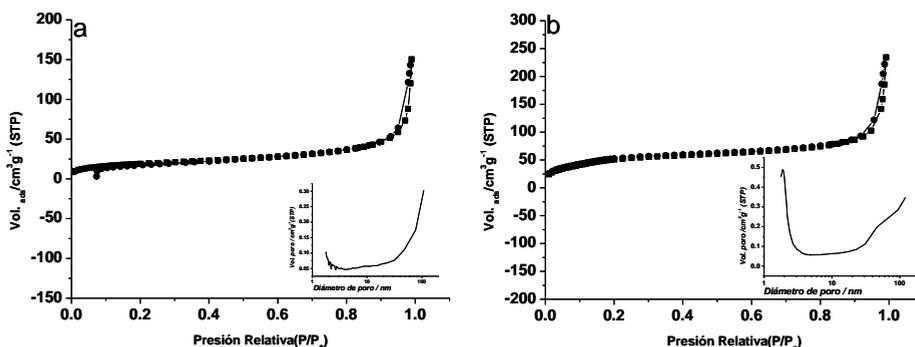


Figura 3.5. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para los sólidos (a) MCM-41 calcinada y (b) **Ru-GLU47-S**. (V_{ADS} : Volumen Adsorbido en cm^3/g).

Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 de los sólidos **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** también muestran unas curvas típicas de los materiales MCM-41 con los mesoporos llenos de carga y una disminución significativa en el volumen de N_2 adsorbido, ver figura 3.6. El hecho de la presencia de curvas más planas, es indicativo de la ausencia de porosidad debido al cargado de los poros con el colorante y la consiguiente funcionalización con los derivados de almidón. Los resultados obtenidos son los esperados teniendo en cuenta que los sólidos finales tienen los poros llenos del complejo de rutenio y la superficie externa funcionalizada con los polisacáridos derivados del almidón.

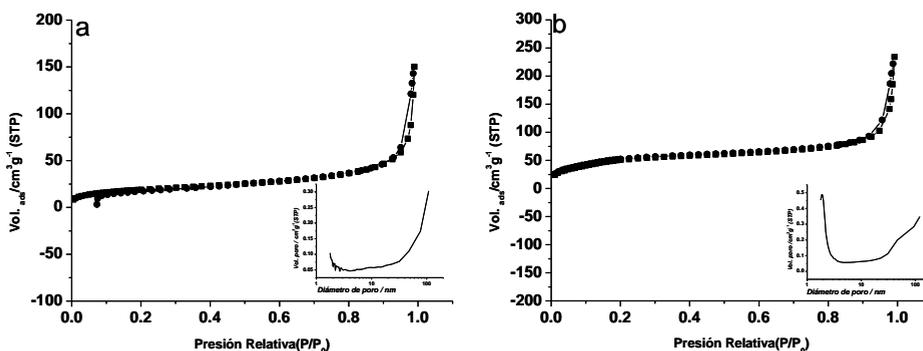


Figura 3.6. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para los sólidos (a) **Ru-GLU39-S** y (b) **Ru-GLU29-S**. (V_{ADS} : Volumen Adsorbido en cm^3/g).

La distribución de tamaño de poro BJH de estos últimos materiales (**Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**) muestran picos máximos y/o hombros apreciables de tamaños de poro alrededor de 1.8-2.0 nm. Ver tabla 3.1 para los valores de superficie específica BET y volumen de poro y tamaño de poro BJH.

Tabla 3.1. Valores de la superficie total específica BET, volumen de poro BJH y tamaño de poro BJH calculados a partir de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para los materiales seleccionados.

Sólido	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	Volumen de poro ^a ($cm^3 g^{-1}$)	Tamaño de poro ^a (nm)
MCM-41	975	0.61	2.29
Ru-GLU47-S	231	0.13	< 2
Ru-GLU39-S	69	0.18	< 2
Ru-GLU29-S	193	0.09	< 2

^a Volumen (V) y diámetro (D) del mesoporo.

El contenido de materia orgánica de los diferentes sólidos sintetizados se calcula con las técnicas de análisis elemental y termogravimetría. Los contenidos se recogen en la tabla 3.2. Los tres materiales finales muestran contenidos muy

similares de polisacárido (desde 0.055 hasta 0.073 g polisacárido/g SiO₂) y lo mismo sucede con el contenido de complejo de rutenio (desde 0.085 a 0.099 g complejo/g SiO₂).

Tabla 3.2. Contenido (α) de colorante y de derivado de almidón por gramo de SiO₂ para los sólidos **Ru-S**, **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**.

Sólido	$\alpha_{\text{‘sacárido’}}$ (g/g SiO ₂)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (g/g SiO ₂)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (mmol/g SiO ₂)
Ru-S	—	0.112	0.149
Ru-GLU47-S	0.067	0.099	0.132
Ru-GLU39-S	0.073	0.085	0.113
Ru-GLU29-S	0.055	0.090	0.120

3.2.3 Mecanismo de ‘puerta molecular’ con respuesta enzimática.

A continuación, se procede al estudio del sistema como ‘puerta nanoscópica molecular’. Los sólidos sintetizados **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** están cargados en el interior de los poros con el complejo de rutenio Ru(bipi)₃²⁺, y en el exterior del material tienen anclados los diferentes derivados de almidón **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29**. Se espera que el anclaje de estos derivados de almidón inhiba la salida de carga del interior de los poros debido a la formación, alrededor de las salidas de los mismos, de una red muy densa de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las distintas moléculas de polisacárido.

En el presente apartado se procede al estudio de la liberación del complejo de rutenio de los diferentes sólidos en presencia y ausencia de la enzima pancreatina. La pancreatina contiene amilasas capaces de hidrolizar enlaces O-glicosídicos 1→4 entre las β -D-glucosas que forman el almidón. La hidrólisis progresiva, inducida por la pancreatina, de los derivados de almidón anclados en la superficie externa permitirá el desbloqueo de los poros en **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** con la consiguiente liberación de Ru(bipi)₃²⁺. La liberación del complejo de rutenio desde el interior de los poros a la solución

acuosa puede ser seguida por medio de la banda de absorción del complejo de rutenio a 453 nm.

Así pues, se empieza estudiando la liberación del material híbrido **Ru-GLU47-S** en ausencia de pancreatina a pH 7.5. En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Ru-GLU47-S** era suspendido en agua a pH 7.5. A continuación la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas y 19 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación era monitorizada registrando la banda de transferencia de carga del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 453 nm.¹⁹⁵ La figura 3.7 muestra que la liberación del complejo desde el sólido **Ru-GLU47-S** es prácticamente cero, incluso después de 20 horas. También se observó que la liberación del colorante desde **Ru-GLU47-S** seguía siendo prácticamente nula después de 10 días.

En cambio, si se realiza un ensayo similar al anterior en presencia de pancreatina a pH 7.5 la liberación del complejo desde el sólido **Ru-GLU47-S** es marcadamente diferente. La pancreatina es una mezcla de varias enzimas digestivas producidas por las células exocrinas del páncreas. Se compone de amilasa, 33200 unidades USP, lipasa, 10000 unidades USP, y proteasa, 37500 unidades USP. Las amilasas presentes en la pancreatina son las encargadas de la hidrólisis de los diferentes azúcares.

En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Ru-GLU47-S** era suspendida en una disolución de la enzima pancreatina en agua a pH 7.5 y, a continuación, la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas y 19 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación es monitorizada midiendo la absorción del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 453 nm. Como se puede observar en la figura 3.7 la presencia de la enzima provoca un aumento considerable de la intensidad de absorción a 453 nm, lo que indica que se ha producido la liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. La intensidad de la banda de absorción a 453 nm es directamente proporcional a la cantidad de complejo de rutenio liberado desde el sólido **Ru-GLU47-S**. En la

¹⁹⁵ (a) Felix, F.; Ferguson, J.; Guedel, H. U.; Ludi, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4096-4102. (b) Lytle, F. E.; Hercules, D. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 253-257.

figura 3.7 se puede apreciar que en ausencia de enzima solamente se libera un 5 % del complejo después de 20 horas mientras que en presencia de pancreatina la liberación es completa después del mismo periodo de tiempo. Además, el perfil de liberación de **Ru-GLU47-S** en presencia de pancreatina muestra una liberación constante de la carga oculta en los poros durante un periodo de, al menos, 20 horas.

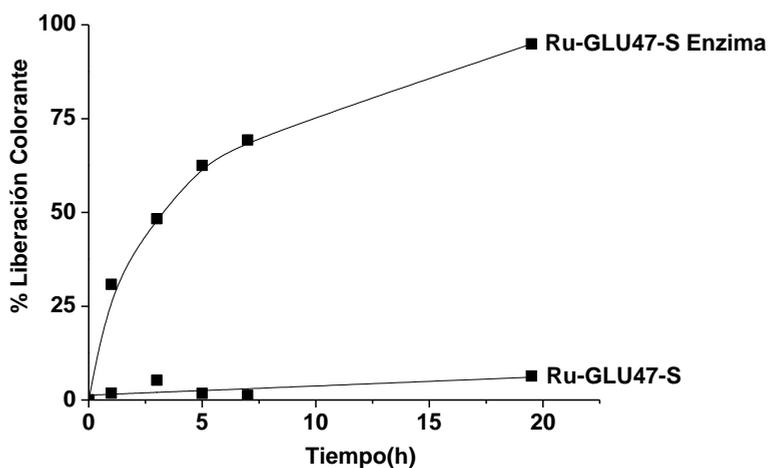


Figura 3.7. Cinética de liberación del complejo $Ru(bipi)_3^{2+}$, desde una suspensión del sólido **Ru-GLU47-S** en ausencia y presencia de pancreatina, en agua a pH 7.5, durante 20 horas.

Se ha realizado el mismo ensayo para los sólidos **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**, dando perfiles de liberación similares a **Ru-GLU47-S** en ausencia de pancreatina a pH 7.5. En presencia de pancreatina a pH 7.5 la liberación del complejo desde los diferentes materiales es función del tiempo y del grado de hidrólisis del almidón. Así, para el sólido **Ru-GLU39-S** se observa un 75 % de liberación del complejo después de casi 20 horas en presencia de pancreatina, ver figura 3.8, mientras que para el material **Ru-GLU29-S** en presencia de la enzima la liberación del complejo alcanza el 50 % al mismo tiempo, ver figura 3.9. Esto se puede explicar teniendo en cuenta el equivalente de dextrosa (DE) de los dos polisacáridos que actúan como 'puerta molecular'. El material **Ru-GLU47-S**,

funcionalizado con el hidrolizado de almidón **GLU47**, presenta una liberación del complejo máxima debido a que posee el menor porcentaje de polisacáridos (un 45 % de oligosacáridos y polisacáridos) que los otros dos hidrolizados. Por otra parte, el hidrolizado **GLU39** posee un 60 % de oligosacáridos y polisacáridos y el **GLU29** un 81 % oligosacáridos y polisacáridos. Se observa una clara relación entre el grado de hidrólisis del almidón en el sólido final con la cantidad de complejo de rutenio liberado. El material **Ru-GLU29-S** es el que tiene un mayor contenido en oligosacáridos y polisacáridos con lo que la liberación del complejo es menos pronunciada que en los materiales **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU47-S**. Dicho de otra manera, la presencia de un mayor porcentaje de polisacáridos de alto peso molecular bloqueará más la salida de los poros inhibiendo, de forma parcial, la liberación de complejo. Además, para alcanzar altos porcentajes de liberación del complejo de rutenio el material **Ru-GLU29-S** necesita más tiempo que los otros dos para que la enzima pueda hidrolizar los enlaces O-glicosídicos que unen a las moléculas de glucosa. Así, a un cierto tiempo, **Ru-GLU47-S** es capaz de liberar más carga que **Ru-GLU39-S**, y **Ru-GLU39-S** es capaz de liberar más carga que **Ru-GLU29-S**. Esta evidencia experimental está directamente relacionada con los diferentes valores de DE de los hidrolizados de almidón, es decir, a menor grado de hidrólisis menor liberación.

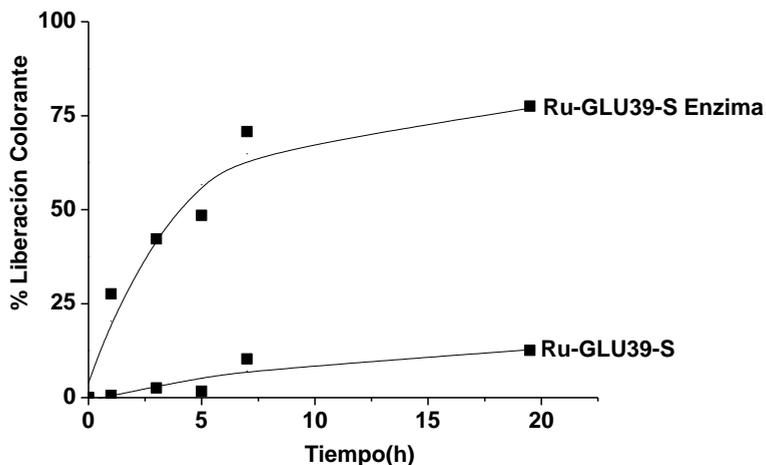


Figura 3.8. Cinética de liberación del complejo $Ru(bipi)_3^{2+}$, desde una suspensión del sólido **Ru-GLU39-S** en ausencia y presencia de pancreatina, en agua a pH 7.5, durante 20 horas.

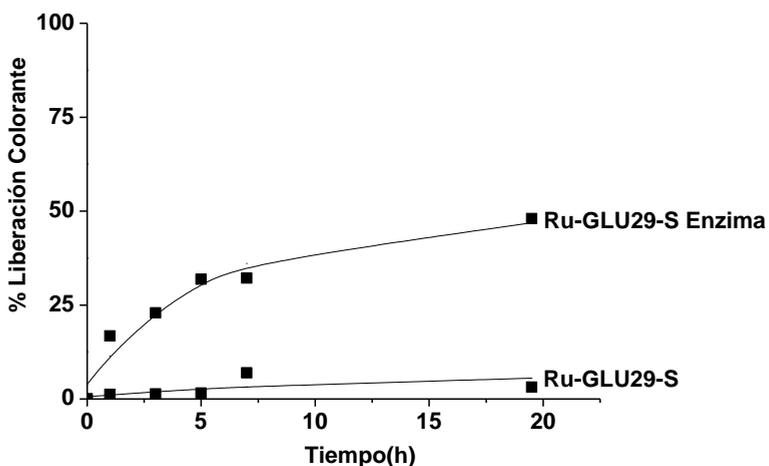
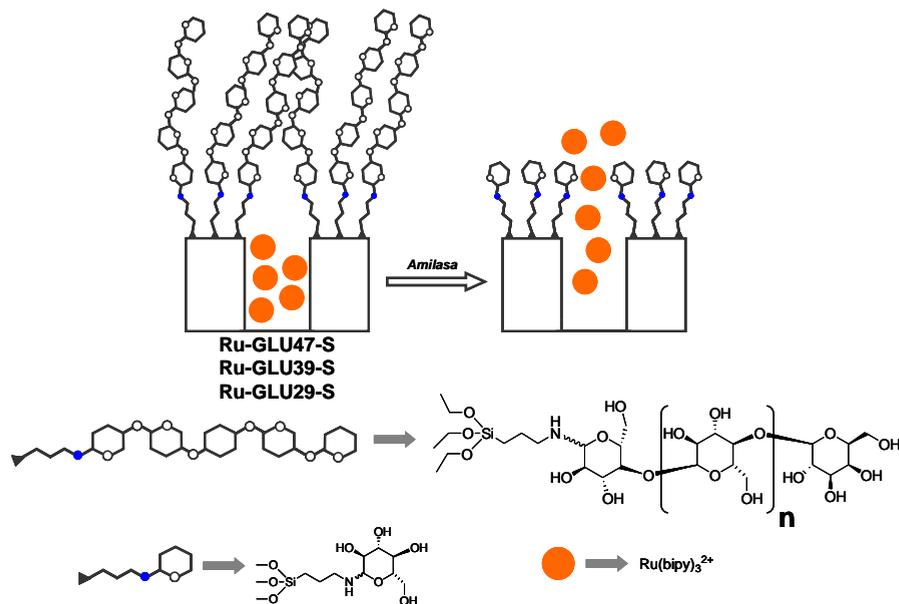


Figura 3.9. Cinética de liberación del complejo $Ru(bipi)_3^{2+}$, desde una suspensión del sólido **Ru-GLU29-S** en ausencia y presencia de pancreatina, en agua a pH 7.5, durante 20 horas.

Otra característica importante de los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** es su capacidad de liberar su carga de manera progresiva durante períodos prolongados de tiempo. Estos sistemas son capaces de liberar la carga al menos durante 60 horas (no se muestra), una propiedad que podría ser de especial interés en ciertas aplicaciones en donde es necesario evitar picos de liberación no deseados.

En resumen, cuando los tres materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** se suspenden en una disolución acuosa a pH 7.5 se observa una liberación cercana a cero del complejo. En presencia de pancreatina (conteniendo enzimas amilasas) se produce una liberación del colorante debido a hidrólisis del enlace O-glicosídico que une a las distintas moléculas de glucosa. La liberación del colorante desde el interior de los poros es progresiva por que la enzima va hidrolizando los distintos enlaces O-glicosídicos dando lugar a una disminución, tanto en el volumen como en el número de enlaces de hidrógeno, del polisacárido anclado. El mecanismo de liberación enzimática con pancreatina de todos los materiales se puede observar en el esquema 3.3.



Esquema 3.3. Mecanismo de liberación del sólido **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** en presencia de pancreatina, conteniendo amilasas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** se pensó en compararlos con los materiales **Ru-Lact-S** (MCM-41 cargada con el colorante de rutenio y funcionalizada con un derivado de lactosa) y **Ru-Glu-S** (MCM-41 cargada con el colorante de rutenio y funcionalizada con un derivado de glucosa) preparados en el capítulo anterior. El objetivo final es el de comparar los tamaños de los diferentes azúcares anclados en la superficie del material para ver como cambios en el volumen y en la estructura pueden modificar los porcentajes de liberación del complejo de rutenio.

En la figura 3.10 se muestran las cinéticas de liberación de los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** en ausencia y presencia de pancreatina a pH 7.5, las cinéticas de liberación de **Ru-Lact-S** en ausencia y presencia de la enzima β -D-galactosidasa a pH 7.5 y la cinética de liberación del sólido **Ru-Glu-S** en disolución acuosa a pH 7.5.

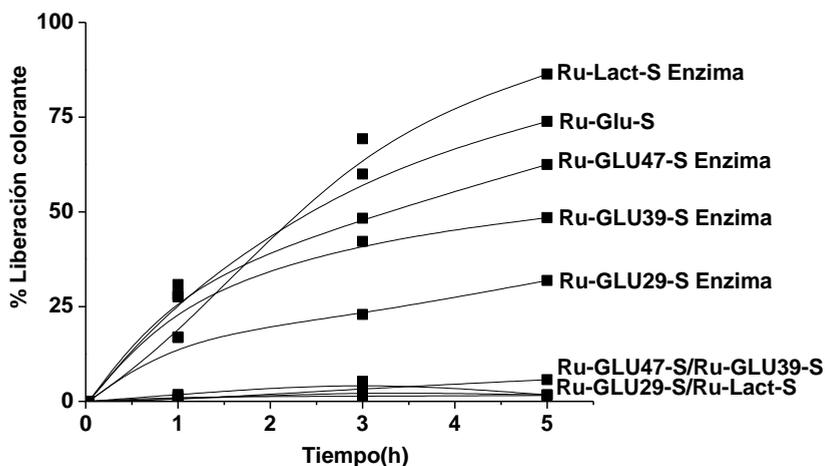


Figura 3.10. Cinéticas de liberación del complejo $Ru(bipy)_3^{2+}$, desde una suspensión de los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **Ru-Lact-S** en ausencia y presencia de enzimas (amilasa para **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y β -D-galactosidasa para **Ru-Lact-S**) en agua a pH 7.5. También se muestra la cinética de liberación del sólido **Ru-Glu-S** en agua a pH 7.5.

Se puede observar en la figura 3.10 como los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **Ru-Lact-S** muestran porcentajes de liberación cercanos a cero a las cinco horas de liberación. Por otro lado se observa como el material **Ru-Glu-S** muestra una liberación significativa (aproximadamente el 75 % de su carga) tras 5 horas en ausencia de enzima. Esta liberación observada para el material **Ru-Glu-S** en ausencia de enzima es muy similar a la que presentan los materiales **Ru-GLU47-S** y **Ru-Lact-S** en presencia de su enzima correspondiente. Teniendo en cuenta que el material **Ru-Glu-S** está funcionalizado con un monosacárido abierto (gluconolactona) y que esta 'puerta molecular' es incapaz de inhibir la liberación del complejo de rutenio se puede deducir que los resultados observados con los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **Ru-Lact-S** son consecuencia directa de la ruptura del enlace O-glicosídico inducido por la presencia de pancreatina o de β -D-galactosidasa. Esta hidrólisis del enlace O-glicosídico induce una reducción del tamaño de la cadena de sacáridos anclada

en la superficie externa (paso de un polisacárido o disacárido a un monosacárido) y, como consecuencia, la liberación progresiva del complejo. La figura 3.10 también muestra como la liberación del complejo de rutenio desde el sólido **Ru-Lact-S** es en general mayor, para un mismo tiempo, si se compara con los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**. Así, se observa como en agua a pH 7.5 (después de cinco horas) los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** liberan menos del 2 % de colorante del interior de los poros y el sólido **Ru-Lact-S** libera un 7 % de su carga. En presencia de la enzima correspondiente (pancreatina para **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** y β -D-galactosidasa para **Ru-Lact-S**) los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** liberan un 63, un 48 y un 31 % de la carga almacenada, mientras que **Ru-Lact-S** es capaz de liberar un 85 % del complejo. Esto está claramente relacionado con el número de azúcares individuales que tienen las diferentes cadenas de polisacáridos ancladas en la superficie.

Para demostrar que ambas enzimas, pancreatina y β -D-galactosidasa, son las responsables de la liberación del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ desde el interior de los poros de los diferentes materiales al seno de la disolución se llevaron a cabo experimentos adicionales. En primer lugar el sólido **Ru-S** (MCM-41 cargada con el colorante de rutenio) se suspende en agua a pH 7.5 observándose una rápida liberación de la carga debido a la ausencia de un polisacárido anclado en la superficie externa del material. En cambio se observa una total inhibición de la carga cuando el sólido **Ru-S** se pone en contacto con una disolución de pancreatina o de β -D-galactosidasa a pH 7.5. Esta inhibición se asigna a una adsorción no selectiva de la enzima en la superficie del material. Estos resultados muestran el papel crucial desempeñado por los polisacáridos en el mecanismo de la 'puerta molecular' ya que impiden la adsorción no específica de enzimas y permiten, al mismo tiempo, la liberación del complejo atrapado en el interior de los poros al hidrolizarse. En un segundo experimento las enzimas se desnaturalizan calentando las disoluciones enzimáticas (pH 7.5) a 60 ° C durante 60 minutos y, a continuación, se ponen en contacto con los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **Ru-Lact-S**. Como tercer experimento, los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **Ru-Lact-S** se ponen en contacto con una disolución

de la enzima pepsina proteasa digestiva. En ambos experimentos no se producía ninguna liberación del colorante sugiriendo, de nuevo, que la hidrólisis enzimática por parte de pancreatina o β -D-galactosidasa de los polisacáridos es el mecanismo responsable de la apertura de los mesoporos.

Como se ha comentado anteriormente, el polisacárido anclado en la superficie externa de los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** juega un papel crucial en el mecanismo de apertura de los mesoporos. Para estudiar un poco más en profundidad el efecto de la 'puerta molecular' se ha preparado el sólido **GLU47-S**. Este sólido consiste en un material MCM-41 sin carga en el interior de los poros y funcionalizado con **N1-GLU47**. Este sólido se prepara siguiendo los mismos procedimientos utilizados en el presente capítulo (ver parte experimental para los detalles).

Este material **GLU47-S** fue caracterizado mediante difracción de Rayos X de polvo y mediante porosimetría. El difractograma de Rayos X de polvo del material **GLU47-S** muestra un perfil similar al del sólido **Ru-GLU47-S** (ver figura 3.11). Si se comparan los difractogramas de estos dos materiales con el de la MCM-41 de partida, estos sólidos muestran unos planos de reflexión (110) y (200) mucho menos intensos que en el caso de la MCM-41 calcinada, pero presentan la reflexión (100). Esto sugiere que el proceso de carga con el colorante en el caso del sólido **Ru-GLU47-S** y la posterior funcionalización adicional con los derivados de almidón que actúan como 'puerta molecular' en los sólidos **Ru-GLU47-S** y **GLU47-S** no ha modificado la estructura mesoporosa de la MCM-41.

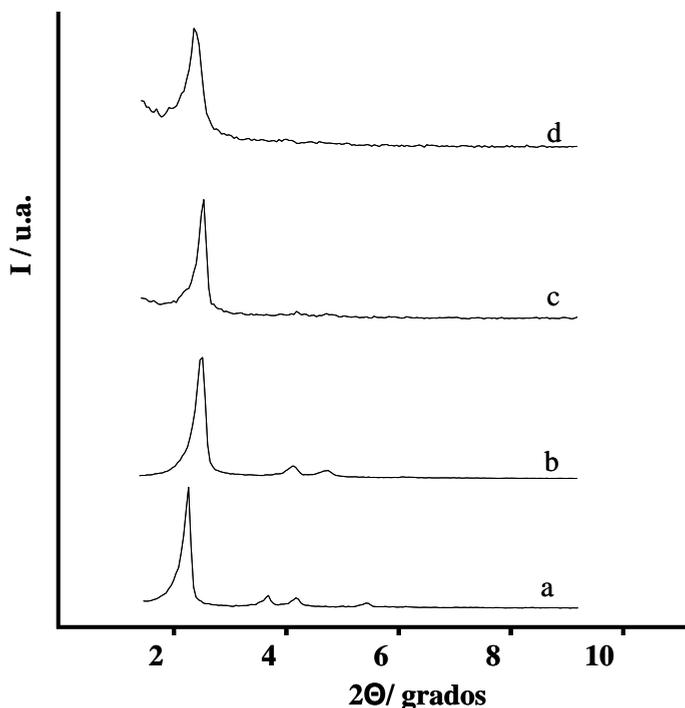


Figura 3.11. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada, (c) **Ru-GLU47-S** y (d) **GLU47-S**.

También se determinó la isoterma de adsorción-desorción de N_2 del material **GLU47-S**. Como se ha visto con anterioridad, la isoterma de adsorción-desorción de N_2 para **Ru-GLU47-S** es característica de sistemas mesoporosos con los poros prácticamente llenos (ver figura 3.12 c) obteniéndose un volumen de adsorción de N_2 relativamente bajo (volumen del mesoporo BJH = $0.13 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y poca área superficial ($231 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Esa curva plana, cuando se compara con la de la MCM-41 calcinada (figura 3.12 a), es indicativa de la ausencia de cualquier porosidad y por tanto evidencia un cargado de complejo altamente efectivo. En el caso del sólido **GLU47-S** se observa un comportamiento intermedio entre las nanopartículas MCM-41 y el sólido cargado y funcionalizado **Ru-GLU47-S**. Aunque la isoterma de adsorción-desorción de N_2 de **GLU47-S** (ver figura 3.12 b) es cualitativamente similar a la isoterma de MCM-41 (se observan dos etapas de adsorción bien definidas asignados a los mesoporos y a los poros texturales), se

puede observar una disminución apreciable en el volumen de N_2 adsorbido (volumen de mesoporo = $0.28 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y en el área superficial ($567 \text{ m}^2/\text{g}$), ver tabla 3.3.

El área superficial del sólido **GLU47-S** se reduce un 40%, cuando se compara con el material de partida MCM-41, debido al anclado del derivado de almidón **N1-GLU47** en la superficie externa del soporte sólido. Por otra parte, la diferencia entre las isotermas de adsorción-desorción de los sólidos **Ru-GLU47-S** y **GLU47-S**, está claramente relacionada con el hecho de que **Ru-GLU47-S** contiene el complejo de rutenio en el interior de los poros mientras que el sistema poroso de **GLU47-S** esta vacío. Por lo tanto, para un grado de funcionalización similar con el polisacárido, el área superficial y el volumen de poro son mayores para **GLU47-S**. La aplicación del modelo de BJH conduce a un diámetro de poro menor a 2 nm. Además de la adsorción asociada a los mesoporos generados por las micelas de surfactante, se puede observar en el sólido **GLU47-S** un segundo proceso de adsorción a presión relativamente alta ($P/P_0 > 0.8$). Esta adsorción corresponde al relleno de los huecos grandes que hay entre partículas (usando el modelo de BJH se calcula un volumen de $0.30 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, muy similar al calculado para el sólido **Ru-GLU47-S**) y, por lo tanto, debe ser considerada como una porosidad textural. La comparación de los datos del área superficial y de volumen de poro medidos para los materiales **Ru-GLU47-S** y **GLU47-S** demuestran, de forma inequívoca, que las moléculas del complejo de rutenio se incorporan al interior de los mesoporos en el material **Ru-GLU47-S**.

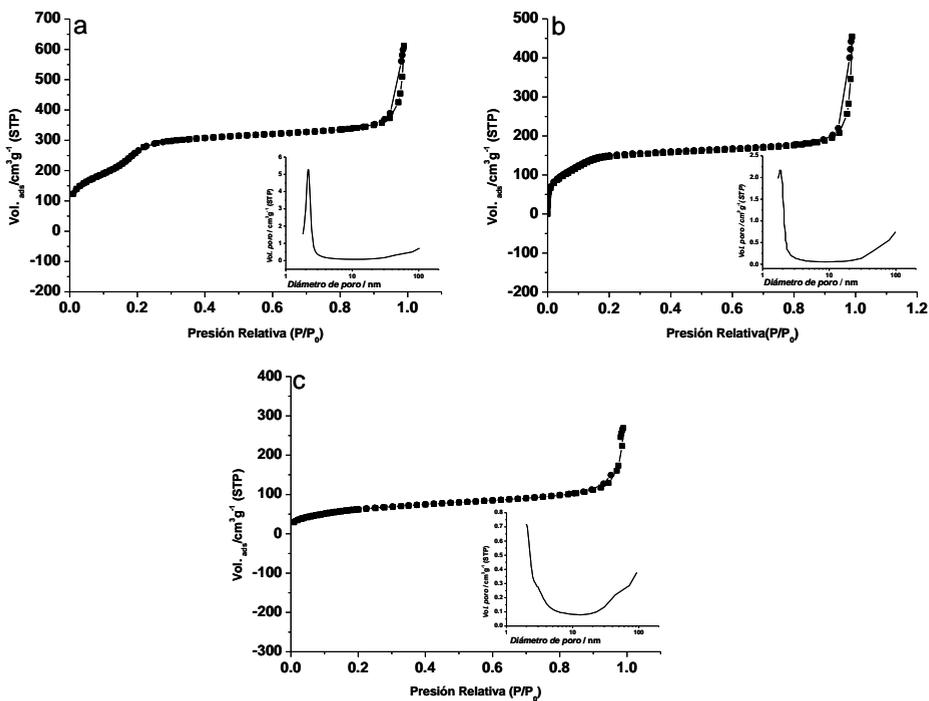


Figura 3.12. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para los sólidos (a) MCM-41, (b) **GLU47-S** y (c) **Ru-GLU47-S**. (V_{ADS} : Volumen Adsorbido en cm^3/g).

Tabla 3.3. Valores de la superficie total específica BET, volumen de poro y tamaño de poro calculados mediante las isotermas de adsorción-desorción de N_2 para los materiales seleccionados.

Sólido	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volumen de poro ^a ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Tamaño de poro ^a (nm)
MCM-41	975	0.61	2.29
Ru-GLU47-S	231	0.13	< 2
GLU47-S	567	0.28	< 2

^a Volumen (V) y diámetro (D) del mesoporo.

Finalmente se determina el contenido en materia orgánica, mediante análisis elemental y termogravimétrico, del material **GLU47-S** (ver tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenido (α) por gramo de colorante y de derivado de 'sacárido' y por gramo de SiO_2 para los sólidos **Ru-S**, **Ru-GLU47-S** y **GLU47-S**.

Sólido	$\alpha_{\text{'sacárido'}}$ (g/g SiO_2)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (g/g SiO_2)
Ru-S	—	0.112
Ru-GLU47-S	0.067	0.099
GLU47-S	0.124	—

Finalmente, para completar el estudio del efecto de la enzima sobre el hidrolizado de almidón **GLU47** en el sólido **Ru-GLU47-S**, se realizaron estudios de ^{13}C -RMN. Para ello se prepara adicionalmente un nuevo material, **Ru-GLU47-S-L**, el cuál se obtiene a partir del sólido **Ru-GLU47-S** después de ponerlo en contacto con pancreatina y permitir la liberación del complejo de rutenio del interior de los poros durante 24 horas. Los espectros de ^{13}C -RMN de los sólidos **Ru-GLU47-S** y **Ru-GLU47-S-L** se muestran en la figura 3.13. El espectro de ^{13}C -RMN del sólido **Ru-GLU47-S** presenta tres zonas de señales muy bien definidas (ver figura 3.13 a). Así, en el rango entre 11 y 50 ppm aparecen los carbonos de la cadena de

propilo que une el polisacárido a la superficie del sólido. En el intervalo 70-90 ppm aparecen los carbonos contiguos a grupos hidroxilo del polisacárido (-C-OH). Por último, entre 115 y 260 ppm aparecen los carbonos del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. Una de las señales más características del espectro es la que aparece a 100 ppm (ver ampliación en la figura 3.13 a) que se asigna al carbono del enlace glicosídico (-O-CH-O-).

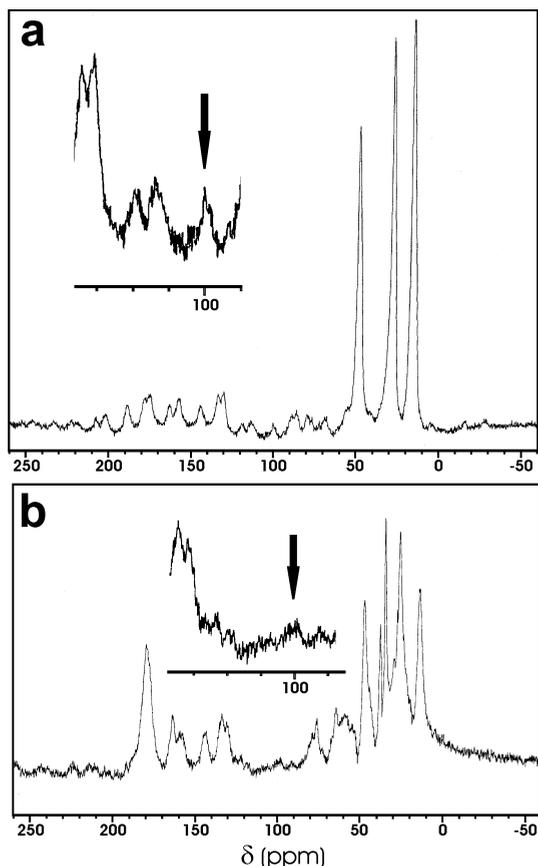


Figura 3.13. Espectro de ^{13}C -RMN para los sólidos (a) **Ru-GLU47-S** y (b) **Ru-GLU47-S-L**.

En el espectro ^{13}C -RMN del sólido **Ru-GLU47-S-L** (figura 3.13 b) se pueden observar señales, de menor intensidad que las obtenidas para el sólido **Ru-GLU47-S**, en los intervalos 70-90 ppm y 115-260 ppm que indican la presencia

de moléculas de polisacárido ancladas a la superficie del sólido y de colorante no liberado en el interior de los poros (por estar fuertemente adsorbido en las paredes de los mesoporos). Sin embargo, la característica más importante del espectro de ^{13}C -RMN del sólido **Ru-GLU47-S-L** es una disminución significativa de la intensidad de la señal del carbono del enlace glicosídico centrada a 100 ppm (ver ampliación en la figura 3.13 b). Esta disminución de intensidad indica una hidrólisis eficaz, inducida por la enzima, del enlace glicosídico en el polisacárido. Pese a una hidrólisis eficaz del enlace glicosídico, el hecho de que se observe un patrón de señales complejas en el intervalo 11-50 ppm sugiere la presencia, en el sólido **Ru-GLU47-S-L**, de una proporción baja de polisacáridos sin hidrolizar. Estas señales pueden ser asignadas a una mezcla de polisacáridos con pocas glucosas unidas a la superficie del material mediante grupos propilo. La presencia de estos restos sugiere un cierto impedimento estérico en el ataque enzimático sobre el sólido **Ru-GLU47-S-L** ya que la hidrólisis de los últimos enlaces glicosídicos está dificultada por su proximidad a la superficie del material.

3.2.4 Mecanismo de liberación controlada intracelular.

La internalización celular de nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con 'puertas moleculares', sensibles a diferentes tipos de estímulos, constituye un nuevo campo interdisciplinar de investigación en la frontera de la nanociencia.^{161-170,196} En trabajos previos se sugiere el uso de azúcares como vector de nanopartículas modificadas, con el fin de inducir una internalización eficiente, vía endocitosis, por parte de células específicas.¹⁹⁷ Por lo tanto, los SMPS funcionalizados con azúcares, pueden ser buenos candidatos para diseñar nanodispositivos especializados en la liberación controlada intracelular. Debido a su tamaño (100 nm aproximadamente), la vía de internalización celular más probable será la endocitosis. En el proceso de

¹⁹⁶ (a) Rosenholm, J.M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R. Eriksson, J.E.; Sahlgren, C.; Linden, M. *ACS Nano*, **2009**, 3, 197-206. (b) Xia, T.; Kovochich, M.; Liang, M.; Meng, H.; Kabehie, S.; George, S.; Zink J.I.; Nel, A.E. *ACS Nano*, **2009**, 3, 3273-3286. (c) Rosenholm, J.M.; Peuhu, E.; Eriksson, J.E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. *Nano letters*, **2009**, 9, 3308-3311.

¹⁹⁷ (a) Warburg, O. *Science* **1956**, 123, 309-314. (b) Christofk, H.R.; Vander Heiden, M.G.; Harris, M.H.; Ramanathan, A.; Gerszten, R.E.; Wei, R.; Fleming, M.D.; Schreiber, S.L.; Cantley, L.C. *Nature* **2009**, 452, 230-233.

endocitosis la célula introduce moléculas grandes o partículas, englobándolas en una invaginación (formación del repliegue de una membrana que se dirige hacia el interior de una cavidad formando una bolsa) de la membrana plasmática, que termina formando una vesícula que se incorpora al citoplasma. Las vesículas formadas se denominan endosomas y terminarán fusionándose con los lisosomas, donde se produce la digestión del contenido de la vesícula.

Los lisosomas celulares son orgánulos formados por el retículo endoplasmático rugoso (RER) y luego empaquetadas por el complejo de Golgi, que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas que sirven para digerir los materiales de origen externo (heterofagia) o interno (autofagia) que llegan a ellos. Las enzimas lisosomales son capaces de digerir bacterias y otras sustancias que entran en la célula por fagocitosis, tipo de endocitosis por el cual algunas células rodean con su membrana citoplasmática a un antígeno y lo introducen al interior celular, u otros procesos de endocitosis. Los lisosomas utilizan sus enzimas para reciclar los diferentes orgánulos de la célula, englobándolos, digiriéndolos y liberando sus componentes en el citosol. Las enzimas más importantes del lisosoma son: lipasas (digieren lípidos), amilasas o glucosidasas (digieren carbohidratos), proteasas (digieren proteínas) y nucleasas (digieren ácidos nucleicos). El mecanismo de endocitosis y de la actividad enzimática por parte de los lisosomas puede observarse en la figura 3.14.

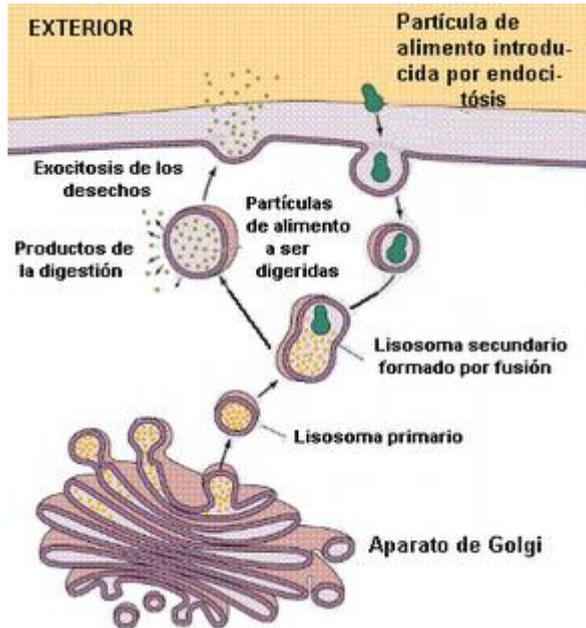


Figura 3.14. Esquema del proceso de endocitosis y del proceso de digestión intracelular por parte de los lisosomas.

Demostrado el buen funcionamiento de las nanopartículas **Ru-GLU47-S** en la liberación controlada de carga, como se ha probado en los ensayos *in vitro* en presencia de una enzima determinada, se decide utilizar estas nanopartículas para la liberación controlada intracelular. Como consecuencia del tamaño de estas nanopartículas la vía de internalización más probable será por endocitosis, como ya se ha comentado con anterioridad. Una vez en los endosomas, la fusión de estos orgánulos con los lisosomas permitirá la liberación de la carga del **Ru-GLU47-S**, mediante degradación enzimática del hidrolizado de almidón, **GLU47**.

En primer lugar, se evalúa la capacidad de las células para internalizar las nanopartículas **Ru-GLU47-S**. Para ello, se escogieron dos líneas celulares: HeLa, una línea tumoral de cáncer de cuello de útero y, LLC-PK1, una línea no tumoral de riñón de cerdo. Estas células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las nanopartículas **Ru-GLU47-S** (50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g/mL}$).

En la figura 3.15 se pueden observar dos fotografías de microscopía confocal asociadas a la internalización del material a estudio **Ru-GLU47-S** en las dos líneas celulares. En este caso, las células fueron incubadas en presencia del sólido **Ru-GLU47-S** (50 µg/mL) durante 20 minutos. A continuación, el medio es eliminado, se añade medio fresco y tras 15 horas de incubación se analiza la localización intracelular de las nanopartículas **Ru-GLU47-S**. Para ello, se utiliza la fluorescencia asociada al colorante Ru(bipi)₃⁺² mediante microscopía confocal (rojo). Se emplean también el marcador de ADN, asociado al núcleo celular, Hoechst 33342 (azul) y el marcador de membrana plasmática WGA Alexa Fluor 647 (verde). La señal de Ru(bipi)₃⁺² muestra un patrón punteado de fluorescencia asociado a vesículas en el interior celular, esto sugiere la internalización del sólido **Ru-GLU47-S** en ambas líneas celulares. (Ver capítulo experimental para más detalles).

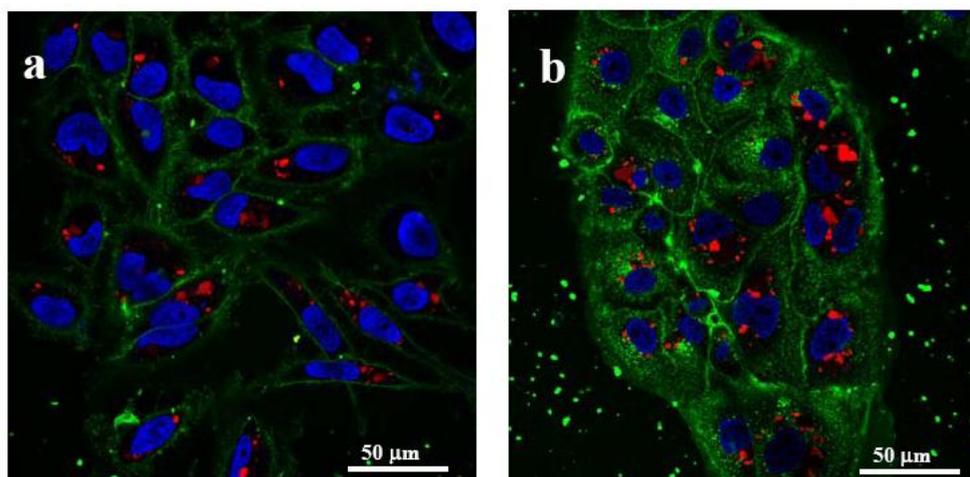


Figura 3.15. Internalización celular de **Ru-GLU47-S** (50 µg/mL) en (a) células tumorales HeLa y (b) células no tumorales LLC-PK1.

Por su parte, el ensayo de viabilidad de tipo WST-1 (reactivo de proliferación celular) es empleado para determinar la posible toxicidad de las nanopartículas **Ru-GLU47-S** en células. Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de reducir una sal de tetrazolio (amarillo claro) a formazán (amarillo oscuro), que implica un cambio en la coloración del producto,

cuantificable por medidas de absorbancia a 450 nm. Este ensayo revela, como se puede observar en la figura 3.16, que en las condiciones estudiadas el sólido **Ru-GLU47-S** resultaba inocuo (no tóxico) para las células, presentando altos porcentajes de viabilidad celular.

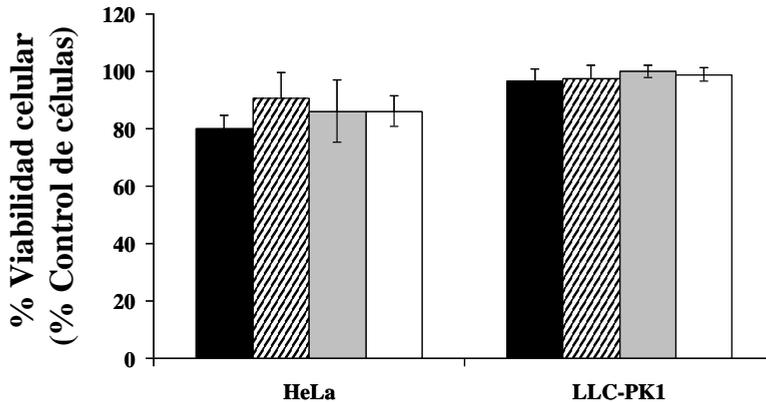


Figura 3.16. En los ensayos de viabilidad celular, las células fueron tratadas con **Ru-GLU47-S** en las mismas condiciones, empleando concentraciones de **Ru-GLU47-S** de 50, 25, 10, y 5 µg/mL (columnas negras, rayadas, grises y blancas, respectivamente). La viabilidad fue cuantificada 24 horas después mediante el ensayo WST-1.

La localización aparentemente asociada a vesículas por parte de las nanopartículas **Ru-GLU47-S**, hace pensar en una posible internalización celular a través de endocitosis. Como se ha comentado, en este proceso la célula transporta diversos sustratos hasta los lisosomas, donde las enzimas lisosomales se encargan de su degradación en un proceso dependiente de energía.¹⁹⁸ Por lo tanto, se puede postular que las nanopartículas **Ru-GLU47-S** son transportadas a los lisosomas donde la actividad de enzimas lisosomales (conteniendo amilasas) induce la liberación del complejo de rutenio. Con el fin de demostrar que la

¹⁹⁸ (a) Hillaireau, H.; Couvreur, P. *Cell Mol Life Sci*, **2009**, 66, 2873-2893. (b) Lu, J.; Liong, M.; Sherman, S.; Xia, T.; Kovovich, M.; Nel, A. E.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Nanobiotechnology* **2007**, 3, 89-95. (c) Gemeinhart, R. A., Luo, D.; Saltzman, W. M. *Biotechnol Prog*. **2005**, 21, 532-537.

endocitosis es el proceso implicado en la internalización celular por parte de las nanopartículas **Ru-GLU47-S**, las células HeLa y LLC-PK1 se incuban en presencia del **Ru-GLU47-S** (50 $\mu\text{g/mL}$) a temperaturas de 37 °C y 4 °C (con el fin de inhibir los procesos de endocitosis dependientes de energía) durante 30 minutos antes de eliminar el medio y, pasadas 24 horas, la fluorescencia asociada al colorante de rutenio se analizó mediante citometría de flujo. Como resultado se observa una reducción significativa de porcentaje de células con fluorescencia asociada a las nanopartículas en el caso de la incubación a 4 °C (figura 3.17 y 3.18), si se compara con las células tratadas a 37°C. Este hecho demuestra de forma clara la implicación de un mecanismo dependiente de energía en la internalización del material **Ru-GLU47-S**.

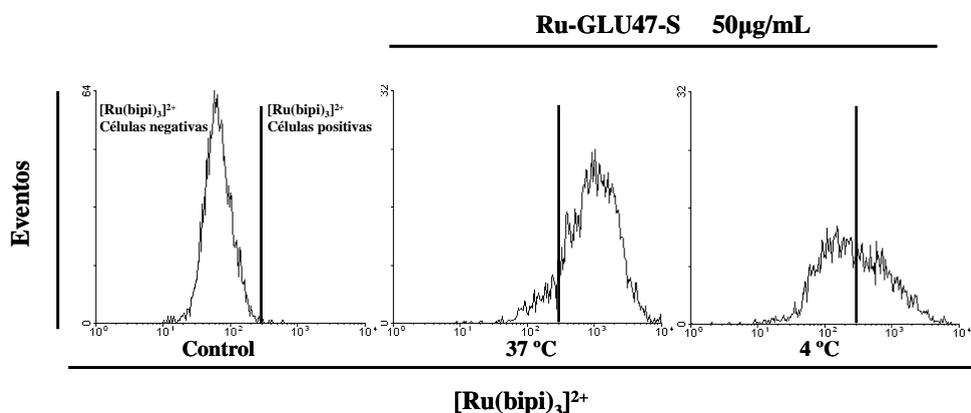


Figura 3.17. Implicación de la vía endosomal y los autolisosomas en la degradación celular de **Ru-GLU47-S**. Las células HeLa se tratan con **Ru-GLU47-S** (50 $\mu\text{g/mL}$) a temperaturas de 37 °C y 4 °C durante 20 min. Pasado este tiempo, se eliminan las nanopartículas y las muestras se incuban durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se estudia la fluorescencia asociada a la $\text{Ru}(\text{bip})_3^{2+}$ por medio de la citometría de flujo.

En la figura 3.18 se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia, asociada al complejo de rutenio, en el caso de las células tumorales HeLa comparado con las células no tumorales LLC-PK1. Esto implicaría un aumento de internalización celular por parte de las nanopartículas en células tumorales.

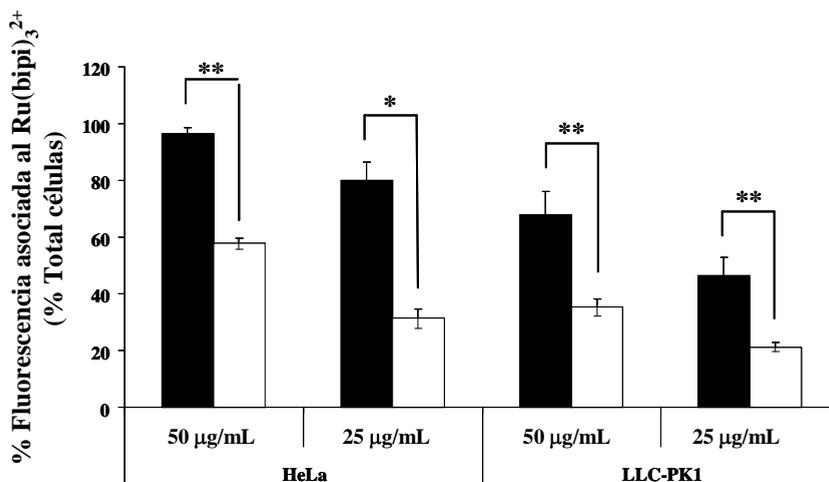


Figura 3.18. Cuantificación del porcentaje de células con fluorescencia positiva para Ru(bipi)₃⁺² tanto a 37 °C (barras negras) como a 4 °C (barras blancas), respectivamente. Los asteriscos indican datos estadísticamente significativos (test t de student P<0.05).

Asimismo, y con el fin de corroborar la implicación de los lisosomas en la degradación de las puertas moleculares de azúcar, se procede a marcar a los autolisosomas. Los autolisosomas consisten en vesículas de doble membrana que se fusionan a los lisosomas y que contienen generalmente porciones del citoplasma celular. Las células HeLa fueron transfectadas, introducción de material genético externo en células eucariotas, con el marcador de formación de autolisosomas correspondiente a la cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 (LC3-I) fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP), LC3-eGFP.¹⁹⁹ La proteína LC3-I presenta una localización citoplasmática difusa en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de estímulos que inducen la formación de autolisosomas, la LC3-I es procesada (LC3-II) y se transloca a la membrana de los autolisosomas, cambiando así su patrón de localización a un patrón punteado y asociado a vesícula. Así, una vez transfectadas, las células fueron tratadas con el sólido **Ru-GLU47-S** (50 µg/mL) y se observó la existencia

¹⁹⁹ Klionsky, D. J. et al. *Autophagy*, 2007, 4 (2), 151-175.

de una membrana asociada al LC3-eGFP rodeando varias de las nanopartículas, lo que sugiere la localización de las mismas en los autolisosomas, como se puede observar en la figura 3.19.

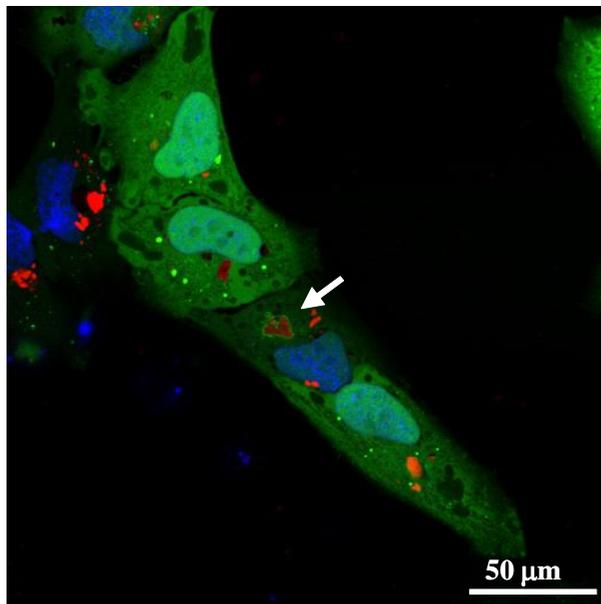


Figura 3.19. Determinación mediante microscopía confocal de la localización del complejo $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{+2}$ (rojo) en células HeLa transfectadas con LC3-eGFP (verde). La flecha blanca muestra la localización autolisosomal de la nanopartícula.

La localización de las nanopartículas **Ru-GLU47-S** en los autolisosomas permitiría la apertura de la puerta molecular mediante la degradación del **GLU47** por medio de las amilasas lisosomales. Con el fin de comprobar el posible uso terapéutico de este nuevo nanodispositivo, se sintetiza un nuevo material nanoparticulado mesoporoso de sílice, **DOX-GLU47-S**. Este material consiste en nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con el anticancerígeno doxorubicina (doxo), ver figura 3.20 para su estructura, y funcionalizadas con el azúcar **GLU47**.²⁰⁰ La doxorubicina (doxo) es un quimioterapéutico ampliamente

²⁰⁰ Formari, F. A.; Randolph, J. K.; Yalowich, J. C.; Ritke, M. K.; Gewirtz, D. A. *Mol. Pharm.* **1994**, *45*, 649-656.

utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sin embargo, su distribución inespecífica a través del organismo genera unos efectos secundarios graves (cardio- y nefrotoxicidad entre otros) que obligan a la reducción de su dosis terapéutica. La introducción de la doxo en nanopartículas permitiría una liberación celular mucho más específica y controlada reduciendo así dichos efectos secundarios.²⁰¹

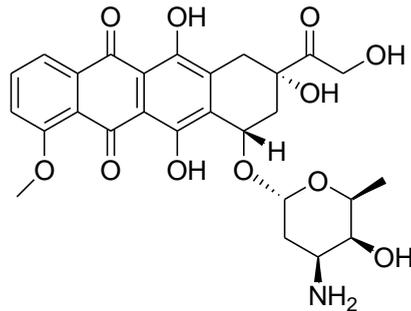


Figura 3.20. Estructura Doxorubicina.

Este sólido presenta características similares a las del material **Ru-GLU47-S**, tanto a nivel de estructura, estabilidad y comportamiento de la ‘puerta molecular’ introducida, como a nivel de caracterización con similares difractogramas de Rayos-X de polvo, imágenes de TEM e isothermas de adsorción-desorción de N₂. El contenido de doxo en el sólido **DOX-GLU47-S** es determinado por análisis termogravimétricos, dando 0.278 g doxo/g SiO₂. Se realizan cinéticas de liberación de doxo desde suspensiones acuosas a pH 7.5 del material **DOX-GLU47-S** en presencia y ausencia de amilasas observando un comportamiento similar al del material **Ru-GLU47-S**, ver figura 3.21. Así, la liberación en ausencia de amilasas es cercana a cero, mientras que en presencia de la enzima se produce una liberación masiva de la carga atrapada en el interior de los poros. Basado en estas observaciones *in vitro* del material **DOX-GLU47-S**, se realizan ensayos *ex vivo* con dicho material.

²⁰¹ Patil, R. R.; Guhagarkar, S. A.; Devarajan, P. V. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* **2008**, 25(1), 1-61.

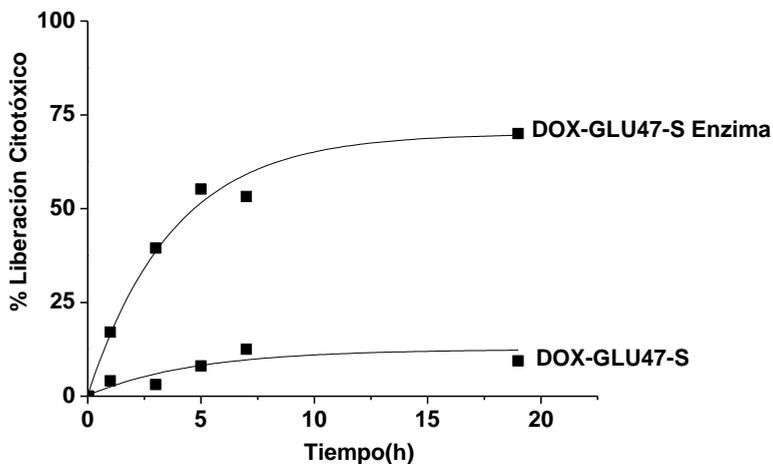


Figura 3.21. Cinética de liberación de doxorubicina, desde una suspensión del sólido **DOX-GLU47-S** en ausencia y presencia de pancreatina, en agua a pH 7.5, durante 20 horas.

La liberación del citotóxico desde el material híbrido **DOX-GLU47-S** puede seguirse a simple vista. Como se puede observar en la figura 3.22, la liberación del citotóxico en ausencia de enzima es prácticamente nula y la disolución es incolora. En cambio, en presencia de pancreatina se observa la aparición de un color rosa, indicativo de la presencia de doxorubicina en el medio.



Figura 3.22. Liberación de doxorubicina desde **DOX-GLU47-S**. La fotografía muestra una suspensión del material híbrido en presencia de pancreatina (izquierda) y en ausencia de la misma (derecha) a las 24 horas.

Una vez sintetizadas y caracterizadas, las nanopartículas **DOX-GLU47-S** se adicionaron a las células HeLa a concentraciones de 25 y 50 µg/mL durante 24 h. Pasado este tiempo se analiza la viabilidad y la internalización de dichas nanopartículas mediante microscopía confocal y citometría de fluorescencia.

Como experimentos de control, el material de partida MCM-41 y el sobrenadante de una suspensión de **DOX-GLU47-S** se emplean en las mismas condiciones que el material **DOX-GLU47-S** para el tratamiento celular. La MCM-41 se usa con el fin de descartar cualquier efecto tóxico asociado con el material mesoporoso, mientras que la suspensión del sobrenadante de **DOX-GLU47-S** es empleada para desechar cualquier abertura no específica de la 'puerta molecular' fuera de las células.

Mediante estudios de microscopía confocal, se observa que un porcentaje significativo de células presentan un fenotipo de muerte celular (perdida de adherencia a la placa de cultivo, rotura de la membrana plasmática,...), cuando se tratan con **DOX-GLU47-S**, debido a la activación de muerte celular inducida por la doxo. Por el contrario, no se observa ninguna muerte celular en células tratadas con MCM-41, ver figura 3.23. Estos resultados sugieren que la liberación de la doxo solo se observa cuando se internaliza **DOX-GLU47-S** y se produce la apertura de la 'puerta molecular' mediante la hidrólisis enzimática de los polisacáridos.

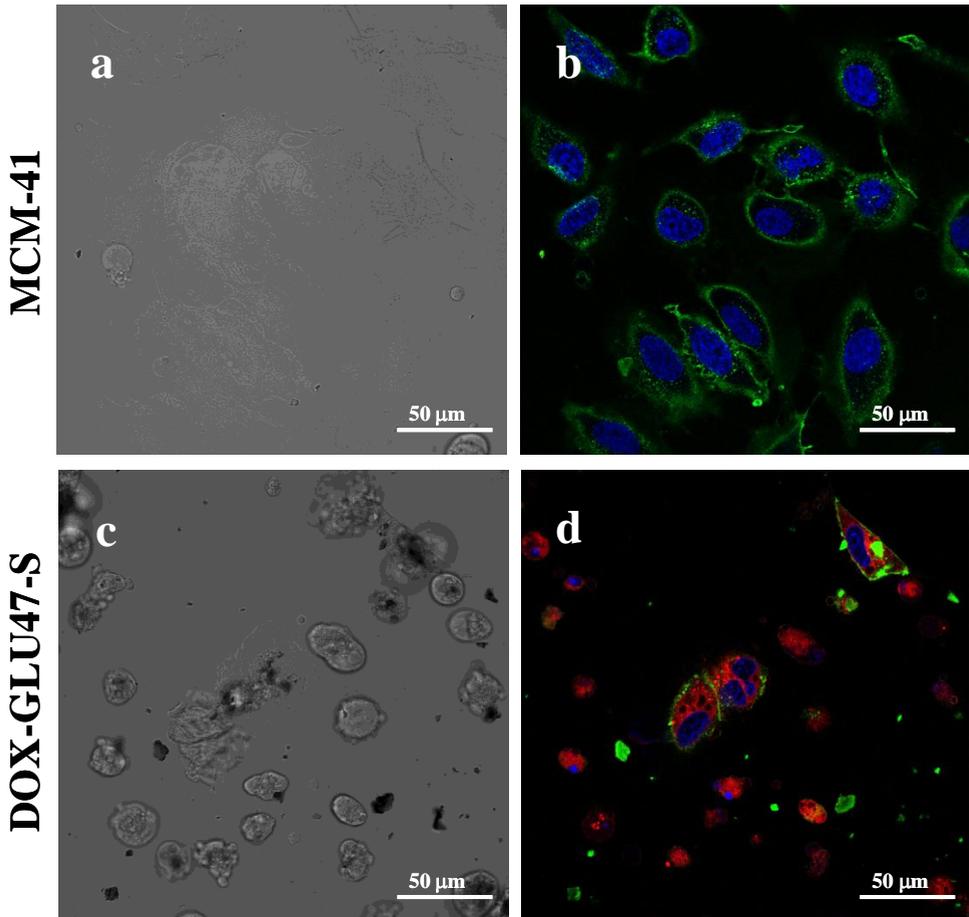


Figura 3.23. Imágenes de microscopía confocal de las células HeLa tratadas con MCM-41(a, b) y con **DOX-GLU47-S** (c, d). Las células tratadas con MCM-41 permanecen adheridas a la placa (a) y muestran fenotipo estándar en el análisis de microscopía confocal (b) cuando los núcleos se tiñen con Hoechst 33342 membrana (azul) y la membrana plasmática con WGA Alexa Fluor 647 (verde). En contraste, las células tratadas con **DOX-GLU47-S** muestran separación de la placa (c) y se observa una difusión fluorescente de color rojo, asociada a la doxo, junto con células mostrando fenotipo de muerte celular, cuerpos apoptóticos, (d) que sugiere la muerte de celular inducida por la doxo.

Tras 24 horas de tratamiento se cuantificó el porcentaje de muerte celular, mediante citometría de flujo, por medio de estudios de ciclo celular empleando el

marcador de ADN DAPI fijando las células con etanol al 80%. La población celular en condiciones normales muestra su contenido en ADN en un gráfico de dos picos, es decir, las células en fase G1 o G2/M, mientras que una célula que está llevando a cabo procesos de muerte celular, por lo general presenta un ADN sub-G1, referido a fragmentación celular y pérdida de ADN. Las células tratadas con la nanopartícula vacía, MCM-41, o con el sobrenadante de la suspensión del **DOX-GLU47-S**, presentaron un patrón de ciclo celular con doble pico correspondiente a las poblaciones G1 y G2/M. Por el contrario, las muestras tratadas con las nanopartículas **DOX-GLU47-S** mostraron un patrón típico de células en proceso de muerte, con un elevado porcentaje de células en las fases sub-G1 del ciclo celular, es decir, con un contenido en ADN inferior al $2n$ (23 pares de cromosomas, diploide) esperable en una célula. (Ver figuras 3.24 y 3.25). Se demostró así la apertura intracelular específica de las nanopartículas funcionalizadas con una puerta molecular conteniendo un hidrolizado de almidón. Asimismo, estos resultados demuestran como este tipo de sólidos son perfectamente válidos para la liberación controlada de moléculas cargadas en su interior en sistemas biológicos.

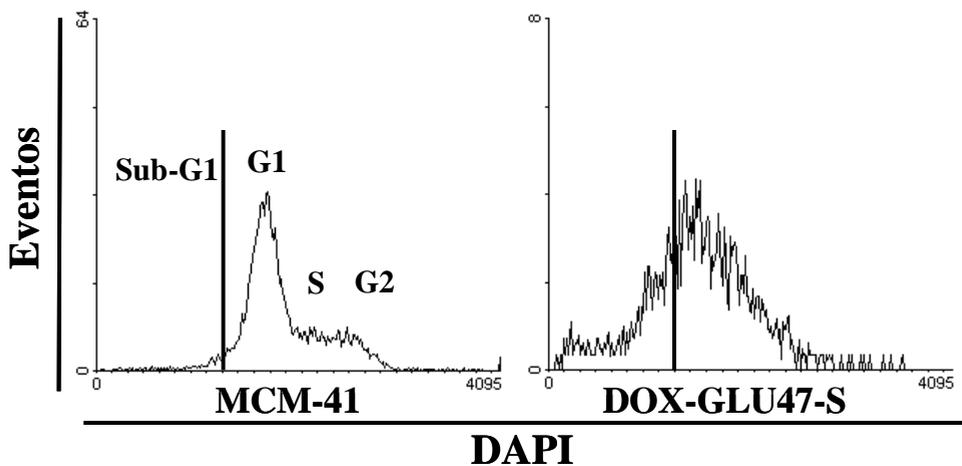


Figura 3.24. Cuantificación del porcentaje de muerte en células HeLa tratadas con MCM-41 y con **DOX-GLU47-S** (50 μ g/mL). Tras fijar las células y teñirlas con DAPI, se efectuaron estudios del ciclo celular de las muestras tratadas con MCM-41 y con el **DOX-GLU47-S**. Se observó un patrón normal de ciclo celular en el caso de las muestras tratadas con el MCM-41. Por el contrario, las células tratadas con **DOX-GLU47-S** mostraron una pérdida del patrón del ciclo celular y un aumento del porcentaje de células en fases sub-G, indicativo de la existencia de procesos de muerte celular.

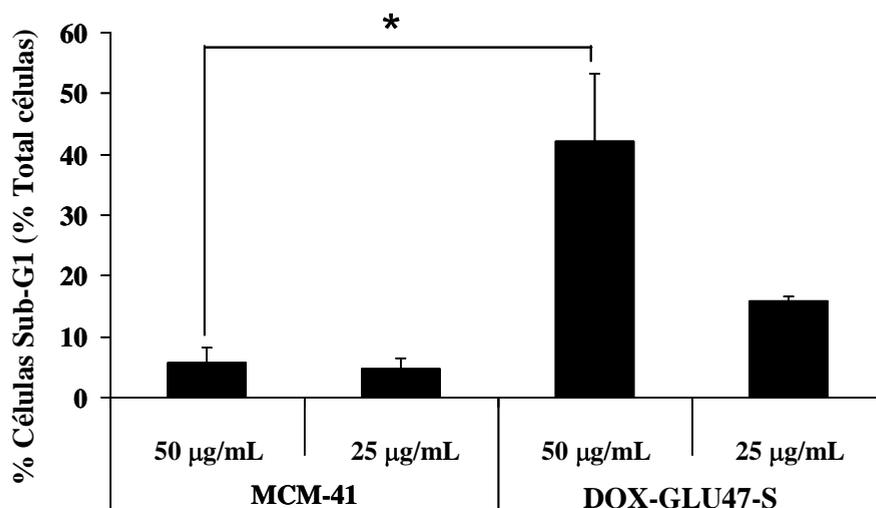


Figura 3.25. Cuantificación del porcentaje de células en la fase sub-G1, asociada a muerte celular, para los materiales MCM-41 y **DOX-GLU47-S** tras 24 horas de tratamiento. Los asteriscos indican datos estadísticamente significativos (test de *t* de student, $P < 0.05$).

3.3 Conclusiones.

Se ha demostrado que el anclado de derivados de almidón en la superficie de un soporte de sílice mesoporoso da lugar a la preparación de los materiales híbridos funcionalizados con una ‘puerta nanoscópica molecular’ **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**. Estos materiales híbridos son capaces de liberar, de forma controlada, un complejo coloreado empleando específicamente la enzima pancreatina (conteniendo enzimas amilasas). En suspensiones acuosas a pH 7.5 de los materiales **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S** no se observa liberación del complejo de rutenio. Al añadir pancreatina se produce la liberación del complejo debido a que las amilasasa (contenidas en la pancreatina) son capaces de hidrolizar los enlaces O-glicosídicos $\alpha 1 \rightarrow 4$ que unen a las moléculas de glucosa presentes en el almidón.

Se utilizan las células tumorales HeLa y las células no tumorales LLC-PK1 para los ensayos de viabilidad, demostrando la ‘no’ toxicidad de **Ru-GLU47-S**. La

internalización en las células HeLa de **Ru-GLU47-S**, vía endocitosis, se confirma mediante microscopía confocal. Los procesos de endocitosis dirigen a las nanopartículas a los autolisosomas donde el almidón se degrada por la presencia de amilasas.

Se describe la síntesis de un material **DOX-GLU47-S**, que consiste en nanopartículas de sílice mesoporosas MCM-41 funcionalizadas en el exterior de los poros con un derivado de almidón y cargadas en el interior con un citotóxico, doxorubicina, capaz de inducir la muerte de células cancerosas. Se ha demostrado, con estudios previos de liberación controlada, que el citotóxico no se libera en agua a pH 7.5 pero, en cambio, las nanopartículas son capaces de liberar el citotóxico en presencia de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces O-glicosídicos $\alpha 1 \rightarrow 4$ que unen a las moléculas de glucosa presentes en el almidón.

La viabilidad de células tumorales HeLa con **DOX-GLU47-S** disminuye, debido a la internalización de las nanopartículas, posterior apertura de la 'puerta molecular' derivada del almidón y la liberación del agente citotóxico doxo. La hidrólisis del polisacárido se confirma por la notable muerte celular observada por microscopía confocal al ser liberado el citotóxico en el interior de las células.

**Capítulo 4: Síntesis de poliésteres y su uso
como 'puertas moleculares' en nanomateriales
híbridos.**

4 Síntesis de poliésteres y su uso como 'puertas moleculares' en nanomateriales híbridos.

4.1 Introducción.

4.1.1 Nanomateriales híbridos.

Como se viene explicando en la presente tesis doctoral, el desarrollo de soportes de sílice mesoporosos con 'puertas moleculares', es uno de los campos de investigación que ha experimentado un gran auge en los últimos años.^{202,203,204,205,206,207,208,209,210} Una de las aplicaciones más interesantes de estos

²⁰² (a) Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081-3093. (b) Ariga, K.; Hill, J. P.; Lee, M. V.; Vinu, A.; Charvet, R.; Acharya, S. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2008**, *9*, 014109-014204.

²⁰³ (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, *421*, 350-353. (b) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3385-3394. (c) Zhu, Y.; Fujiwara, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2241-2244. (d) Fujiwara, M.; Terashima, S.; Endo, Y.; Shiokawa, K.; Ohue, H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4635-4637.

²⁰⁴ Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Giri, S.; Chen, H.T.; Lin, V.S.-Y. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853.

²⁰⁵ (a) Torney, F.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y.; Wang, K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 295-300. (b) Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V.S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. (c) Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker, M.P.; Lin, V.S.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044. (d) Lai, C.-Y.; Trewyn, B.G.; Jeftinija, D.M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459.

²⁰⁶ (a) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J.W.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371. (b) Nguyen, T.D.; Tseng, H.-R.; Celeste, P.C.; Flood, A.H.; Liu, Y.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10029-10034. (c) Hernandez, R.; Tseng, H.-R.; Wong, J. W.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370-3371.

²⁰⁷ (a) Angelos, S.; Liong, M.; Choi, E.; Zink, J.I. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 4-13. (b) Nguyen, T.D.; Leung, K.C.-F.; Liong, M.; Pentecost, C.D.; Stoddart, J.F.; Zink, J.I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366. (c) Leung, K.C.-F.; Nguyen, T.D.; Stoddart, J.F.; Zink J.I. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5919-5928.

²⁰⁸ (a) Casasús, R.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D.; Guillem, C.; Latorre, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612-8613. (b) Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6661-6664. (c) Casasús, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903-1917. (d) Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-

sistemas es su uso como almacén de carga, para su posterior liberación bajo la aplicación de un estímulo externo.²¹¹ Cómo ya se ha descrito, el desarrollo de ‘puertas nanoscópicas moleculares’²¹² permite el transporte de masa controlando la entrada y/o salida de moléculas del interior de los mesoporos al exterior. La posibilidad de aplicar distintos estímulos externos (fotoquímicos, electroquímicos, iónicos, cambios de polaridad, presencia de ciertas bio-moléculas, etc)²¹³ para liberar bajo demanda ciertas especies de interés (fármacos, proteínas, fragmentos de ADN y ARN, enzimas, etc)²¹⁴ hace muy atractivo el desarrollo y el estudio de este tipo de materiales híbridos.

Los sistemas de liberación tradicionales están basados en muchos casos en polímeros orgánicos, que normalmente liberan carga mediante procesos de difusión controlada, o por degradación de la matriz polimérica.^{215,216,217,218,219,220,221}

Máñez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Soto, J. *J. Control. Release*, **2008**, *131*, 181-189.

²⁰⁹ (a) Aznar, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F., *Expert Opinion*, **2009**, *6*, 643-655. (b) Aznar, E.; Casasús, R.; García-Acosta, B.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2228-2231. (c) Coll, C.; Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957-1959. (d) Aznar, E.; Coll, C.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Cano, J.; Ruíz, E. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877-6888. (e) Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P.; Guillem, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833-6843.

²¹⁰ (a) Park, C.; Lee, K.; Kim, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1275-1278. (b) Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y. B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 1731-1734. (c) Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10645-10647. (d) Song, S. -W.; Hidajat, K.; Kawi, S. *Chem. Commun.* **2007**, *42*, 4396-4398. (e) Wu, Z.; Jiang, Y.; Kim, T.; Lee, K.; *Journal of Controlled Release*. **2007**, *119*, 215-221.

²¹¹ (a) Descalzo, A. B.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Hoffmann, K.; Rurack, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924-5948. (b) Ariga, K.; Vinu, A.; Hill, J. P.; Mori, T.; *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2562-2591.

²¹² Trewyn, B.G.; Giri, S.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. *Chem. Commun.* **2007**, 3236-3245.

²¹³ (a) Climent, E.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Maquieira, A.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281- 7283. (b) Climent, E.; Bernardos, A.; Martínez-Máñez, R.; Maquieira, A.; Marcos, M.D.; Pastor-Navarro, N.; Puchades, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14075-14080.

²¹⁴ Bernardos, A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Pérez-Payá, E.; Guillem, C.; Amorós, P. *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6353-6368.

²¹⁵ Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *277*, 119-131.

²¹⁶ Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K.L. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 3-13.

²¹⁷ Traitel, T.; Goldbart, R.; Kost, J. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2008**, *19*, 755-767.

Sin embargo, el empleo de materiales poliméricos como 'puertas moleculares' ha sido poco explotado pese a que es un enfoque con muchos puntos de interés. Una de las características principales de los polímeros que puede resultar de utilidad para su empleo como 'puertas moleculares' en materiales híbridos es su condición de macromoléculas con tamaños a la carta. Este gran tamaño va a facilitar el bloqueo de los poros del soporte inorgánico con la consiguiente inhibición de la liberación de la carga. Además, se pueden preparar materiales poliméricos conteniendo diferentes grupos funcionales, lo que permite controlar su tamaño, disposición o estructura empleando distintos estímulos externos.

Este interés en la preparación de materiales híbridos orgánico-inorgánicos que empleen materiales poliméricos como 'puerta' se ve refrendado en la publicación de varios artículos durante los últimos años. La gran mayoría de los materiales híbridos con 'puerta' polimérica emplean la temperatura como estímulo externo para controlar la liberación de carga. En todos ellos se emplean como polímeros derivados de la *N*-isopropilacrilamida. Este tipo de polímeros exhiben una transición hidrófilo-hidrófobo en agua a una temperatura de 32° C. Por debajo de esta temperatura el polímero está hidratado y presenta una conformación lineal, mientras que por encima presenta una conformación globular. Estos cambios de conformación/volumen han sido extensamente empleados para el desarrollo de materiales híbridos con 'puertas moleculares'.²²² También se han preparado materiales híbridos con hidrogéles que cambian de forma en función del pH del medio. Así, se han preparado materiales híbridos orgánico-inorgánico con

²¹⁸ Puoci, F.; Iemma, F.; Picci, N. *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 85-96.

²¹⁹ Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R.; Bodmeier, R. *J. Control. Release*, **2008**, *125*, 1-15.

²²⁰ Harrison, K. *Biomed. Polym.*, **2007**, 33-56.

²²¹ Nair, L.S.; Laurenciana, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762-798.

²²² (a) Fu, Q.; Rao, G. V. R.; Ista, L. K.; Wu, Y.; Andrzejewski, B. P.; Sklar, L. A.; Ward, T. L.; López, G. P. *Adv. Mater.*, **2003**, *15*, 1262-1266. (b) Fu, Q.; Rao, G. V. R.; Ward, T. L.; Lu, Y.; López, G. P. *Langmuir*, **2007**, *23*, 170-174. (c) You, Y. -Z.; Kalebaila, K. K.; Brock, S. L.; Oupicky, D. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 3354-3359. (d) Zhou, Z. Y.; Zhu, S. M.; Zhang, D. J. *Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 2428-2433. (e) Zhu, S.; Zhou, Z.; Zhang, D.; Jin, C.; Li, Z. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **2007**, *106*, 56-61. (f) Zhu, Y.; Kaskel, S.; Ikoma, T.; Haganata, N. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **2009**, *123*, 107-112. (g) Liu, C.; Guo, J.; Yang, W.; Hu, J.; Wang, C.; Fu, S. *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 4764-4770. (h) Lai, J.; Mu, X.; Xu, Y.; Wu, X.; Wu, C.; Li, C.; Chen, J.; Zhao, Y. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7370-7372.

soportes mesoporosos y funcionalizados en su superficie externa con ácido poliacrílico que se han empleado para la liberación controlada de diversas especies.²²³ Finalmente, Feng et al han preparado el primer material híbrido que emplea una matriz mesoporosa y un polímero orgánico redox activo como 'puerta molecular'.²²⁴ En este nuevo material híbrido se ancla el polímero poli(*N*-acriloxisuccinimida) en la superficie externa de un soporte mesoporoso del tipo MCM-41. La posterior adición de cisteamina induce el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas al formarse entre ellas puentes disulfuro. La ruptura de estos enlaces S-S con el ditiotreitól induce la liberación de la carga ocluida en el interior de los poros.

4.1.2 Polímeros.

Una manera de dar mayor aplicabilidad e interés a los nanomateriales híbridos, podría ser la combinación de los mismos con polímeros sensibles a estímulos, capaces de cubrir la superficie de las nanopartículas de sílice, y posteriormente poder aplicarse en liberación *in vitro* e *in vivo* de moléculas bioactivas.

Resulta de interés la síntesis a la carta de polímeros que actúen como 'puerta' y se abran/cierren en función de estímulos externos, por ello en el presente capítulo se sintetizan diferentes poliésteres, capaces de hidrolizarse en presencia de una enzima característica.^{225,226,227,228,229}

En el capítulo siguiente, se van a desarrollar diferentes materiales híbridos, los cuales consisten en nanopartículas de sílice mesoporosas que contienen, en el interior de los poros el colorante Rodamina B y que están

²²³ (a) Song, S. -W.; Hidajat, K.; Kawi, S. *Chem. Commun.*, **2007**, 4396-4398. (b) Hong, C.-Y.; Li, X.; Pan, C. -Y.; *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 5155-5160.

²²⁴ Liu, R.; Zhao, X.; Wu, T.; Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14418-14419.

²²⁵ Patel, K.; Angelos, S.; Dichtel, W.R.; Coskun, A.; Yang, Y.-W.; Zink, J.I.; Stoddart, J.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383.

²²⁶ Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Bein, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092-3095.

²²⁷ Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5884-5887.

²²⁸ Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614-16615.

²²⁹ Thornton, P.D., Heise, A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 2024-2028.

funcionalizadas en la superficie externa con poliésteres conteniendo grupos azoicos. Estos materiales son utilizados en procesos de liberación controlada in vitro e intracelular, mediante vía endosomal hasta los autolisosomas, donde la presencia de esterases inducirá la apertura de la 'puerta'. Debido al gran tamaño de los poliésteres, se produce una inhibición de la salida del colorante Rodamina B del interior de los poros. Gracias a la presencia de una enzima esterasa, capaz de hidrolizar los enlaces éster que forman el poliéster, se producirá la liberación del colorante del interior al exterior de los poros. Los grupos azoicos son de marcado interés en este caso, ya que confieren mayor volumen que los poliésteres lineales, inhibiendo aún más la salida del colorante del interior de los poros.

4.2 Resultados y discusión.

4.2.1 Síntesis de materiales.

Como se ha comentado en la introducción del capítulo, la funcionalización de materiales de sílice mesoporosos con moléculas orgánicas a modo de 'puerta', ha demostrado ser un punto de partida prometedor a la hora de desarrollar sólidos nanoscópicos que permitan la liberación controlada de carga ocluida en el interior de los poros. La respuesta de las 'puertas nanoscópicas moleculares' está controlada por dos factores diferentes: (i) el mecanismo de 'apertura' o 'cierre' inducido mediante la aplicación de ciertos estímulos externos y (ii) la selección del material mesoporoso donde se va a anclar la 'puerta'. Para este trabajo se ha escogido el material mesoporoso MCM-41 como matriz inorgánica, ya que este soporte presenta una serie de características favorables como su porosidad homogénea, alta inercia química, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización mediante la química de los alcoxisilanos.^{230,231,232,233}

²³⁰ (a) El Haskouri, J.; Ortiz de Zarate, D.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A. B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Mañez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2002**, 4, 330-331. (b) Comes, M.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1783-1786. (c) Comes, M.; Rodríguez-López, G.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Villaescusa, L. A.; Amorós, P.; Beltrán, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2919-2922.

²³¹ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C. & Beck, J. S. *Nature*, **1992**, 359, 710-712.

La MCM-41 es un material de sílice que contiene mesoporos de 2-3 nm de tamaño. Esos poros permiten el cargado y liberación de moléculas de manera rápida. Esta MCM-41 contiene grupos silanol en la superficie, capaces de ser funcionalizados con diferentes moléculas orgánicas mediante la formación de enlaces covalentes, esas moléculas orgánicas podrán actuar a posteriori como 'puerta'.

Se ha elegido como moléculas 'puerta' dos poliésteres conteniendo grupos azoico en las cadenas laterales,^{234,235} uno de los poliéster conecta la cadena principal y los grupos azobenceno a través de 6 metilenos, **PAzo6**, mientras que el segundo poliéster la conexión entre la cadena principal del polímero y los azobencenos consta de 8 metilenos, **PAzo8**.

Estos poliésteres se han preparado mediante una fusión y posterior reacción de transesterificación entre un diol, contenido en los azobencenos, y un éster de difenilo. Los dioles utilizados son el 2-[6-(4-(4-cianofenilazo)-fenoxi)hexil]-1,3-propandiol, **Azo6**, y el 2-[6-(4-(4-cianofenilazo)-fenoxi)octil]-1,3-propandiol, **Azo8**, sintetizados previamente en el grupo del profesor Søren Hvilsted.²³⁶ El esquema 4.1 muestra un resumen de la secuencia sintética empleada para la preparación de los dioles **Azo6** y **Azo8**. Los derivados del 1,3-propanodiol (estructura **2** en el esquema 4.1) han sido preparados mediante una reacción de monoalquilación del malonato de dietilo con α,ω -dibromoalcanos en medio básico. Esta reacción da lugar a la formación de los diésteres **1** (ver esquema 4.1). A continuación se procedía a la reducción de los grupos éster de los compuestos **1** a los dioles correspondientes (estructura **2**) empleando $\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$ como sistema reductor. Posteriormente se procede a la protección de los dos grupos hidroxilo de los compuestos **2** mediante la formación de un acetal con acetona en medio ácido

²³² Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M., *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.*, **2003**, 26, 1199-1202.

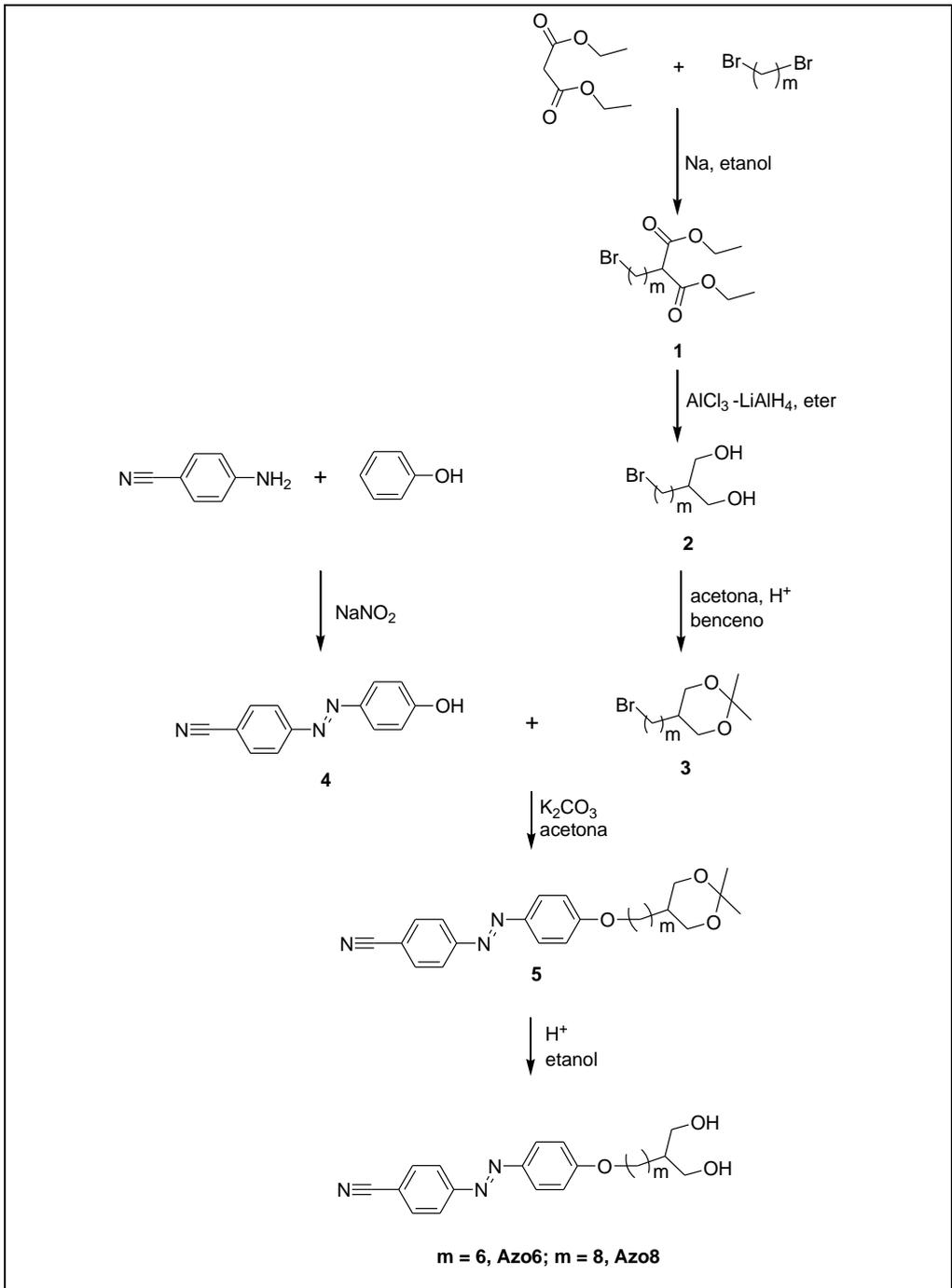
²³³ Vallet-Regí, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 5934-5943.

²³⁴ Kryder, M. H. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1993**, 23, 411-436.

²³⁵ Hvilsted, S.; Sanchez, C.; Alcalá, R. *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 6641-6648.

²³⁶ Ramanujam, P. S.; Holme, N. C. R.; Nikolova, L.; Berg, R. H.; Hvilsted, S.; Kristensen, E. T.; Kulinna, C.; Nielsen, A. B.; Pedersen, M. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, **1997**, 3011(Practical Holography XI and Holographic Materials III), 319-326.

dando lugar al correspondiente diol protegido **3**. Una reacción de sustitución nucleofílica entre los dioles protegidos **3** y el colorante azoico **4** (previamente sintetizado mediante una reacción de diazotación entre el fenol y la *p*-cianoanilina) da lugar a la formación de los azoicos protegidos **5**. Finalmente la desprotección de acetal **5** en medio ácido da lugar a los derivados finales **Azo6** y **Azo8**.

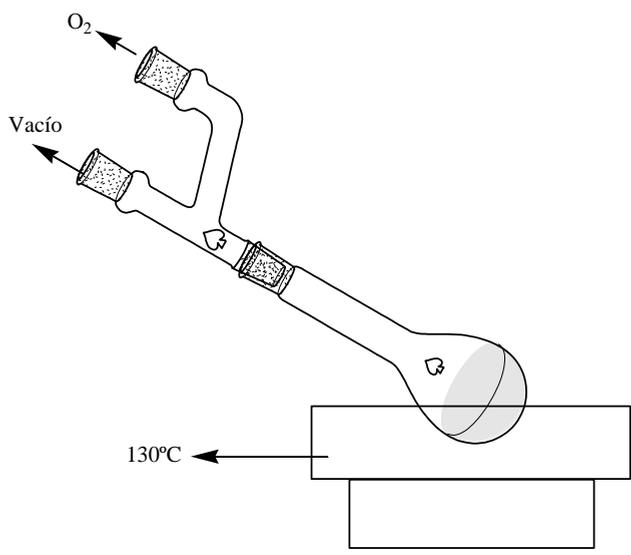


Esquema 4.1. Ruta sintética para la preparación de los dioles precursores **Azo6** ($m=6$) y **Azo8** ($m=8$).

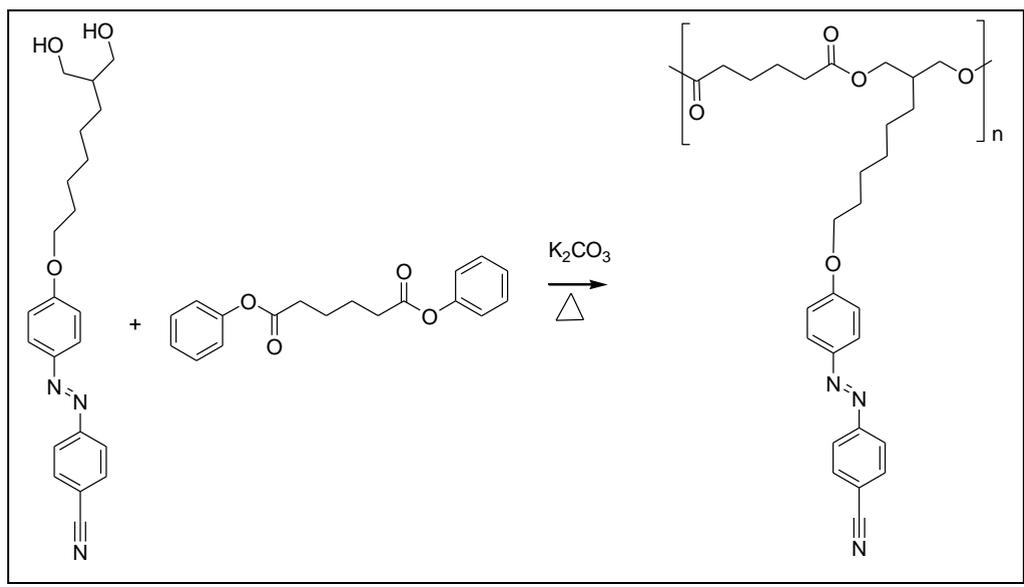
Para la preparación del primer poliéster, **PAzo6**, se procede a la fusión de los monómeros **Azo6** y el diéster adipato de difenilo. Después de la fusión, se calienta a alta temperatura y vacío para que se produzca una reacción de transesterificación.²³⁷ El segundo poliéster **PAzo8** se prepara de la misma manera a través de una reacción de transesterificación, con la utilización del diol **Azo8** en lugar del diol **Azo6** y el mismo diéster.

Así, la mezcla de reacción, diol más diéster, se calienta en un matraz reactor de vidrio en un baño de aceite, ver esquema 4.2 para observar el montaje experimental. En primer lugar, los monómeros se funden bajo movimiento manual del matraz reactor, para asegurar una mezcla homogénea. A continuación el reactor se enfría a temperatura ambiente y se añade un 1% de K_2CO_3 anhidro que va a actuar como catalizador. Posteriormente, el reactor se recalienta a 130° C durante dos horas a vacío. Como consecuencia de la reacción de transesterificación entre el diol y el adipato de difenilo se genera fenol como subproducto. A continuación, el reactor se enfría a temperatura ambiente y el poliéster formado se disuelve en tolueno. La disolución del polímero se vertió en un exceso de metanol obteniéndose un sólido que después se filtra y se seca al vacío durante al menos 12 horas a temperatura ambiente. Los polímeros finales **PAzo6** y **PAzo8** se aíslan como sólidos de color naranja (ver esquema 4.3 para la síntesis del polímero **PAzo6** y esquema 4.4 para el polímero **PAzo8**).

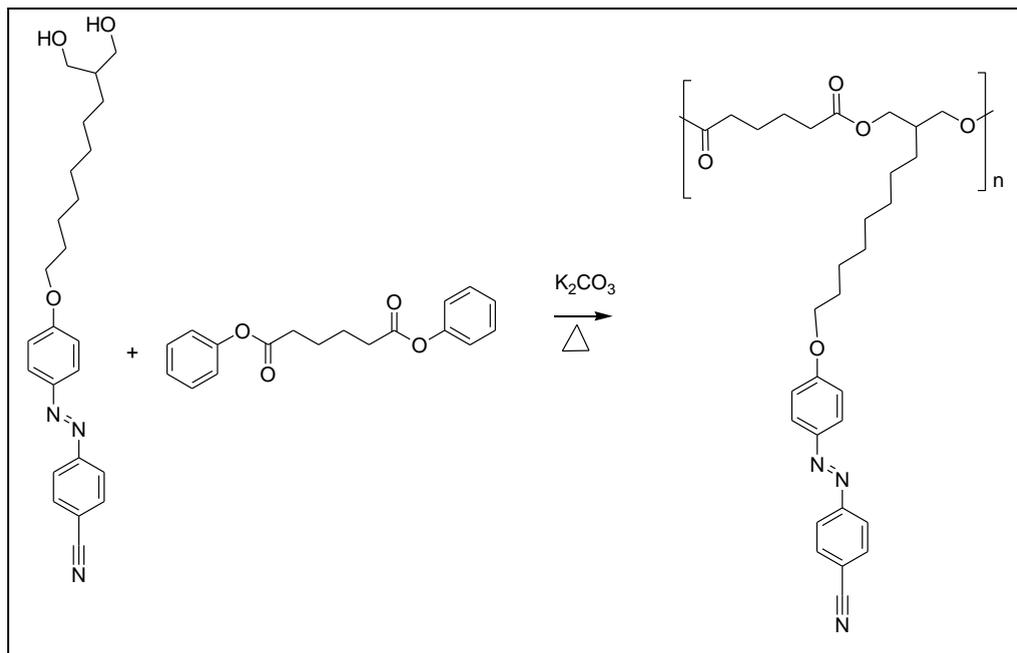
²³⁷ (a) Ramanujam, P. S.; Holme, C.; Hvilsted, S.; Pedersen, M.; Andruuil, F.; Paci, M.; Tassi, E. L.; Magagnini, P.; Hoffman, U.; Zebge, I.; Siesle, H. W. *Macromolecules*, **1995**, *28*, 2172-2183. (b) Ramanujam, P. S.; Holme, C.; Hvilsted, S.; Pedersen, M.; Andruuil, F.; Paci, M.; Tassi, E. L.; Magagnini, P.; Hoffman, U.; Zebge, I.; Siesle, H. W. *Polymers for Advanced Technologies*, **1996**, *7*, 768-776.



Esquema 4.2. Montaje experimental para la reacción de transesterificación diol + diéster.



Esquema 4.3. Mecanismo de síntesis para la formación del polímero PAzo6.

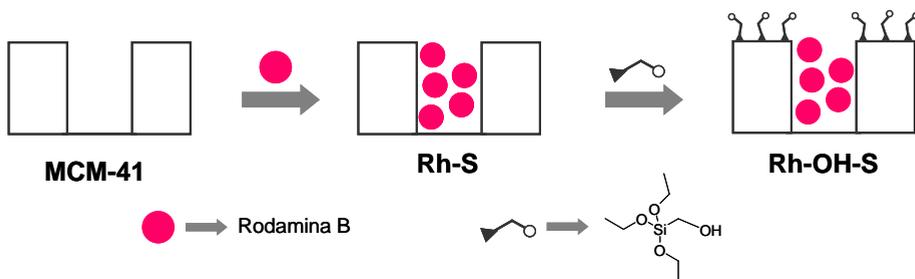


Esquema 4.4. Mecanismo de síntesis para la formación del polímero **PAzo8**.

A continuación, ya conocidos y seleccionados todos los componentes individuales que van a formar el material híbrido, hay que ensamblarlos siguiendo un orden determinado para asegurar la funcionalidad final. En primer lugar se sintetiza las nanopartículas de sílice mesoporosas MCM-41 y después se cargan los poros de estas con el colorante Rodamina B.

El material mesoporoso MCM-41, es sintetizado usando tetraetil ortosilicato (TEOS), que actúa como precursor inorgánico, y como surfactante, el tensoactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr). La eliminación posterior del tensoactivo mediante calcinación en aire a temperatura elevada, deja en el interior de la matriz silíceas un conjunto de cavidades. En esos poros del sólido, se introducirán las moléculas de colorante después de un proceso de cargado durante 24 horas dando lugar al sólido inicial **Rh-S**. En un segundo paso, se procede a la funcionalización durante 24 horas de un derivado alcoxisilano, hidroximetiltriatoxisilano, sobre la superficie externa del soporte cargado, cuyo grupo hidroxilo reaccionará con el ácido carboxílico terminal de los poliésteres,

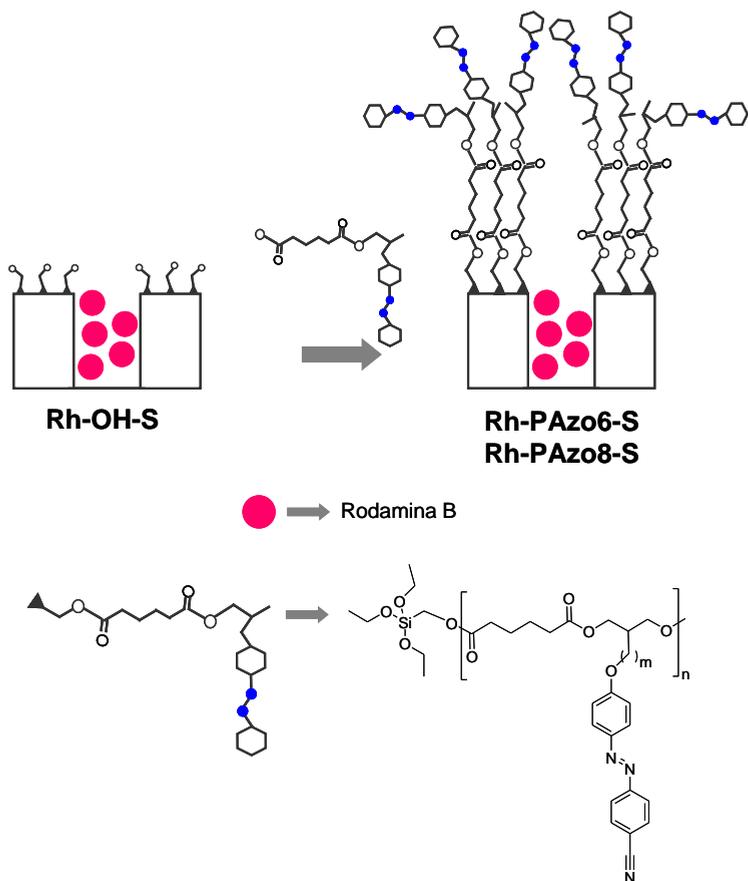
para dar un nuevo enlace éster. Este alcoxisilano se anclará preferentemente en la superficie externa del material, ya que los poros estarán llenos de colorante Rodamina B, dando lugar al sólido **Rh-OH-S**. El sólido final es filtrado, lavado y secado a temperatura ambiente durante 12 horas. Un resumen del proceso de síntesis del sólido **Rh-OH-S** se muestra en el esquema 4.5.



Esquema 4.5. Esquema del proceso de síntesis del sólido **Rh-OH-S**.

A continuación se procede al anclaje de los poliésteres **PAzo6** y **PAzo8** sobre la superficie externa del material **Rh-S**. Para ello se empleará la formación de un nuevo enlace éster, entre los grupos OH de la superficie del material con el ácido carboxílico terminal de los poliésteres **PAzo6** y **PAzo8**.²³⁸ Para la formación de este nuevo enlace éster se procederá a la activación del ácido carboxílico presente en los poliésteres **PAzo6** y **PAzo8** empleando *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC). La posterior reacción de los poliésteres activados con los grupos hidroxilo de la superficie del material en medio básico, a temperatura ambiente y durante 72 horas da lugar a la formación de nuevos grupos éster que anclan **PAzo6** y **PAzo8** en la superficie del material. Después de la reacción de anclaje, la mezcla se filtra, lava y seca durante 12 horas a temperatura ambiente, dando lugar a los sólidos finales **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** (Ver esquema 4.6).

²³⁸ Hoveyda, H. R.; Hall, D. G. *Macromolecules*, **1995**, *28*, 2172-2183.



Esquema 4.6. Esquema del proceso de síntesis de los sólido **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S**.

4.2.2 Caracterización polímeros.

Los polímeros sintetizados se han caracterizado por cromatografía de exclusión molecular, SEC, obteniéndose el valor del peso molecular (P_m) de los polímeros y del número n de repeticiones. Otra técnica utilizada es el análisis termogravimétrico, TGA, obteniendo información de la descomposición de los polímeros en función de la temperatura, siendo T_d la temperatura inicial de descomposición. Los altos valores de T_d , demostraban la alta estabilidad térmica de los polímeros a altas temperaturas. También se caracterizan por calorimetría diferencial de barrido, DSC, estudiando las transiciones térmicas de los polímeros

a 10°C/min, dando información de la temperatura de transición vítrea, T_g , y de la temperatura de fusión de los polímeros, T_m , tanto al calentar (picos endotérmicos) como al enfriar (picos exotérmicos). Ver tabla 4.1 para obtener toda la información de caracterización de los polímeros.

Tabla 4.1. Tabla resumen de los datos obtenidos en la caracterización de los polímeros sintetizados.

Polímero	Pm	n	η	Td	Tg	Tm ^a	Tm ^b
	Daltons		%	°C	°C	°C	°C
PAzo6	13858	29	98	207.51	3.34-4.68	56.73-59.00	55.21-57.64
PAzo8	16866	32	92	215.58	4.75-6.07	56.73	55.97

^a Tm: picos de fusión endotérmicos. ^b Tm: picos de fusión exotérmicos.

En la figuras 4.1, se puede observar el espectro infrarrojo, IR, del polímero **PAzo6** (curva c). Este espectro se compara con sus precursores, el **diéster** adipato de difenilo (curva a) y el diol **Azo6** (curva b). En la figura 4.1 se observa una banda ancha referida a la tensión O-H (3479 cm^{-1}) en el caso de los diol **Azo6**, curva b. Para todos, curvas a, b y c, se observa tensión C-H de grupos aromáticos: **PAzo6**: $2918\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}; **Azo6**: $2913\text{-}2846\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}; **diéster**: $2912\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}. También se pueden ver bandas de tensión C-N para los grupos cianuro (2221 cm^{-1}) en el caso de **PAzo6** y **Azo6**, curvas c y b. Y es de marcado interés observar el desplazamiento de la frecuencia de tensión C-O en los carbonilos, al pasar de éster arílico en el **diéster** (1750 cm^{-1}) a éster alquílico en **PAzo6** (1723 cm^{-1}), ver curvas a y c.

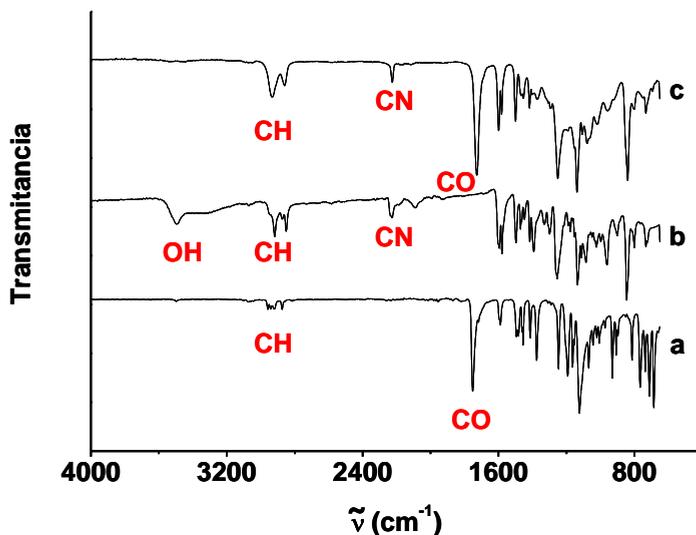


Figura 4.1. Espectros IR de los compuestos (a) adipato de difenilo, (b) **Azo6** y (c) **PAzo6**.

En la figuras 4.2, se pueden observar el espectro infrarrojo, IR, del polímero **PAzo8** (curva c). Este espectro se compara con sus precursores, el **diéster** adipato de difenilo (curva a) y el diol **Azo8** (curva b). En la figura 4.2 se observa una banda ancha referida a la tensión O-H (3271 cm^{-1}) en el caso de los diol **Azo8**, curva b. Para todos, curvas a, b y c, se observa tensión C-H de grupos aromáticos: **PAzo8**: $2917\text{-}2849\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}; **Azo8**: $2908\text{-}2846\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}; **diéster**: $2912\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$ (C-H)_{ar}. También se pueden ver bandas de tensión C-N para los grupos cianuro en el caso de **PAzo8** (2219 cm^{-1}) y **Azo8** (2231 cm^{-1}), curvas c y b. Y es de marcado interés observar el desplazamiento de la frecuencia de tensión C-O en los carbonilos, al pasar de éster arílico en el **diéster** (1750 cm^{-1}) a éster alquílico en **PAzo8** (1725 cm^{-1}), ver curvas a y c.

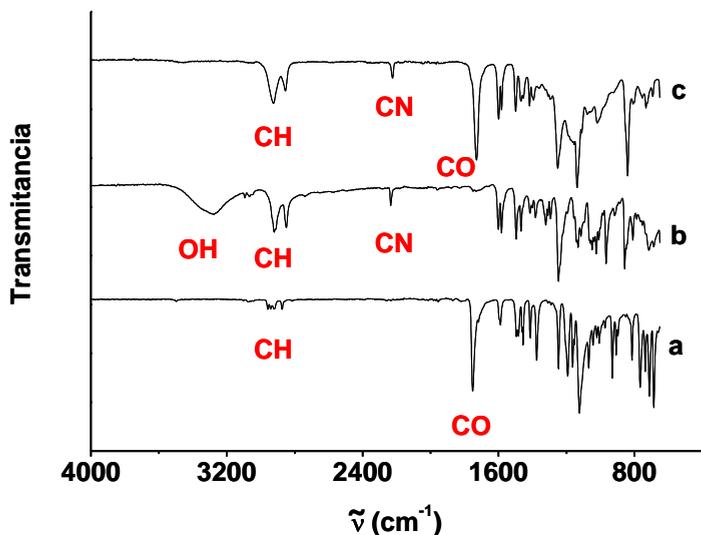


Figura 4.2. Espectros IR de los compuestos (a) adipato de difenilo, (b) **Azo8** y (c) **PAzo8**.

Los datos obtenidos de SEC demuestran la formación de un polímero, dado los elevados valores de peso molecular para ambos polímeros **PAzo6** y **PAzo8**. Y los dos IR demuestran la formación de un nuevo enlace éster alquílico, debido al desplazamiento de la banda de tensión C-O de carbonilo, siendo, según tablas tabuladas, alrededor de 1750 cm^{-1} para ésteres unidos a grupos aromáticos y alrededor de 1725 cm^{-1} para ésteres unidos a grupos alquílicos.

4.2.3 Caracterización de materiales.

Para la caracterización de los sólidos sintetizados en el presente capítulo se utilizarán las técnicas estándar en la química del estado sólido: difracción de Rayos-X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental y análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 .

Los difractogramas de Rayos X de polvo (PXRD) de los sólidos MCM-41 sintetizada, MCM-41 calcinada y el sólidos final **Rh-OH-S** se pueden observar en

la figura 4.3. Como ya se ha explicado en cada uno de los capítulos anteriores, el PXRD a ángulos bajos del material silíceo MCM-41 sintetizado, en este caso curva a, muestra cuatro reflexiones que pueden ser asignados a los planos de Bragg (100), (110), (200), y (210), representativos de la estructura hexagonal. En este caso, se calcula un parámetro de celda a_0 de 48 Å. ($d_{100}= 41.64$ Å). El material MCM-41 calcinado, curva b, muestra un desplazamiento significativo de la reflexión (100) representativo de los sólidos mesoporosos, debido a una contracción de la celda de aproximadamente 6-8 Å, calculando un parámetro de celda a_0 de 40.8 Å. ($d_{100}= 35.3$ Å). El desplazamiento y ensanchamiento de los picos (110) y (200) es debido, probablemente, a la condensación de los silanoles de la superficie del material durante el proceso de calcinado. El difractograma del sólido sintetizado **Rh-OH-S** se muestran también en la figura 4.3 (curva c). Este sólido muestra unas reflexiones asociadas a los planos de Bragg (110) y (200) más pequeños que en el caso de la MCM-41 calcinada. Esto podría deberse a la presencia de Rodamina B en el interior de los poros de la MCM-41. Aunque la presencia de la reflexión 100, sugiere que el proceso de carga con el colorante y la posterior funcionalización adicional con la molécula hidroximetiltrietoxisilano no ha modificado la estructura mesoporosa de la MCM-41. Este pico (100) no sufre importantes cambios en su posición en el sólido, lo que es indicativo de que la funcionalización de la superficie no daña sustancialmente la estructura mesoporosa de la matriz silícea. En los materiales tipo MCM-41 el aumento o disminución de la intensidad del pico de difracción de rayos X no es necesariamente una indicación de un cambio en la regularidad de la ordenación de los canales. La generación de los picos de difracción de rayos X de polvo es consecuencia de la diferencia en el poder de dispersión entre los dos componentes estructurales (la pared de sílice y los canales) de la estructura de MCM-41. La introducción de grupos orgánicos en los canales puede ocasionar la pérdida de contraste, y por tanto causar la disminución de la intensidad de los picos observada.

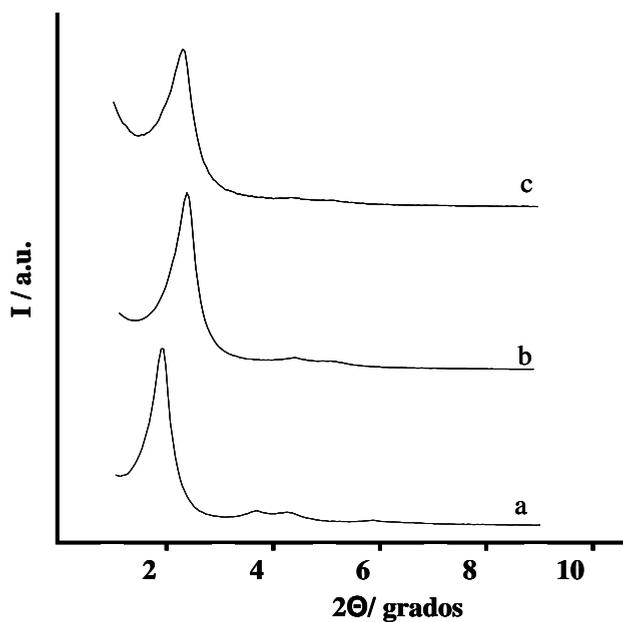


Figura 4.3. Difractogramas de Rayos X de polvo de los sólidos (a) MCM-41 sintetizada, (b) MCM-41 calcinada y (c) *Rh-OH-S*.

La imagen de TEM de la MCM-41 calcinada de partida muestra la típica porosidad hexagonal de la matriz MCM-41 (figura 4.4). En la figura se pueden observar los canales típicos de la matriz MCM-41 como rayas blancas y negras alternas. La figura también muestra que los materiales MCM-41 sintetizados son partículas esféricas con diámetros de 100 a 200 nm.

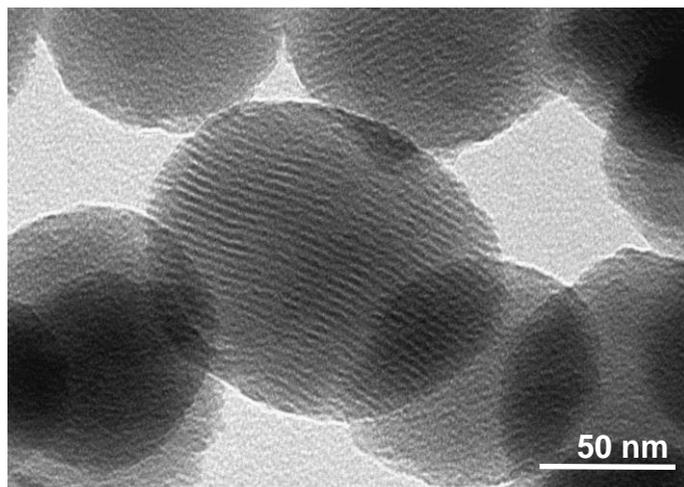


Figura 4.4. Imagen de TEM de (a) MCM-41 calcinada y (b) del sólido final Rh-PAzo8-S, mostrando la porosidad característica de material mesoporoso.

A continuación, para obtener el área superficial, tamaño y volumen de poro de los sólidos preparados, se procede al análisis de las isotermas de adsorción-desorción de N_2 a la temperatura del nitrógeno líquido ($-196^\circ C$). La isoterma de adsorción-desorción de N_2 de las nanopartículas de MCM-41 calcinadas se muestra en la figura 4.5, curva a. Se puede observar la curva típica para los sólidos mesoporosos con un proceso de adsorción claro a valores de presión intermedia P/P_0 (0.1-0.3). Esta curva es típica de una isoterma de tipo IV, en la que el proceso de adsorción es debido a la condensación de nitrógeno dentro de los mesoporos de la MCM-41. La ausencia de ciclo de histéresis en este intervalo y la distribución estrecha de poro sugiere la existencia de mesoporos cilíndricos uniformes. El diámetro de poro se calcula mediante el uso del método BJH (Barret-Joyner-Halenda),²³⁹ obteniéndose un valor de 2.55 nm y un volumen de poro de $0.82 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, calculado usando el modelo de BJH en la rama de la isoterma de adsorción. Para la obtención de la superficie total específica, se aplica el modelo de BET (Brunauer-Emmett-Teller),²⁴⁰ dando un valor de la misma de $1004.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, ver tabla 4.2. Del PXRD, la porosimetría y los estudios de TEM, se pueden calcular

²³⁹ Barret, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 373-380.

²⁴⁰ Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 309-319.

el parámetro de celda a_0 de 40.8 Å. ($d_{100} = 35.3$ Å), diámetro de poro (2.55 nm) y el espesor de la pared de sílice entre poros (17.9 Å). Además del proceso de adsorción asociado a los mesoporos generados por micelas de surfactante, se puede observar una segunda adsorción a presión relativamente alta ($P/P_0 > 0.8$). Esta adsorción corresponde al relleno de los huecos grandes que hay entre partículas (usando el modelo de BJH se calcula un volumen de $0.25 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y por lo tanto debe ser considerada como una porosidad textural. En este caso, las curvas muestran un ciclo de histéresis de tipo H1 con una amplia distribución de tamaño de poro.

La isoterma de adsorción-desorción de N_2 para el material precursor **Rh-OH-S** es típica de sistemas mesoporosos con los mesoporos prácticamente llenos (ver figura 4.5 b), los mesoporos de las nanopartículas de sílice se encuentran llenos del colorante Rodamina B. En este caso, se obtendrá un volumen de adsorción de N_2 relativamente bajo (volumen del mesoporo BJH = $0.29 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y poca área superficial ($472.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Esa curva plana, cuando se compara con la de la MCM-41 calcinada, es indicativa de la ausencia de cualquier porosidad que, junto con una conservación del orden pseudo-hexagonal deducido por medio de la difracción de RX y el estudio por TEM, evidencian un cargado del colorante altamente efectivo. A pesar de la disminución significativa del volumen de poro BJH, todavía se pueden observar algunos rasgos en la distribución de tamaño de poro (figura interior de la figura 4.5 b) como un máximo en 1.8 nm (frontera entre meso y microporo) y varios hombros en el intervalo entre los 2-3 nm. Además, la porosidad textural se conserva ($0.30 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) aunque con un pequeño aumento del volumen, cuando se compara con la MCM-41 calcinada de partida. Ver tabla 4.2.

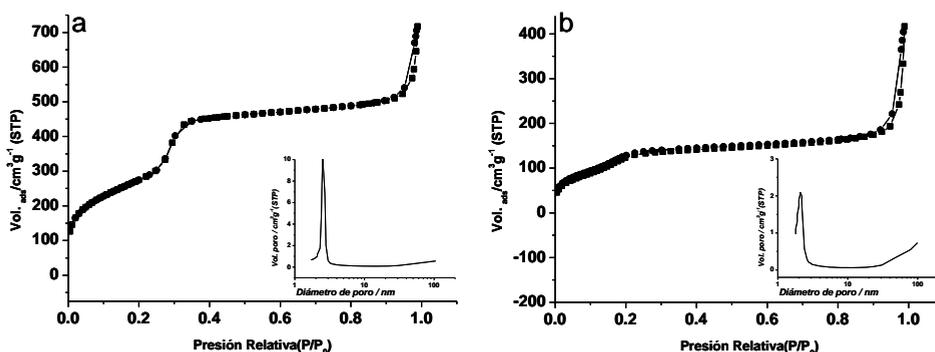


Figura 4.5. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro (figura interior) para el sólido (a) MCM-41 y (b) Rh-OH-S. (V_{ADS} : Volumen adsorbido en cm^3/g). En la figura interior se muestra la distribución del tamaño de poro para el material MCM-41 y para el sólido final Rh-OH-S.

Tabla 4.2. Valores de la superficie total específica BET, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para los materiales seleccionados.

Sólido	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	Volumen de poro ^a ($cm^3 g^{-1}$)	Tamaño de poro ^a (nm)
MCM-41	1004.6	0.82	2.55
Rh-OH-S	472.5	0.29	< 2

^a Volumen (V) y diámetro (D) del mesoporo

La aplicación de todas estas técnicas experimentales a los materiales Rh-Azo6-S y Rh-Azo8-S, muestran que tanto el cargado con Rodamina B, como la funcionalización posterior, no modifican la estructura inicial del material mesoporoso.

El contenido de materia orgánica de los diferentes sólidos sintetizados se calcula con las técnicas de análisis elemental y termogravimetría. Los contenidos se recogen en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Contenido (α) de colorante y de polímero por milimol y por gramo de SiO_2 , para los sólidos sintetizados.

Sólido	α 'funcionalización' (g/g SiO_2)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (g/g SiO_2)	$\alpha_{\text{colorante}}$ (mmol/g SiO_2)
Rh-S	-	0.356	0.746
Rh-OH-S	0.019	0.296	0.620
Rh-PAzo6-S	0.046	0.196	0.410
Rh-PAzo8-S	0.034	0.073	0.153

4.2.4 Mecanismo de la 'puerta'.

Después de la síntesis y caracterización de los materiales, se procede al estudio de los mismos como 'puerta nanoscópica molecular' y su aplicación en liberación controlada. Los sólidos sintetizados **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** están cargados en el interior de los poros con el colorante Rodamina B y funcionalizados en el exterior del material con los polímeros **PAzo6** y **PAzo8**. Se espera que el anclaje de estos polímeros inhiba la salida de carga del interior de los poros debido al impedimento estérico que producen los poliésteres.

A continuación se efectúa el estudio de liberación controlada en agua del colorante Rodamina B desde los sólidos sintetizados **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S**, en ausencia y presencia de la enzima esterasa, capaz de hidrolizar los enlaces éster que forman los poliésteres, y así permitir el desbloqueo de los poros de la MCM-41 y posterior liberación de la carga del interior a la exterior del material. Como ya se ha comentado en el presente capítulo, el uso de esterases como estímulo externo es de marcado interés, debido a la presencia de las mismas en los lisosomas celulares, por tanto se piensa en una aplicación de estos materiales en liberación celular. La liberación del colorante Rodamina B desde el interior de los poros a la solución acuosa puede ser seguida por medio de la banda de fluorescencia del colorante Rodamina B a 580 nm.

En primer lugar se procede al estudio de la liberación del sólido **Rh-PAzo6-S** en ausencia de esterasa a pH 8. En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Rh-PAzo6-S** era suspendido en agua a pH 8. A continuación la suspensión

se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 22 horas y 24 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación era monitorizada registrando la fluorescencia del colorante emitiendo a 580 nm, excitando previamente a 554 nm. La figura 4.6 muestra que la liberación del colorante desde el sólido **Rh-PAzo6-S** es muy baja.

Por el contrario, si se realiza el mismo ensayo para el sólido **Rh-PAzo6-S** en presencia de una disolución de esterasa a pH 8, lo que ocurre es marcadamente diferente. En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Rh-PAzo6-S** era suspendida en una disolución de la esterasa de 1000 ppm en agua a pH 8 y, a continuación, la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 22 horas y 24 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación se estudia mediante la monitorización de la Rodamina B, midiendo la fluorescencia del colorante a 580 nm, excitando a 554 nm. En la figura 4.6 se puede observar como aumenta considerablemente la intensidad de fluorescencia, con 1000 ppm de enzima. La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de colorante liberado desde el sólido **Rh-PAzo6-S**. En la figura 4.6 se puede apreciar que en ausencia de enzima solamente se libera un 2 % de colorante después de 24 horas, mientras que se observa una liberación casi completa en presencia de 1000 ppm de esterasa después de 24 horas.

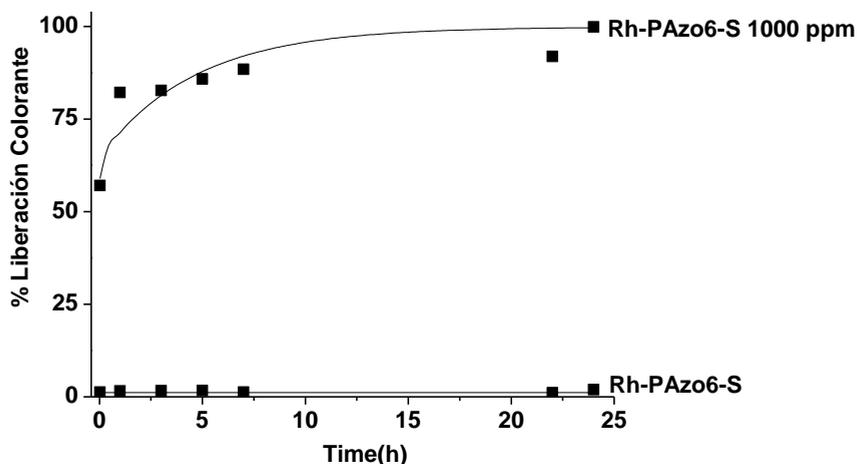


Figura 4.6. Cinética de liberación del colorante Rodamina B, desde una suspensión del sólido **Rh-PAzo6-S** en ausencia y presencia de 1000 ppm de esterasa, en agua a pH 8.

Para el sólido **Rh-PAzo8-S** se ha realizado el mismo ensayo que en el caso anterior, dando perfiles de liberación similares a **Rh-PAzo6-S** en ausencia de esterasa a pH 8. Si se realiza el mismo ensayo para el sólido **Rh-PAzo8-S** en presencia de una disolución de esterasa a pH 8, lo que ocurre es marcadamente diferente. En un ensayo típico, una cantidad del sólido **Rh-PAzo8-S** era suspendida en una disolución de la esterasa de 100 ppm y de 1000 ppm en agua a pH 8 y, a continuación, la suspensión se agitaba a temperatura ambiente y se recogían alícuotas a los 2 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 22 horas y 24 horas (ver parte experimental para los detalles). La liberación se estudia mediante la monitorización de la Rodamina B, midiendo la fluorescencia del colorante a 580 nm, excitando a 554 nm. En la figura 4.7 se puede observar como aumenta considerablemente la intensidad de fluorescencia, tanto con 100 ppm como con 1000 ppm de enzima, siendo marcadamente mayor cuanto mayor es la concentración de esterasa, demostrando la liberación del colorante Rodamina B. En la figura 4.7 se puede apreciar que en ausencia de enzima solamente se libera un 13 % de colorante después de 24 horas, mientras que en presencia de 100

ppm de esterasa se libera aproximadamente un 25 % de colorante y se observa una liberación casi completa en presencia de 1000 ppm de esterasa después de 24 horas.

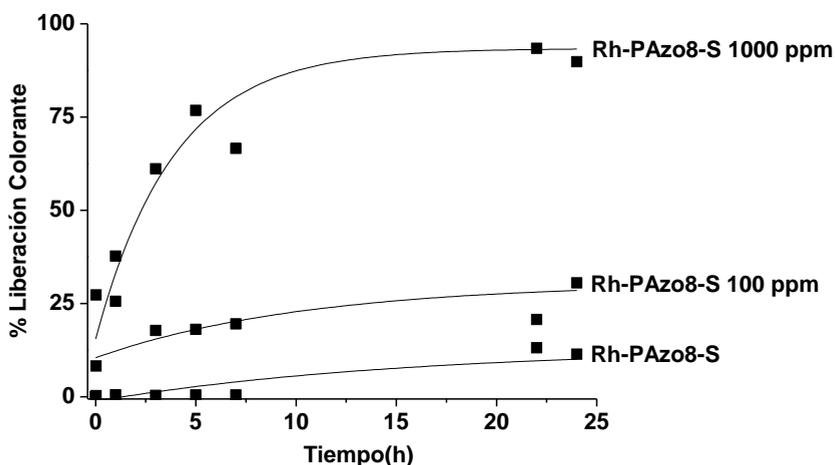


Figura 4.7. Cinética de liberación del colorante Rodamina B, desde una suspensión del sólido **Rh-PAzo8-S** en ausencia y presencia de 100 ppm de esterasa y de 1000 ppm de esterasa, en agua a pH 8.

Una característica importante de los materiales **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** es su capacidad de liberar su carga de manera progresiva durante períodos prolongados de tiempo. Se observó que la liberación del colorante desde **Rh-PAzo8-S** en ausencia de esterasa, seguía siendo prácticamente nula después de 10 días. En cambio, en presencia de esterasa (1000 ppm) después de 10 días, se observaba a simple vista el color rosa característicos del colorante Rodamina B, como muestra la figura 4.8.

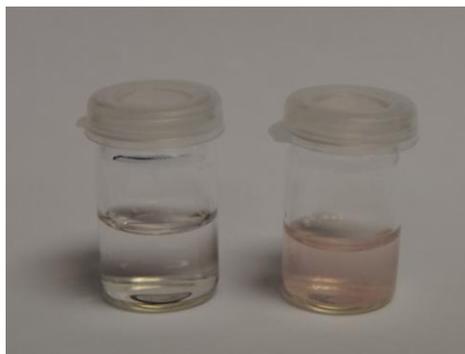
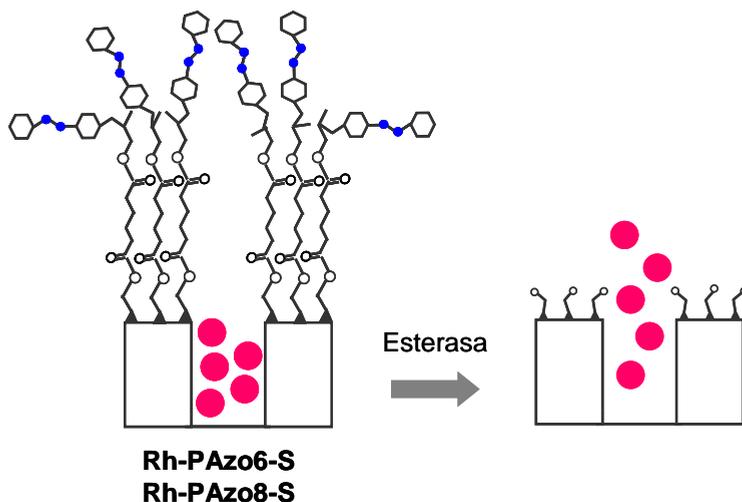


Figura 4.8. Liberación de Rodamina B desde el sólido **Rh-PAzo8-S** en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de esterasa, pasados 10 días.

Como se ha explicado en el presente capítulo, cuando los sólidos **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** se suspenden en una disolución acuosa a pH 8 se observa una liberación cercana a cero del colorante. Esta inhibición es debida al gran tamaño y volumen de los poliésteres, conteniendo grupos azoico, anclados en la superficie externa de los poros. En presencia de esterasas, se produce una liberación del colorante debido a hidrólisis del enlace éster que une a las distintos monómeros que forman el polímero y a hidrólisis de los grupos azoicos presentes en los poliésteres. El mecanismo de liberación enzimática con esterasas de todos los materiales se puede observar en el esquema 4.7.



Esquema 4.7. Mecanismo de liberación de la Rodamina B de los sólidos **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S**, en presencia de esterasa, que hidroliza el enlace éster que une a los poliésteres.

4.2.5 Liberación intracelular.

Como ya se ha explicado en el capítulo anterior, la internalización celular de nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con 'puertas moleculares', sensibles a diferentes tipos de estímulos, constituye un nuevo campo interdisciplinar de investigación en la frontera de la nanociencia.^{212-221,241} Por lo tanto, resulta de marcado interés desarrollar nanodispositivos especializados en la liberación controlada intracelular. Cómo previamente se ha comprobado mediante ensayos *in vitro*, el sólido **Rh-PAzo8-S** se postula como un buen candidato para la liberación controlada de carga en presencia de enzimas. Por esta razón, su capacidad de ser internalizado por las células y la liberación de su carga en el interior celular, será estudiada en este capítulo. Dado el tamaño de estas nanopartículas, la vía de internalización más probable será por endocitosis. Una vez en los endosomas, la fusión de estos orgánulos con los lisosomas

²⁴¹ (a) Rosenholm, J.M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R. Eriksson, J.E.; Sahlgren, C.; Linden, M. *ACS Nano*, **2009**, 3, 197-206. (b) Xia, T.; Kovochich, M.; Liang, M.; Meng, H.; Kabehie, S.; George, S.; Zink J.I.; Nel, A.E. *ACS Nano*, **2009**, 3, 3273-3286. (c) Rosenholm, J.M.; Peuhu, E.; Eriksson, J.E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. *Nano Letters*, **2009**, 9, 3308-3311.

permitirá la liberación de la carga del **Rh-PAzo8-S**, mediante degradación enzimática del poliéster, **PAzo8**, gracias a las esterasas lisosomales.

Cómo primer ensayo, se evalúa la capacidad de las células para internalizar las nanopartículas **Rh-PAzo8-S**. Para ello, se escogieron dos líneas celulares: HeLa, una línea tumoral de cáncer de cuello de útero y, MCF-7 (acrónimo de Michigan Cancer Foundation-7), una línea tumoral de cáncer de mama. Estas células fueron incubadas en presencia del sólido **Rh-PAzo8-S** (50 µg/mL) durante 20 minutos. A continuación, el medio es eliminado, se añade medio fresco y tras 15 horas de incubación se analiza la localización intracelular de las nanopartículas **Rh-PAzo8-S**. Para ello, se utiliza la fluorescencia asociada al colorante Rodamina B (rojo).

En la figura 4.9 se pueden observar dos fotografías de microscopía confocal asociadas a la internalización del material a estudio **Rh-PAzo8-S** en las dos líneas celulares. Se emplean también el marcador de ADN, asociado al núcleo celular, Hoechst 33342 (azul) y el marcador de membrana plasmática WGA Alexa Fluor 647 (verde). La señal de la Rodamina B observada, presenta un patrón intracelular punteado, asociado a vesículas debido a la internalización vía endosomas. Así mismo, se observa un patrón de fluorescencia difuso citoplasmático indicativo de la liberación de Rodamina B del sólido **Rh-PAzo8-S** en ambas líneas celulares. (Ver capítulo experimental para los detalles).

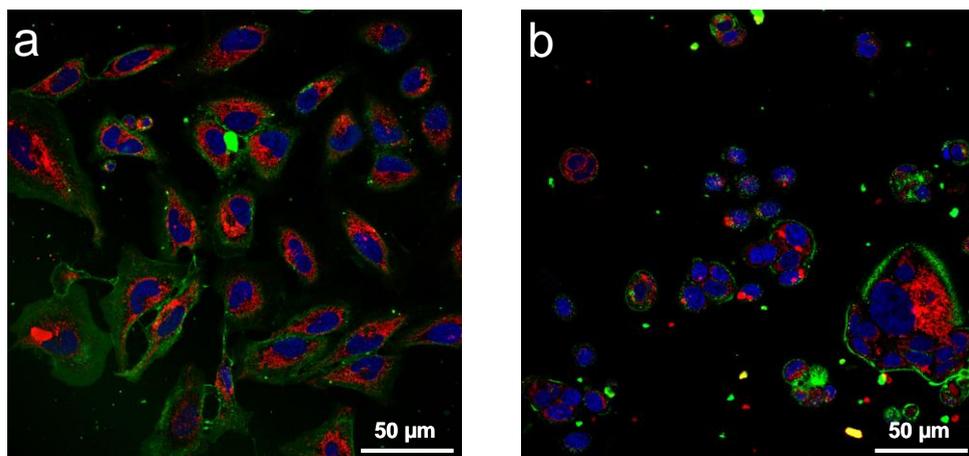


Figura 4.9. Internalización celular de **Rh-PAzo8-S** en (a) células tumorales *HeLa* y (b) células de cáncer de mama *MCF-7*.

Por otro lado se realizaron ensayos de viabilidad tipo WST-1 (reactivo de proliferación celular), donde el reactivo es empleado para determinar la posible toxicidad de las nanopartículas **Rh-PAzo8-S** en células. Este ensayo revela, como se puede observar en la figura 4.10, que en las condiciones estudiadas el sólido **Rh-PAzo8-S** resultaba inocuo (no tóxico) para las células, presentando altos porcentajes de viabilidad celular. Estas células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las nanopartículas **Rh-PAzo8-S** (200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$).

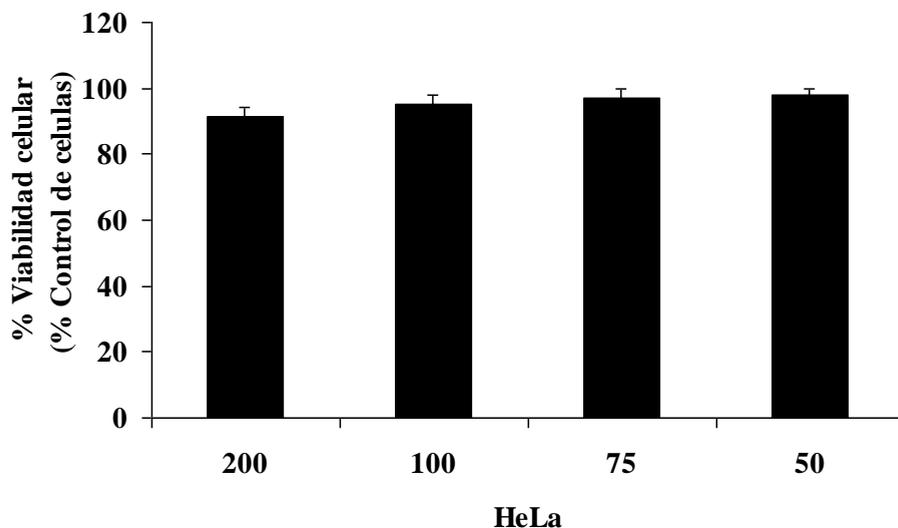


Figura 4.10. Ensayos de viabilidad celular, las células fueron tratadas con *Rh-PAzo8-S* en las mismas condiciones, empleando concentraciones de *Rh-PAzo8-S* de 200, 100, 50, y 25 µg/mL. La viabilidad fue cuantificada 24 horas después mediante el ensayo WST-1.

4.3 Conclusiones.

Se han sintetizado dos poliésteres azoicos **PAzo6** y **PAzo8**, capaces de funcionalizarse en la superficie de materiales de sílice y bloquear la salida de los poros, actuando como ‘puerta nanoscópica molecular’.

Se han desarrollado dos materiales híbridos **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** capaces de liberar, de forma controlada un colorante, Rodamina B, empleando específicamente la enzima esterasa. Los sólidos sintetizados consisten en una estructura mesoporosa MCM-41 nanoparticulada que contiene poliésteres con grupos azoicos anclados en la superficie externa y colorante Rodamina B ocluido en el interior de los poros. Con estos materiales se puede controlar la liberación del colorante gracias a la presencia de esterasa, observándose una liberación cercana a cero en ausencia de esterasa, debido al impedimento estérico de los poliésteres funcionalizados en la superficie del material. En presencia de la

enzima esterasa se observa una liberación casi completa del colorante, debido a la hidrólisis de los enlaces éster que forman los poliésteres.

Se estudia la liberación intracelular del sólido **Rh-PAzo8-S**. Se utilizan las células tumorales de cuello de útero HeLa y las células de cáncer de mama MCF-7 para los ensayos de viabilidad, demostrando la 'no' toxicidad de **Rh-PAzo8-S**. La internalización en las células HeLa de **Rh-PAzo8-S**, vía endocitosis, se confirma mediante microscopía confocal. Los procesos de endocitosis dirigen a las nanopartículas a los autolisosomas donde los poliésteres se degrada por la presencia de esterasas, liberando el colorante Rodamina B, que difunde en el citoplasma celular, como se demuestra con microscopía confocal.

Capítulo 5: Procedimiento experimental.

5 Procedimiento experimental.

5.1 Métodos.

5.1.1 Técnicas de caracterización de materiales.

Para caracterizar los materiales desarrollados en la presente tesis doctoral, se utilizan las siguientes técnicas: difracción de rayos X de polvo (PXRD), adsorción-desorción de N₂, resonancia magnética nuclear MAS (RMN-MAS), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía de infrarrojos (IR), análisis elemental y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Difracción de Rayos X.

Esta técnica informa sobre la geometría de la celda unidad, sus dimensiones, el tipo de retículo, el sistema cristalino y los posibles grupos espaciales. Las medidas de rayos X se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker axs D8 Advance, utilizando radiación CuK_α ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) con un programa que posee un intervalo de barrido $0.73^\circ < 2\theta < 10^\circ$, con pasos de contaje de 0.02° (2θ) y con un tiempo de 20s/paso.

Porosimetría: Análisis isotermas de adsorción-desorción de Nitrógeno.

Las isotermas de adsorción-desorción de N₂ (-196°C) permiten obtener el área superficial, el tamaño y volumen de poro. Se midieron en un Micromeritics ASAP2010 del Instituto de Ciencias de los Materiales de la Universidad de Valencia (ICMUV). Antes de su uso las muestras fueron desgasificadas a 120 °C a vacío durante una noche. Las áreas superficiales se calculan a partir de los datos de la isoterma utilizando las ecuaciones del modelo de Brunauer-Emmet-Teller (BET) en el intervalo de bajas presiones relativas ($P/P_0 < 0.3$). El tamaño de poro se determina mediante el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

Resonancia Magnética Nuclear MAS.

RMN de rotación en ángulo mágico, la cual permite obtener los espectros lo más agudos posibles, de muestras sólidas policristalinas, eliminando el ensanchamiento de las señales de RMN que se observan normalmente en sólidos.

Al rotar suficientemente rápido, varios kHz dependiendo del núcleo que se estudie, las interacciones de desplazamiento químico se reducen al mínimo por lo que no contribuyen al ensanchamiento de los picos. Si giramos la muestra alrededor de un eje inclinado a este ángulo mágico con respecto a la dirección del campo magnético, eliminaremos estas fuentes de ensanchamiento y mejoraremos la definición del desplazamiento químico. Los espectros de ^{13}C RMN-MAS se registran en un espectrómetro Varian Unity 300 operando a 128.3 MHz y usando una velocidad de MAS al menos de 4.0 KHz ($v_{\text{rotor}}=4000 \text{ rev/ min}$), con un tiempo de relajación de 60 seg.

Análisis Termogravimétrico.

El análisis termogravimétrico es una técnica que mide la variación de masa en un compuesto en función de la temperatura. Las variaciones de temperatura no siempre implican un cambio en la masa de la muestra; existen sin embargo cambios térmicos que sí se acompañan de un cambio de masa, como la descomposición, la sublimación, la reducción, la desorción, la absorción y la vaporización. Estos cambios pueden ser medidos con el analizador termogravimétrico. Los termogramas para las distintas muestras sólidas se obtuvieron en un equipo TGA/SDTA 851e Metler Toledo. Las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto, desde $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, manteniendo a continuación una isoterma a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora, todo ello en atmósfera de aire y crisoles de alúmina.

Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopía IR estudia la interacción entre la materia y la radiación infrarroja. En el infrarrojo medio, las bandas principales de absorción pueden asignarse a unidades de vibración de una molécula, esto es, unidades que solo dependen en mayor o menor grado del grupo funcional que produce la absorción y no de la estructura completa de la molecular. La espectroscopía IR permite identificar especies químicas a través de la determinación de la frecuencia (número de ondas) a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro IR. Los espectros de IR se registran en un Jasco FT/IR-

460 Plus entre una longitud de onda de 400 y 4000 cm^{-1} (IR medio) diluyendo los sólidos en pastillas de KBr (2 mg de sólido en 100 mg de KBr seco).

Análisis elemental.

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO_2 , H_2O y N_2 , son transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

TEM, es una técnica de microscopía que utiliza un microscopio electrónico de transmisión. Este es un microscopio que usa un haz de electrones para visualizar un objeto, debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. Lo característico de este microscopio es el uso de una muestra ultrafina y que la imagen se obtenga de los electrones que atraviesan la muestra. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión se tomaron en un microscopio Philips CM10 a 100 kV.

5.1.2 Técnicas de caracterización compuestos orgánicos.

Para caracterizar los materiales desarrollados en la presente tesis doctoral, se utilizan las siguientes: resonancia magnética nuclear (RMN), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía de infrarrojos (IR), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C (RMN).

Para detección de especies en disolución, los espectros de RMN- ^1H y los espectros RMN- ^{13}C , fueron obtenidos en un equipo Varian Gemini de 300 MHz, empleando como señal de referencia la del agua deuterada.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Esta técnica se utiliza para determinar el peso molecular de sustancia orgánicas. Se utiliza para ello el cromatógrafo Viscotek 200 usando dos columnas PLgel mixed-D (proviene de Polymer Laboratories (PL)) en serie y utilizando un detector de índice de refracción. Las muestras para SEC son preparadas en THF a temperatura ambiente (1mL/min).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La DSC es una técnica que se utiliza para cuantificar la energía implicada en una transición. Para determinar DSC, se utiliza el aparato Q1000 V9.9 Build 303. Exo Up. Universal V4.5A TA Instruments.

Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z).

5.1.3 Técnicas de análisis.

Espectroscopía UV-visible.

La espectroscopia ultravioleta-visible es una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo. La radiación absorbida por las moléculas desde la región del espectro UV, provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Esta espectroscopía se lleva cabo en un Espectrómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 35 UV/Vis.

Espectroscopía Fluorescente.

La fluorescencia es una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo, disminuyendo los límites de sensibilidad en comparación con la espectroscopía UV. La técnica recoge la relación intensidad de fluorescencia emitida vs concentración de molécula de interés. La fluorescencia es llevada a cabo en un instrumento Felix 32 Analysis Version 1.2 (Build 56) PTI (Photon Technology International).

HPLC de índice de refracción.

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Se utiliza el cromatógrafo Waters Model S10, programa Biocrom, a una frecuencia de 0.6, eluyente agua, columna analítica C18 y detector de índice de refracción Waters 2410.

5.2 Reactivos químicos.

Para la síntesis de materiales se utilizaron los siguientes reactivos: tetraetil ortosilicato (TEOS), bromuro de *n*-cetiltrimetilamonio (CTABr), hidróxido sódico (NaOH), trietilamina (TEAH₃), el derivado organosilano 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoxisilano, la vitamina B₂ o riboflavina, los aniones adenosina-5'-trifosfato (ATP), sulfato sódico (Na₂SO₄), guanosina-5'-monofosfato (GMP) y fosfato sódico (Na₃PO₄), el derivado organosilano 3-aminopropil-trietoxisilano, cloruro de tris(2,2'bipiridil)rutenio(II) hexahidratado ([Ru(bipi)₃]Cl₂·6H₂O), Rodamina B, D-(+)-Lactosa monohidratada, pancreatina de páncreas de cerdo, β-D-galactosidasa de levadura *Kluyveromyces*, esterasa de hígado de cerdo, dimetilsulfoxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF, 99.9%), diclorometano (DCM, 99.8%), carbonato potásico (K₂CO₃), metanol, hidroximetiltriethoxisilano en 50% de etanol, *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) y dimetial aminopiridina (DMAP). Todos los reactivos han sido adquiridos en Sigma-Aldrich. N-(3-trietoxisililpropil)gluconamida es adquirido por ABCR. Los hidrolizados de almidón Glucidex® 47, Glucidex® 39 y Glucidex® 29 son adquiridos en Roquette. D-MEM con L-glutamina, suero bovino fetal (SBF),

solución de azul de tripano (0,4%) grado de cultivo celular, la tripsina, aglutinina de germen de trigo (WGA) Alexa Fluor® 647, DAPI y Hoechst 33342 son proporcionados por Gibco-Invitrogen. El reactivo de proliferación celular WST-1 se obtuvo de Roche Ciencias Aplicadas. Clorhidrato de doxorubicina es proporcionada por Sequoia Research Products Ltd.

5.3 Síntesis de materiales generales.

5.3.1 Síntesis del material inicial MCM-41.

Para la síntesis del soporte inorgánico mesoporoso de tipo MCM-41 microparticulado, empleado en la síntesis de los materiales híbridos de los capítulos 1 y 2, se llevó a cabo siguiendo la ruta de los atranos,²⁴² una técnica preparativa simple basada en el empleo de complejos que incluyen ligandos relacionados con la trietanolamina (en general atranos y concretamente, para los complejos que contienen silicio, silatranos), tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico hidrolítico y surfactantes como especies porógenas. En este caso particular, se emplea bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr) como agente director de la estructura. La relación molar²⁴³ que se aplica para la síntesis de MCM-41 es la siguiente: 7 TEAH₃: 2 TEOS: 0.52 CTABr: 0.5 NaOH: 180 H₂O.

En un vaso de precipitados de 250 mL (completamente seco) se pesan 29.47 g de trietanolamina (TEA, 198 mmol). El vaso de precipitados se pone sobre la placa calefactora con agitación. Entonces se adiciona 0.49g de hidróxido sódico (12mmol), previamente disuelto en 2 mL de agua. Empezamos a calentar y a agitar hasta alcanzar una temperatura de 120°C. Una vez alcanzada ésta detenemos la calefacción. La inercia de la placa hará que suba de temperatura de la mezcla de reacción, aproximadamente hasta unos 140°C. (la TEA tomará un color marrón claro por la oxidación de las aminas). Evitar un sobrecalentamiento excesivo. Dejar enfriar hasta 70°C y añadir 11 mL de Tetraetilortosilicato (TEOS, 49 mmol). Calentar de nuevo hasta 120°C. Volver a detener la calefacción.

²⁴² Cabrera, S.; El Haskouri, J.; Guillem, C.; Latorre, J.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Marcos, M. D.; Amorós, P. *Solid State Sci.* **2000**, 2, 405 -420.

²⁴³ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature*, **1992**, 359, 710-712.

Cuando la temperatura de enfriamiento esté alrededor de 118°C, se adicionan espátula a espátula 4.68g de la sal de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr), evitando que se formen grumos. Cuando la temperatura sea de 70°C se adicionan de 80ml de agua destilada (4.44 mol). El proceso de agitación debe ser muy bueno. Se puede apreciar como en unos minutos empieza a precipitar el sólido. Se deja en agitación toda la noche a temperatura ambiente. El pH de la suspensión resultante está alrededor de 10.3. Filtrar en un embudo Büchner y lavar con agua. Normalmente con estas proporciones se vienen a obtener unos 5 g de MCM-41 mesoestructurada, es decir, con el surfactante en el interior de los poros. Dejar en estufa a 70°C en estufa 12 h aproximadamente.

Para la posterior eliminación de surfactante se procede a la calcinación en crisoles de alúmina en un Horno Muffla, llevándose a cabo una descomposición térmica a elevada temperatura. Para ello se depositan 0.5g de sólido mesoestructurado en un crisol. Se realiza la calcinación mediante el siguiente programa de temperatura: en un primer momento se pasa de una temperatura de 25 a 550°C en un intervalo de tiempo de 3h30min y luego permanece 550°C durante 5h30min.

5.3.2 Síntesis del material inicial nanoparticulado MCM-41.

Para la síntesis del soporte inorgánico mesoporoso de tipo MCM-41 nanoparticulado, empleado en la síntesis de los materiales híbridos de los capítulos 3 y 4, se llevó a cabo siguiendo la síntesis publicada por Lin y colaboradores en 2004.²⁴⁴ En este caso, también se emplea TEOS como precursor inorgánico hidrolítico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr) como surfactante. Las proporciones molares de los reactivos son: 2 TEOS: 0.5 CTABr: 1.25 NaOH: 4761.9 H₂O.

En un vaso de precipitados de 1 L se pesa 2 g (5.48 mmol) de CTABr y se disuelven en 960 mL de agua desionizada. A continuación se adicionan 7 mL de una disolución de NaOH 2M y se ajusta la temperatura de la mezcla a 95 °C bajo

²⁴⁴ Radu, D.R.; Lai, C.-Y.; Jeftinija, K.; Rowe, E.W.; Jeftinija, S.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217.

agitación suave. Luego se añaden 10 mL de TEOS (22.4 mmol) rápidamente, agitando fuertemente. Se observa en este momento la formación de una suspensión blanca. Esta mezcla se deja agitando a 95 °C durante tres horas. El polvo resultante se centrifuga y se lava con agua. Finalmente, el sólido se seca a 70°C. Para preparar el material poroso final (MCM-41), el sólido mesoestructurado se calcina a 550 °C durante 5 h para eliminar el surfactante que ha actuado como agente plantilla.

5.4 Síntesis de materiales por capítulos.

5.4.1 Síntesis materiales capítulo 1.

*Síntesis del sólido **Rf-S**.*

En una síntesis típica, 1.00 g de MCM-41 microparticulada y 0.025 g (0.066 mmol) de vitamina B₂ (Riboflavina) se suspenden en 500 mL de agua, y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. El sólido mesoporoso cargado se filtra a vacío, y se deja secar a temperatura ambiente 36 horas, guardando una parte de ese sólido inicial, **Rf-S**, para análisis posteriores.

*Síntesis del sólido **Rf-N3-S**.*

Ese sólido inicial **Rf-S** se suspende en 40 mL de acetonitrilo, y se le añade un exceso de amina 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamina]propiltrimetoxisilano (**N3**) (4.3 mL, 15.0 mmol), la suspensión se deja agitando durante 5.5 horas a temperatura ambiente, se filtra a vacío y se deja secar durante 12 horas, dando el sólido final **Rf-N3-S**.

5.4.2 Síntesis materiales capítulo 2.

*Síntesis del sólido **Ru-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 microparticulada y 0.6 g de cloruro de (2,2'-bipiridil)rutenio(II) (0.08 mmol) se suspenden en 40 mL de agua desionizada, y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A continuación se filtra, se lava y se seca durante 12 horas a 37°C.

*Síntesis del derivado de lactosa **N1-Lact**.*

Para la síntesis del derivado organosilano **N1-Lact**, una disolución de 3-aminopropiltrióxido (5.85 mL, 25 mmol) en etanol, se añade a una suspensión de lactosa monohidratada (5.4 gr, 15 mmol) en etanol (volumen total 250 mL). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y a continuación se calienta a 60°C durante 30 minutos. Después, se evapora el etanol a presión reducida, dando lugar a un sólido blanco (3, 7.22 g, 13.24 mmol, rendimiento 89 %). RMN-¹H (300 MHz, D₂O): δ 0.46 (t, 2 H, -CH₂-Si-), 1.03 (t, 9 H, CH₃-CH₂-O-Si-), 1.56 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-Si-), 2.77 (t, 2 H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-), 3.34-3.93 (m, 19 H, Lactosa, CH₃-CH₂-O-Si-), 4.29 (d, 1 H, -O-CH-O-) ppm. RMN-¹³C (75 MHz, D₂O): d 10.89 (-CH₂-Si-), 17.52 (CH₃-CH₂-O-Si-), 23.32 (-CH₂-CH₂-Si-), 43.18 (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-), 58.17 (CH₃-CH₂-O-Si-), 61.77 (HO-CH₂-CH-), 69.31 (HO-CH-), 71.72 (HO-CH-), 73.27 (HO-CH-), 76.11 (-O-CH-CH), 79.19 (-O-CH-NH-), 103.68 (-O-CH-O-) ppm. Espectro de masas (M = C₂₁H₄₃NO₁₃Si): 545 (M+1), 461(M-(CH₃-CH₂)₃), 369(M-(CH₃-CH₂-O)₃-Si-CH₂-), 326(M-(CH₃-CH₂-O)₃-Si-CH₂-CH₂-CH₂-NH-), 221 (M-Lactosa), 135 (M-Lactosa-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-).

*Síntesis del sólido **Ru-Lact-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 microparticulada y 0.6 g de cloruro de (2,2'-bipiridil)rutenio(II) (0.08 mmol) se suspenden en 40 mL de agua desionizada, y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A ese sólido inicial **Ru-S** se le añade un exceso del derivado de lactosa **N1-Lact** (1g, 1.8 mmol, en 20 mL de agua desionizada) y la suspensión se deja agitando durante 5.5 horas a temperatura ambiente, se filtra a vacío, se lava con agua hasta eliminar todo el colorante presente en la superficie del sólido y se deja secar a 37°C durante 12 horas, dando el sólido final **Ru-Lact-S**.

*Síntesis del sólido **Ru-Glu-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 microparticulada y 0.6 g (0.08 mmol) de cloruro de (2,2'-bipiridil)rutenio(II) se suspenden en 40 mL de acetonitrilo anhidro y se calienta a 120° en un Dean-Stark con el fin de eliminar el agua

adsorbida por destilación azeotrópica en atmósfera inerte (gas de Ar). Esa suspensión se agita durante 24 horas a temperatura ambiente con el fin de cargar los poros de la MCM-41 con el colorante. A continuación, se añade un exceso del producto comercial N-(3- trietoxisililpropil)gluconamida (50% en etanol, 1.05 mL, 1.31 mmol) a la suspensión y la mezcla se agita durante 5.5 horas a temperatura ambiente. A continuación se filtra a vacío, se lava con acetonitrilo y se deja secar a 40°C durante 12 horas, dando el sólido final naranja (**Ru-Glu-S**).

5.4.3 Síntesis materiales capítulo 3.

*Síntesis de los derivados de almidón (**N1-GLU47**, **N1-GLU39**, **N1-GLU29**).*

La síntesis de los derivados de hidrolizados de almidón **N1-GLU47**, **N1-GLU39** y **N1-GLU29**, se lleva a cabo, siguiendo una reacción similar a la del derivado organosilano **N1-Lact**. Una disolución de 3-aminopropiltri-etoxisilano (5.85 mL, 25 mmol) en etanol, se añade a una suspensión del hidrolizado de almidón correspondiente (Glucidex® 47, Glucidex® 39 y Glucidex® 29) (5.4 gr) en etanol (volumen total 250 mL). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y a continuación se calienta a 60°C durante 30 minutos. Después, se evapora el etanol a presión reducida, dando lugar a un sólido blanco (**N1-GLU47**, 7.32 g; **N1-GLU39**, 7.15 g; **N1-GLU29**, 7.55 g). **N1-GLU47**: RMN-¹H (300 MHz, D₂O): δ 0.42 (t, 2 H, -CH₂-Si-), 1.02 (t, 9 H, CH₃-CH₂-O-Si-), 1.53 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-Si-), 2.74 (t, 2 H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-), 3.20-3.77 (m, n H, Glu47, CH₃-CH₂-O-Si-), 5.13 (d, 1 H, -O-CH-O-) ppm. RMN-¹³C (75 MHz, D₂O): d 9.62 (-CH₂-Si-), 16.65 (CH₃-CH₂-O-Si-), 21.74 (-CH₂-CH₂-Si-), 41.96 (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-), 57.25 (CH₃-CH₂-O-Si-), 61.84 (HO-CH₂-CH-), 72.67-78.11 (HO-CH-), 71.72 (HO-CH-), 73.27 (HO-CH-), 89.57 (-O-CH-CH), 94.84 (-O-CH-NH-), 100.25 (-O-CH-O-) ppm. Los datos de RMN de **N1-GLU39** y **N1-GLU29** son muy similares a los obtenidos para **N1-GLU47**.

*Síntesis de los sólidos **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 nanoparticulada y 0.6 g de cloruro de (2,2'-bipiridil)rutenio(II) (0.08 mmol) se suspenden en 40 mL de agua

desionizada y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A ese sólido inicial **Ru-S** se le añade un exceso del derivado de almidón correspondiente (1 g aproximadamente en 20 mL de agua desionizada) y la suspensión se deja agitando durante 5.5 horas a temperatura ambiente, se filtra a vacío, se lava con agua hasta eliminar todo el colorante presente en la superficie del sólido y se deja secar durante 12 horas a 37°C, dando los sólidos finales: **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**.

*Síntesis del sólido **GLU47-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 nanoparticulada se suspende en 40 mL de agua desionizada más 1 g del derivado del hidrolizado de almidón **N1-GLU47**, bajo atmósfera inerte. La mezcla se deja agitando 5.5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido se filtra a vacío, se lava con agua destilada y se deja secar durante 12 horas a 37°C, dando lugar al sólido final **GLU47-S**.

*Síntesis del sólido **DOX-GLU47-S**.*

En una síntesis típica, 1 g de MCM-41 nanoparticulada y 0.5 g de doxorubicina hidroclicada (0.91 mmol) se suspenden en 40 mL de agua desionizada, y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A esa mezcla de reacción se le añade un exceso del derivado de azúcar, **N1-GLU47** (1 g aproximadamente en 20 mL de agua desionizada) y la suspensión se deja agitando durante 5.5 horas a temperatura ambiente, se filtra a vacío, se lava con agua destilada hasta eliminar todo el citotóxico presente en la superficie del sólido y se deja secar durante 12 horas a 37°C, dando el sólido final **DOX-GLU47-S**.

5.4.4 Síntesis materiales capítulo 4.

*Síntesis de los derivados del poliéster azoico con 6 grupos metileno (**PAzo6**).*

Para la preparación del poliéster, **PAzo6**, se pesan 0.43 g (1.051 mmol) del diol **Azo6** y 0.3 g (1.006 mmol) del diéster adipato de difenilo. Se procede a la fusión de los monómeros a 135°C, vacío y O₂. A continuación se enfría a

temperatura ambiente y se añaden 0.0073 g del catalizador K_2CO_3 . Posteriormente, el reactor se recalienta a 130° C durante dos horas a vacío. A continuación, el reactor se enfría a temperatura ambiente y el poliéster formado se disuelve en tolueno. La disolución del polímero se vertió en un exceso de metanol obteniéndose un sólido naranja que después se filtra y se seca al vacío durante al menos 12 horas a temperatura ambiente.

Síntesis de los derivados del poliéster azóico con 8 grupos metileno (PAzo8).

Para la preparación del poliéster, **PAzo8**, se pesan 0.4065 g (0.99 mmol) del diol **Azo8** y 0.296 g (0.99 mmol) del diéster adipato de difenilo. Se procede a la fusión de los monómeros a 135°C, vacío y O_2 . A continuación se enfría a temperatura ambiente y se añaden 0.0073 g del catalizador K_2CO_3 . Posteriormente, el reactor se recalienta a 130° C durante dos horas a vacío. A continuación, el reactor se enfría a temperatura ambiente y el poliéster formado se disuelve en tolueno. La disolución del polímero se vertió en un exceso de metanol obteniéndose un sólido naranja que después se filtra y se seca al vacío durante al menos 12 horas a temperatura ambiente.

Síntesis del sólido Rh-S.

En una síntesis típica, 0.1 g de MCM-41 nanoparticulada y 0.039 g de Rodamina B (0.08 mmol) se suspenden en 40 mL de agua desionizada, y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A continuación se filtra, se lava y se seca durante 12 horas a 37°C.

Síntesis del sólido Rh-OH-S.

En una síntesis típica, 0.1 g de MCM-41 nanoparticulada y 0.039 g de Rodamina B (0.08 mmol) se suspenden en 40 mL de agua desionizada y se deja 24 horas a temperatura ambiente y agitación, bajo atmósfera inerte. A ese sólido inicial **Rh-S** se le añade un exceso de hidroximetiltrietoxisilano en etanol (0.194 g, 1 mmol) y la suspensión se deja agitando durante 24 horas a temperatura ambiente, se filtra a vacío y se deja secar durante 12 horas a 37°C, dando el sólido finale: **Rh-OH-S**.

Síntesis del sólido Rh-PAzo6-S.

Para la síntesis de **Rh-PAzo6-S**, 0.1 g del polímero **PAzo6** se disuelven en 6 mL de THF, a continuación se añaden DIC (1 μ L) y DMAP (6 μ g). Esa mezcla se añade sobre una suspensión de 0.1 g de **Rh-OH-S** en 40 mL de THF. La mezcla se deja agitando 72 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido se lava 6 veces con 30 mL de THF y 3 veces con 30 mL de DCM. A continuación se filtra a vacío, se lava con abundante agua destilada para eliminar los restos de colorante de la superficie del material y se deja secar durante 12 horas a 37°C.

Síntesis del sólido Rh-PAzo8-S.

Para la síntesis de **Rh-PAzo8-S**, 0.1 g del polímero **PAzo8** se disuelven en 6 mL de THF, a continuación se añaden DIC (1 μ L) y DMAP (6 μ g). Esa mezcla se añade sobre una suspensión de 0.1 g de **Rh-OH-S** en 40 mL de THF. La mezcla se deja agitando 72 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido se lava 6 veces con 30 mL de THF y 3 veces con 30 mL de DCM. A continuación se filtra a vacío, se lava con abundante agua destilada para eliminar los restos de colorante de la superficie del material y se deja secar durante 12 horas a 37°C.

5.5 Ensayos de liberación.**5.5.1 Liberación vitamina B₂ capítulo 1.**

Para determinar la cantidad de Riboflavina liberada, se pesan 30 mg de los sólidos **Rf-S** y **Rf-N3-S** y se suspenden en 25 mL de agua a cierto pH y con ciertos aniones ($C_{anion} = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Se determinará la liberación, recogiendo alícuotas de las suspensiones y filtrándolas con filtros de teflón, cada cierto tiempo, 2mn, 1h, 3h y 5h. Esas muestras serán determinadas con fluorescencia, excitando a 444nm, y dando una banda de fluorescencia centrada en 525 nm.

5.5.2 Liberación del colorante de rutenio capítulo 2.

Para **Ru-Lact-S** y **Ru-Glu-S** se suspenden 10 mg en 25 mL de agua a pH 7.5, y otros 10 mg de **Ru-Lact-S** se suspenderán en 18.74 mL de agua desionizada más 6,25 mL de una disolución conocida de β -D-galactosidasa (100 mg en 25 mL de agua desionizada a pH 7.5). Se determinará la liberación,

recogiendo alícuotas de las suspensiones, y filtrándolas con filtros de teflón, cada cierto tiempo, 2mn, 1h, 2h, 3h, 4h y 5h. Esas muestras serán determinadas con un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, midiendo la fluorescencia del colorante a 610 nm (excitando a 453 nm).

5.5.3 Liberación de carga capítulo 3.

Para **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S**, **Ru-GLU29-S** y **DOX-GLU47-S** se suspenden 10 mg en 25 mL de agua a pH 7.5, y otros 10 mg se suspenden en 18.74 mL de agua desionizada más 6,25 mL de una disolución conocida de pancreatina (100 mg en 25 mL de agua desionizada). Se determinará la liberación, recogiendo alícuotas de las suspensiones, y filtrándolas con filtros de teflón, cada cierto tiempo, 2mn, 1h, 3h, 5h, 7h y 19h. Esas muestras serán determinadas con un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, midiendo la absorbancia del colorante a 453 nm.

5.5.4 Liberación de Rodamina B capítulo 4.

Para **Rh-PAzo6-S** se suspenden 10 mg en 25 mL de agua a pH 8 y 10 mg en 18.75 mL de agua a pH 8 más 6.25 mL de una disolución de esterasa a 1000 ppm. Se determinará la liberación, recogiendo alícuotas de las suspensiones, y filtrándolas con filtros de teflón, cada cierto tiempo, 2mn, 1h, 3h, 5h, 7h, 22h y 24h. Esas muestras serán determinadas midiendo la fluorescencia del colorante a 580 nm, excitando a 554 nm.

Para **Rh-PAzo8-S** se suspenden 10 mg en 25 mL de agua a pH 8, 10 mg se suspenden en 18.75 mL de agua a pH 8 más 6.25 mL de una disolución de esterasa a 100 ppm y otros 10 mg en 18.75 mL de agua a pH 8 más 6.25 mL de una disolución de esterasa a 1000 ppm. Se determinará la liberación, recogiendo alícuotas de las suspensiones, y filtrándolas con filtros de teflón, cada cierto tiempo, 2mn, 1h, 3h, 5h, 7h, 22h y 24h. Esas muestras serán determinadas midiendo la fluorescencia del colorante a 580 nm, excitando a 554 nm.

5.6 Ensayos en células.

5.6.1 Condiciones cultivo celular.

Las líneas celulares HeLa, MCF-7 y LLC-PK1 son adquiridas al Centro Alemán de recursos para material biológico (DSMZ) y se cultivaron en D-MEM en caso de las HeLa y MCF-7 suplementando con un 10% de suero bovino fetal (SBF) o en el caso de LLC-PK1 con medio 199 suplementado con un 6% de SBF, respectivamente. Las células se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% y 95% de aire y se doblaron dos veces por semana. Las células fueron transfectadas con el plásmido eGFP-C1 que contiene el gen de rata del marcador de autolisosomas correspondiente a la cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 (LC3-I) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP), LC3-eGFP. Este plásmido fue proporcionado por el Profesor G. Kroemer (INSERM, Francia). Para realizar la transfección se utilizó Lipofectamina (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante.

5.6.2 Medidas de viabilidad celular.

Las medidas de viabilidad celular se llevan a cabo con un Wallac 1420 workstation. Se realizaron ensayos de viabilidad tipo WST-1 (reactivo de proliferación celular), donde el reactivo es empleado para determinar la posible toxicidad de las nanopartículas **Ru-GLU47-S** y **Rh-PAzo8-S** en células.

Las células se cultivaron en placas de 96-pocillos y de microtitulación a una densidad de siembra de 2.5×10^3 , 4×10^3 y 8×10^3 células/pocillo para HeLa, LLC-PK1 y MCF-7, respectivamente. Tras 24 h, las nanopartículas **Ru-GLU47-S** en DMSO se añadieron a las células a una concentración final de 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las nanopartículas **Rh-PAzo8-S** en DMSO se añadieron a las células a una concentración final de 200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 23 h, WST-1²⁴⁵ (10 μL de 5 mg/mL) se añadió a cada pocillo. Las células fueron incubadas durante 1 h (se estudia un total de 24 h de incubación) y la absorbancia se midió a 450 nm.

²⁴⁵ Fisichella, M.; Dabboue, H.; Bhattacharyya, S.; Saboungi, M.L.; Salvetat, J.P.; Hevor, T.; Guerin, M. *Tox. In vitro*, **2009**, 23, 697-703.

5.6.3 Internalización celular.

Los estudios de internalización celular se realizaron con un microscopio confocal Leica, manejado con un sistema de Service Pack 2 de TCS, equipado con un divisor de haz acústico óptico (AOBS).

Las células HeLa, LLC-PK1 y MCF-7 son sembradas en cubreobjetos de 24 mm Φ de vidrio en placas de seis pocillos a una densidad de siembra de 10^5 células/pocillo. Tras 24 horas, las células se tratan a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas las células o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células HeLa tratadas con **Rh-PAzo8-S**. 20 minutos más tarde, se retiró el medio para eliminar los sólidos. Después de 15 h de incubación, las células se tiñen con Hoechst 33342 de concentración 10 nanomolar y 5 mg/mL de aglutinina de germen de trigo (WGA), Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 647 durante 30 minutos en PBS con SBF al 10% o mantener el medio en el caso de tratamientos con **DOX-GLU47-S**. Los cubreobjetos se visualizan con un microscopio confocal.

5.6.4 Estudios de citometría de flujo empleando **DOX-GLU47-S**.

Los estudios *in vivo* de internalización celular se realizan con un citómetro FC 500 (Beckman Coulter Inc.). Para desarrollar los estudios de citometría de flujo, HeLa son sembradas con 50×10^3 células/pocillo en una placa de doce pocillos. Después de 24h, las células fueron tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **DOX-GLU47-S** durante 20 minutos antes de eliminar el medio de cultivo por medio nuevo. Las células fueron incubadas durante 15h antes de fijar con etanol al 80%, manteniéndolos a -20°C durante 24h. Por último, las células fueron teñidas con DAPI de concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se llevaron a cabo estudios de ciclo celular para determinar la viabilidad de las células.

Conclusiones generales y perspectivas.

Conclusiones generales y perspectivas.

En la presente tesis doctoral se han desarrollado una serie de nanodispositivos capaces de liberar controladamente diferentes moléculas, ya sean vitaminas, colorantes o citotóxicos, gracias a la presencia de un estímulo externo.

En el primer capítulo se ha desarrollado un sólido **Rf-N3-S**, que consiste en MCM-41 cargada en el interior de los poros con vitamina B₂ o riboflavina y agrupaciones poliaminicas ancladas en la superficie externa. Con este material se puede controlar la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina mediante cambios en el pH del medio y también añadiendo un anión adecuado.

En medio ácido los grupos amino se protonan apareciendo repulsiones electrostáticas. Las aminas adoptan una conformación rígida con lo que se produce un bloqueo de los poros ('puerta' cerrada) y la inhibición de la liberación de la vitamina B₂ o riboflavina. A pH neutro los grupos amino están desprotonados observándose una liberación de la carga ('puerta' abierta). Con este método de liberación controlada de vitamina B₂ o riboflavina, se podrá conseguir que gran parte de las vitaminas que necesitamos en nuestro cuerpo, y que perdemos en el estómago, debido al medio ácido, lleguen al intestino y allí sean absorbidas y puedan incorporarse al metabolismo celular.

En el segundo capítulo se ha preparado el sólido **Ru-Lact-S** que consiste en una estructura mesoporosa MCM-41 conteniendo un derivado de lactosa anclado en la superficie externa y un complejo de rutenio ocluido en el interior de los poros. Gracias a la presencia específica de la enzima intestinal β -D-galactosidasa es posible controlar la liberación del complejo debido a la hidrólisis de la lactosa. Se ha demostrado la especificidad de la enzima β -D-galactosidasa comparándola con diferentes enzimas presentes en el aparato digestivo (amilasas del páncreas y las pepsinas del estómago). Al igual que ocurría en el caso anterior, este dispositivo puede ser aplicado en procesos de liberación controlada

en el intestino, protegiendo así la carga en el interior de los poros, de las condiciones ácidas del estómago.

En el tercer capítulo se ha demostrado que el anclado de derivados de almidón en la superficie de nanopartículas de sílice mesoporosas da lugar a la preparación de los materiales híbridos funcionalizados con una 'puerta nanoscópica molecular' **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** y **Ru-GLU29-S**. Estos materiales híbridos son capaces de liberar, de forma controlada, un complejo coloreado empleando específicamente la enzima pancreatina (conteniendo enzimas amilasas). Los ensayos de viabilidad en las células tumorales HeLa y las células no tumorales LLC-PK1, tratadas con **Ru-GLU47-S**, demuestran la 'no' toxicidad del mismo. La internalización en las células HeLa de **Ru-GLU47-S**, vía endocitosis, se confirma mediante microscopía confocal. Los procesos de endocitosis dirigen a las nanopartículas a la degradación del almidón por la presencia de amilasas lisosomales.

También se estudia el material **DOX-GLU47-S**, nanopartículas de sílice mesoporosas MCM-41 funcionalizadas en el exterior de los poros con un derivado de almidón y cargadas en el interior con un citotóxico, doxorubicina, capaz de inducir la muerte de células cancerosas. La viabilidad de células cancerosas HeLa con **DOX-GLU47-S** disminuye, debido a la hidrólisis del almidón y posterior liberación del citotóxico.

En el último capítulo se han sintetizado dos poliésteres azoicos **PAzo6** y **PAzo8**, capaces de funcionalizarse en la superficie de materiales de sílice y bloquear la salida de los poros, actuando como 'puerta nanoscópica molecular'.

Se han desarrollado dos materiales híbridos **Rh-PAzo6-S** y **Rh-PAzo8-S** capaces de liberar, de forma controlada un colorante, Rodamina B, empleando específicamente la enzima esterasa. Los sólidos sintetizados consisten en una estructura mesoporosa MCM-41 nanoparticulada que contiene poliésteres con grupos azoicos anclados en la superficie externa y colorante Rodamina B ocluido en el interior de los poros. Con estos materiales se puede controlar la liberación del colorante gracias a la presencia de esterasa, observándose una liberación

cercana a 0 en ausencia de esterasa, debido al impedimento estérico de los poliésteres funcionalizados en la superficie del material. En presencia de la enzima esterasa se observa una liberación casi completa del colorante, debido a la hidrólisis de los enlaces éster que forman los poliésteres.

Se estudia la liberación intracelular del sólido **Rh-PAzo8-S**. Se utilizan las células tumorales de cuello de útero HeLa y las células de cáncer de mama MCF-7 para los ensayos de viabilidad, demostrando la 'no' toxicidad de **Rh-PAzo8-S**. La internalización en las células HeLa de **Rh-PAzo8-S**, vía endocitosis, se confirma mediante microscopía confocal. Los procesos de endocitosis dirigen a las nanopartículas a los lisosomas donde los poliésteres se degrada por la presencia de esterasas, liberando el colorante Rodamina B, que difunde en el citoplasma celular, como se demuestra con microscopía confocal.

La presente tesis doctoral, basa su estudio en la búsqueda de dispositivos capaces de liberar moléculas bioactivas de manera controlada, ya sea en el sistema digestivo o en líneas celulares. Por ese motivo, ahora se puede pensar en dirigir el trabajo en la aplicación real de todos estos dispositivos. Un trabajo inicial, podría ser la optimización de las condiciones de carga y funcionalización pensando en las necesidades reales de cada molécula bioactiva por parte del ser humano. Posteriormente se deberá aplicar esos materiales en estudios iniciales en líneas celulares y, a continuación, en campos más específicos como son la bioquímica, la tecnología de alimentos o incluso la nanomedicina.

General conclusions and perspectives.

General conclusions and perspectives.

In this thesis we have developed some nanodevices for molecules controlled release, like vitamins dyes, or cytotoxic, due to the presence of an external stimulus.

In the first chapter, we have developed **Rf-N3-S** solid. This solid consists of MCM-41 loaded with vitamin B₂ or riboflavin inside the pores and polyamine groups anchored on the outer surface. This material controls the vitamin B₂ or riboflavin release by pH-changes of the medium and by addition of a suitable anion.

With acidic pH, amino groups are protonated, appearing electrostatic repulsion. The amines adopt a rigid conformation so that there is a blockage of the pores ('closed gate') and an inhibition of vitamin B₂ or riboflavin release. At neutral pH, amino groups are deprotonated and we cargo release ('open gate') can be observed. This method of vitamin B₂ or riboflavin controlled release can ensure that much of the vitamins necessary for ours bodies, will reach the intesines where will be absorbed and incorporated ito cellular metabolism. Otherwise, vitamins are lost in the stomach due to the acidic environment of the medium in there.

In the second chapter, solid **Ru-Lact-S** has been prepared, being a mesoporous MCM-41 structure with a lactose derivative anchored on the outer surface and a ruthenium complex entrapped inside the pores. The specific presence of the intestinal enzyme β -D-galactosidase controls the complex release due to hydrolysis of the lactose. The specificity of the β -D-galactosidase enzyme compared with different enzymes in the digestive tract (pancreatic amylase and pepsin in the stomach) has been demonstrated. As was the case above, this device can be applied in controlled release processes in the intestine, as the load inside the pores is protected of stomach acid conditions.

In the third chapter it has been shown that starch derivatives anchored on the surface of mesoporous silica nanoparticles leads to the preparation of functionalized hybrid materials with 'molecular gates' named **Ru-GLU47-S**, **Ru-GLU39-S** and **Ru-GLU29-S**. These hybrid materials are capable of releasing a

coloured complex in a controlled manner specifically using the enzyme pancreatin (containing amylase enzymes). Cell viability assays in tumoral cells, HeLa and nontumoral cells, LLC-PK1, treated with **Ru-GLU47-S** show the 'non' toxicity of the nanoparticles. Internalization of **Ru-GLU47-S** in HeLa cells, via endocytosis, is confirmed by confocal microscopy. Endocytosis processes lead the nanoparticles to autolysosomes where the starch is degraded by the presence of amylase enzymes.

We also study the material **DOX-GLU47-S**, being nanoparticles of MCM-41 mesoporous silica, functionalized on the outside of the pores with a starch derivative, and loaded inside with a cytotoxic drug, doxorubicin, which can induce cancer cell death. The viability of HeLa cancer cells with **DOX-GLU47-S** decreases due to hydrolysis of starch and subsequent release of cytotoxic agent.

In the last chapter, two azo-polyesters **PAzo8** and **PAzo6** are synthesized and functionalized on the surface of silica materials and blocking the exit of the pores, so acting as 'molecular gate'.

Two hybrid materials **Rh-PAzo6-S** and **Rh-PAzo8-S** have been developed, being able to release Rhodamine B dye in a controlled manner by using esterase enzyme. The solids consist of nanoparticulated MCM-41 mesoporous silica structure, containing polyesters with azo groups anchored on the outer surface and Rhodamine B dye occluded within the pores. These materials can control the release of dye due to the presence of esterase. The release was observed nearly zero in the absence of esterase, due to steric hindrance of the polyesters functionalized on the surface of the material. In presence of esterase enzyme, the solid shows an almost complete dye release, due to hydrolysis of ester bonds forming polyesters.

The intracellular release of **Rh-PAzo8-S** is also studied. Both HeLa and MCF-7 cancer cells are used for feasibility testing, demonstrating the 'non' toxicity of **Rh-PAzo8-S**. Internalization in HeLa cells of **Rh-PAzo8-S**, via endocytosis, is confirmed by confocal microscopy. Endocytosis processes lead the nanoparticles to lysosomes where polyesters are degraded by the presence of esterases,

releasing the dye Rhodamine B, which diffuses into the cell cytoplasm, as demonstrated by confocal microscopy.

The thesis bases her study on the search for devices capable of releasing bioactive molecules in a controlled manner, either in the digestive system or cell lines. For this reason, this work can be targeted to real application of these devices. Bearing this mind and as a preliminary task, loading and functionalization conditions could be optimize considering the real needs of each bioactive molecule in the human body. Later these materials should be used in cell lines initial studies and then be applied in more specific fields such as biochemistry, food technology or nanomedicine.