



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE  
MESOPOROSA PARA EL TRATAMIENTO  
DE LA INFECCIÓN BACTERIANA**

Autor: Alejandro Parralejo Jiménez

Tutora: Isabel Izquierdo Barba / Montserrat Colilla Nieto

Convocatoria: JULIO

### Resumen:

Las enfermedades infecciosas, que parecían superadas desde que llegaron las primeras penicilinas y las nuevas líneas de antibióticos, vuelven a posicionarse como una de las prioridades de investigación del mundo farmacéutico. Tras la aparición de los primeros antibióticos y derivados de éstos, las siguientes generaciones de penicilinas, cefalosporinas, macrólidos etc., parecía que las infecciones bacterianas estaban controladas farmacológicamente. Sin embargo, un mal uso de dichos antibióticos, tanto en la prescripción como en la administración de dichos medicamentos, han dado pie a la generación de resistencias en los organismos que había que eliminar: las bacterias. Se sigue investigando mucho en nuevas moléculas y en nuevas formas de dosificar las que ya tenemos, para intentar revertir o al menos frenar los problemas que pueden derivar de dichas resistencias. Sin embargo, con los recursos y la tecnología de que disponemos hoy, no debemos cerrarnos a nuevos horizontes y nuevas soluciones a problemas en los estamos estancados. Surge una posibilidad para la nanotecnología, y en particular para las nanopartículas de sílice mesoporosa, que, como veremos, permitirían una nueva forma de administración de antibióticos más eficaz que las formas convencionales, por su eficiencia a la hora de vehiculizar el tratamiento y por sus posibilidades en la formulación del mismo. Además, sería una herramienta particularmente útil para tratar las infecciones derivadas de implantes, hoy tan comunes; infecciones muy localizadas y difíciles de tratar por una de las resistencias más complejas que desarrollan las bacterias: una barrera física que denominamos biofilm.

### Abstract:

*The infectious diseases, which seemed to have been overcome since the first penicillin and the new antibiotic lines arrived, come back up today positioning themselves as one of the research priorities of the pharmaceutical world. After the appearance of the first antibiotics and derivatives of these species, generations of penicillins, cephalosporins, macrolides, etc. it seemed that bacterial infections were pharmacologically controlled. However, a bad use of antibiotics in the prescription and in the administration, has given the chance to resistant generations of the organisms that had to be eliminated: bacteria.*

*Healthcare is still investigating new molecules and new ways to dose the ones we already have, to try to reverse or, at least stop the problems that may derive from these resistances. However, with the resources and technology available to us today, we must not close ourselves to new horizons and new solutions to problems in which we are stuck. Surge in this case a possibility for nanotechnology and, in particular for mesoporous silica nanoparticles which, as we will review, might allow a new form of administration of antibiotics, more effective than conventional forms, for its efficiency when it comes to a targeting treatment.*

*In addition, it would be an especially useful tool to treat infections derived from implants. Infections very localized and difficult to treat because one of the resistances that bacteria develop: a physical barrier that we call biofilm.*

### *1. Introducción y antecedentes:*

Las enfermedades infecciosas son consecuencia de proliferaciones en el huésped de colonias de bacterias patógenas y fueron la principal causa de mortalidad hasta el siglo XVIII.

Desde el siglo XIX tras el descubrimiento del primer antibiótico en 1928 (del griego: anti significa contra, y bios, vida) por parte de Alexander Fleming: la penicilina, las enfermedades infecciosas parecían estar controladas con investigación y desarrollo de nuevas terapias antibióticas. Sin embargo, un mal uso reiterado de las terapias antibióticas tradicionales ha generado cepas de bacterias resistentes e incluso multirresistentes a algunas de las familias de antibióticos que más se utilizan hoy en día, siendo muy difíciles de tratar.

Frente a estos problemas, a lo largo del siglo XX la nanotecnología se ha abierto camino, como solución para algunos tratamientos farmacológicos. El descubrimiento de los fullerenos en 1985 por Harry Kroto, Richard Smalley, y Robert Curl que valió un premio nobel, supuso un antes y un después en la investigación nanotecnológica. Y en aras de buscar soluciones sanitarias para patologías de compleja resolución, se empezaron a desarrollar las primeras nanopartículas farmacéuticas (cargadas con fármacos), siendo el Doxil en 1995 el primer fármaco liposomal aprobado por la FDA.

En esta revisión nos centraremos en el problema de las resistencias a antibióticos (incidiendo en el biofilm) y buscaremos soluciones en la nanotecnología, una disciplina

que permite augurar un notable éxito en este tipo de tratamientos, haciendo hincapié en las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs).

## 2. Objetivos

El objetivo de esta revisión es analizar la nanotecnología, y en concreto las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs), como alternativa a los tratamientos tradicionales en infecciones bacterianas con presencia de biofilm, por su gran capacidad de targeting y por sus posibilidades en la liberación de fármacos estímulo-respuesta.

## 3. Material y Métodos:

Para alcanzar los objetivos propuestos en la presente memoria, el método de búsqueda bibliográfica empleado para la obtención de información de documentos válidos y relevantes ha sido a través de diferentes bases de datos: PubMed, OMS, Google Académico, Scencedirect, RSC, Elsevier.

La búsqueda se realizó en inglés y castellano, introduciendo los siguientes términos: “Nanocarriers”, “Targeting”, “Nanocarriers drug delivery”, “Nanoparticles”, “Silica nanoparticles”, “Biofilm”, “Nanovehículos y fármacos”, “Nanopartículas”, “Mesoporous silica”, “Nanoantibiotics”, “Infection”. De las publicaciones revisadas y seleccionadas, se han incluido también varias referencias que correspondían con fuentes primarias relevantes y artículos de revistas.

Criterios de inclusión y exclusión de las publicaciones:

- Criterios de inclusión: abstract disponible y/o texto completo disponible, lengua española o inglesa, fecha de publicación en los últimos 15 años.
- Criterios de exclusión: abstract no disponible, revisiones previas a los últimos 15 años.

## 4. Resultados y discusión:

### 4-1. Resistencias a antibióticos:

Podríamos definir los antibióticos como medicamentos que mediante diferentes mecanismos de acción tratan o previenen infecciones bacterianas.

Definimos a su vez las resistencias como las capacidades que surgen en determinadas bacterias, que por mutaciones o por ADN adquirido les hacen frente y en algunos casos eliminar los antibióticos con los que se las trata. Estas resistencias se pueden presentar de múltiples formas. Hay algunas resistencias, que por modificaciones en la pared de la bacteria hacen inviable la entrada del antibiótico en el interior celular del microorganismo, y por tanto lo hacen resistente. Por otra parte, algunas bacterias poseen ADN que codifica para unas determinadas enzimas capaces de hidrolizar e inactivar la molécula antibiótica. Y otro tipo de resistencia más colectiva, sería el biofilm. Una barrera creada por secreciones de colonias bacterianas, en la que queda atrapado el antibiótico sin poder acceder a las bacterias que están detrás de dicha barrera.

Las bacterias resistentes suponen sin duda un gran peligro para la salud pública, y representan un reto en investigación para poder hacerlas frente. Sin embargo, debemos preguntarnos entonces a qué se debe el auge de dichas resistencias, y en qué punto estamos para poder solucionar o al menos actuar de la mejor manera posible frente al problema.

La respuesta contempla distintos apartados, pero probablemente el más importante, o al menos el que mejor podríamos reconducir, es el mal uso de los antibióticos, así como un control poco exhaustivo de los mismos durante todo el proceso de tratamiento.

Debemos tener en mente que el tratamiento de las enfermedades infecciosas difiere de otros muchos tratamientos farmacológicos en que no estamos tratando receptores, o células del huésped invariables, sino que estamos tratando organismos que pueden mutar y que pueden adquirir ADN horizontalmente, lo que como más adelante veremos acrecienta aún más el problema, porque acelera la creación de resistencias.<sup>1</sup>

Existen como avanzamos al principio diversos mecanismos para ser resistente al antibiótico:

- Bacterias capaces de expulsar de su interior celular la molécula antibiótica.
- Bacterias capaces de impedir la entrada a su interior celular de la molécula antibiótica.
- Bacterias capaces de sintetizar enzimas que hidrolicen o bloqueen covalentemente la molécula antibiótica.
- Bacterias resistentes por tener un metabolismo disminuido

- Bacterias capaces de producir una inhibición competitiva del antibiótico (Ej: Síntesis de ácido para amino benzoico como competidor de las sulfonamidas).
- Bacterias con ADN que codifica para una versión alterada del sustrato de la molécula antibiótica.<sup>1</sup>

Todos estos mecanismos confieren por distintas vías capacidades a las bacterias para ser resistentes a distintos tipos de antibióticos. Incluso existen bacterias multi-resistentes, para las cuales son necesarios en su tratamiento antibióticos muy específicos y de escaso uso.

Estas bacterias resistentes, que como explicamos al inicio tienen un origen genético, ven favorecida su proliferación cuando se hace un mal uso de los antibióticos, creando una pseudo selección natural en la cual, si no se hace un diagnóstico y un tratamiento rigurosos, las porciones bacterianas resistentes de la infección derivarán en transmisiones verticales u horizontales de su ADN a otras bacterias, aumentando el número de microorganismos resistentes.

Podemos, para ejemplificar el modelo, centrarnos en un paciente al cual se le ha diagnosticado de forma correcta clínicamente una infección respiratoria común, y se le recetan antibióticos de amplio espectro para combatirla. El paciente cumple rigurosamente la posología hasta el cuarto día y viendo que los síntomas remiten, y que se encuentra de nuevo bien físicamente, deja de tomar los antibióticos pese a tenerlos pautados diez días.

En este caso, podemos ver varios momentos en los que se pueden generar resistencias: En primer lugar, cuando utilizamos antibióticos de amplio espectro para tratar infecciones en las cuales desconocemos la bacteria exacta causante y la sensibilidad específica de la misma a los antibióticos, estamos tratando de eliminar a una infección que probablemente tenga bacterias a las cuales no le afecte ese antibiótico. Y, por tanto, al final del tratamiento, aunque eliminemos la mayoría de la infección, nos quedará un residuo de bacterias resistentes a ese antibiótico aunque no presenten manifestaciones clínicas.

En segundo lugar, y siendo probablemente el problema más frecuente, existen los casos en los cuales los ciclos de medicación no se cumplen en su totalidad. Y en estos casos, tenemos muchas probabilidades de dejar alguna población de bacterias que haya

sobrevivido al tratamiento en el organismo del huésped. Esto significa que, en mayor o menor grado, estas poblaciones son más resistentes que las que han sido erradicadas con una dosis inferior a la pauta de antibiótico. Por tanto, quedarán latentes en el huésped colonias, quizá sin manifestaciones clínicas, pero con un mayor grado de resistencia que las iniciales. Pudiéndose reavivar en el huésped o dispersar a otros.

Debemos hacer énfasis, para entender bien las resistencias bacterianas y su importancia, en lo complicado y costoso que resulta el tratamiento para una infección producida por bacterias resistentes a los principales antibióticos. En personas mayores, o en personas con el sistema inmune comprometido, tratar este tipo de infecciones resulta particularmente difícil. De hecho, existen infecciones hospitalarias por bacterias resistentes que causan cada vez más muertes en estas poblaciones de riesgo.

Y es que, paradójicamente, los microorganismos resistentes serán un reto cada vez más importante y a la vez más difícil de combatir. Porque además de los problemas que existen sobre el mal uso de los antibióticos, las formulaciones farmacéuticas que utilizamos hoy en día no permiten una vehiculización (targeting) adecuada de las moléculas antibióticas activas. Esto provoca que dichas moléculas no consigan acceder en suficiente concentración a las zonas de acción, y en ciertos casos solo consigan destruir a las bacterias más frágiles; potenciando de nuevo las resistencias.<sup>1,2</sup>

#### 4-2. Biofilm:

Precisamente, esa falta de targeting que deriva en una menor eficacia del tratamiento es algo particularmente grave en los tratamientos de ciertas infecciones donde suele operar una de las resistencias a antibióticos más compleja: Los biofilms.

Podríamos definirlos como una barrera mecánica que surge por la secreción de material orgánico de un conjunto agrupado de bacterias.<sup>2</sup>

Para explicar mejor los pasos y por qué estos biofilms suponen una resistencia a los antibióticos, vamos a tratar de exponer las fases de implantación del biofilm. (Figura 1). En primer lugar, y trabajando con la hipótesis de un implante de cadera, la primera fase consistiría en la formación de la "capa acondicionadora" sobre dicho implante, formada por proteínas (sanguíneas o de algún otro tejido) del propio paciente.

Una vez formada esta primera capa, la segunda fase sería la adhesión inicial a esta por parte de algunas bacterias, atraídas y pegadas a esta capa acondicionadora, por fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, y por fuerzas de London y de dispersión.<sup>2</sup>

Posterior a esto, el número de bacterias adheridas a la primera capa aumenta y se hace irreversible. Es entonces cuando se ponen en marcha mecanismos de comunicación entre las bacterias adheridas, mecanismos que conocemos bajo el nombre de *quórum sensing*. Y es ahí cuando se empieza a formar una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), gracias a que a través de la comunicación inter bacteriana (*quórum sensing*) los microorganismos han sido capaces de activar la expresión de los genes que codifican para la síntesis de dichos polímeros. En cuarto lugar, podríamos mencionar la fase de crecimiento, en la cual el proceso descrito hasta ahora se repetiría, y permitir el crecimiento del biofilm. Y finalmente, la última etapa sería un equilibrio entre creación del biofilm y desprendimiento de algunas partes del mismo. Estos pedazos de biofilm desprendidos, viajan a través del medio hacia otras capas primarias o capas acondicionadores presentes en el organismo para adherirse a ellas y seguir el proceso.<sup>6</sup>

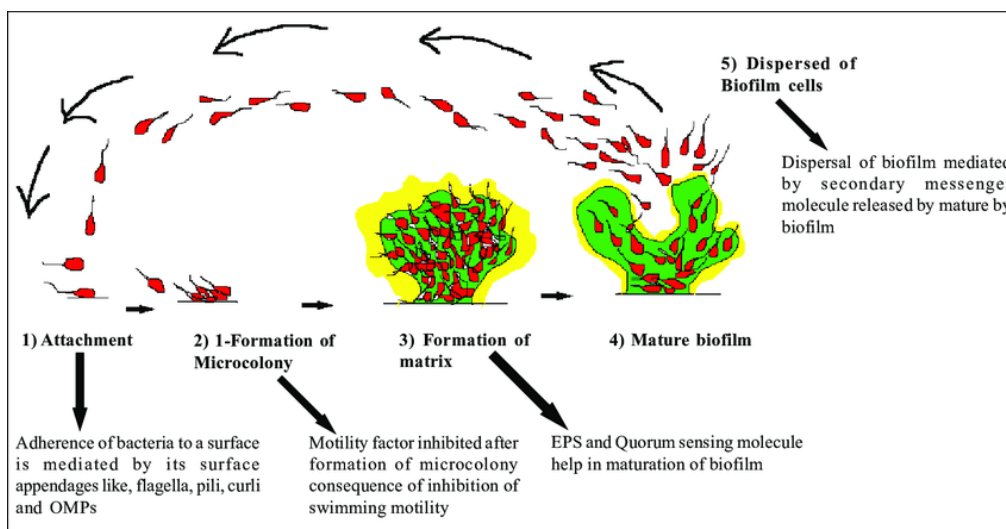


Figura 1: Etapas del Biofilm

Todo esto genera una infección local con posibilidad de diseminación, que supone una barrera mecánica para los tratamientos antibióticos tradicionales. Además, es una infección en la cual el número de bacterias causantes es muy elevado, lo que dificulta aún más su tratamiento. Y finalmente, el biofilm es un caldo de cultivo de transferencia de resistencias horizontalmente con la ayuda del *quórum sensing*.<sup>1,3</sup>



Algunas de las características de la matriz polimérica, podrían ser las siguientes:

- La matriz se compone fundamentalmente de polisacáridos y de proteínas, pero también puede contener DNA.
- La matriz acumula también sustancias del entorno que la rodea, como minerales, proteínas sanguíneas etc.
- La matriz tiene una estructura en la cual hay poros y canales de un diámetro considerable.<sup>3</sup>

Los tratamientos antiinfecciosos en estos casos no son fáciles por diferentes circunstancias. En primer lugar, las moléculas antibióticas administradas de forma sistémica por vías tradicionales no consiguen atravesar la barrera que supone el biofilm, quedándose gran parte de la concentración, atrapada en la matriz polimérica. Además, las bacterias contenidas en el biofilm, como hemos mencionado antes, pueden desarrollar más fácilmente resistencias, y hacer frente con mayor facilidad al tratamiento antibiótico. Casos muy estudiados como los de las ciertas bacterias del género *Pseudomonas*, demuestran la importancia de los biofilms en las resistencias y en la dificultad del tratamiento.<sup>4</sup>

#### 4-3. Nanotecnología:

Como vemos, las resistencias a antibióticos son diversas, y abordar los tratamientos de infecciones causadas por bacterias resistentes es una tarea compleja. Aún más en casos como las infecciones en implantes, dónde el biofilm supone un reto aún mayor. Por este motivo, hablaremos ahora de una alternativa terapéutica para solventar de manera mas eficaz este tipo de tratamientos: la nanotecnología.

Debemos saber que existen muchos tipos de nanopartículas para el tratamiento de enfermedades, y aunque nosotros nos centraremos en las nano partículas de sílice mesoporosa, enumeraremos y describiremos brevemente otras alternativas. Sin embargo, todas giran en torno a las mismas hipótesis y a la resolución de los mismos problemas. Los tratamientos con nanopartículas en su conjunto pretenden mejorar el targeting y ofrecer una vehiculización del tratamiento mucho más precisa, accediendo únicamente a las células que deseamos. En el caso de las infecciones, parece evidente que querríamos restringir la llegada de antibióticos únicamente a las bacterias, o en el

caso de que sean intracelulares, a las células que las hospedan. Sin embargo, hay muchas otras patologías, donde el tratamiento sería mucho más eficaz, con una vehiculización más precisa, como por ejemplo las terapias anticancerígenas. De hecho, existen a día de hoy ensayos y experimentos con nanopartículas para tratar de forma selectiva a las células cancerígenas que expresen un determinado marcador y disminuir así los efectos secundarios del tratamiento, aumentando la efectividad y disminuyendo la toxicidad.<sup>5</sup>

Otra de las características comunes de las nanopartículas es que permiten un tratamiento con diferentes líneas de acción. En contraposición a los antibióticos tradicionales, en los que las moléculas que componen la formulación solamente desarrollan uno o dos mecanismos (Ej. amoxicilina y clavulánico), en los tratamientos con nanopartículas podemos incorporar múltiples y simultáneos mecanismos de acción, formulando el contenido de las partículas con múltiples moléculas con distinto origen. Esto supondría, por ejemplo, poder incorporar en un mismo tratamiento desde óxido nítrico hasta múltiples compuestos metálicos antibacterianos (compuestos con plata, cobre, titanio, zinc, magnesio...). Y también múltiples agentes antimicrobianos con distintos mecanismos de actuación (macrólidos, betalactámicos, fluoroquinolonas etc.).<sup>6,7</sup>

Todo esto hace que los tratamientos con nanopartículas en infecciones puedan ser más eficaces en todos los sentidos: más precisos en el lugar de acción, y más letales a la hora de eliminar las bacterias y por lo tanto la infección.

Como avanzábamos, existen distintos tipos de nanopartículas. Algunas de origen orgánico y otras de origen inorgánico; aquí un listado de algunas de ellas:<sup>6,7</sup>

- Liposomas:

Los liposomas son esferas de naturaleza lipídica con un diámetro que puede ir desde 20 nm hasta algunos micrómetros. Su exterior está formado por una bicapa biomolecular de lípidos (pudiendo variar el número de capas: MLVs, LUVs etc.) imitando la membrana celular, y conteniendo en el interior un espacio acuoso. Entre sus principales ventajas podemos destacar que, al estar hecho por productos de origen orgánico, no tóxico, no inmunogénico y biodegradable, son muy aptas para el uso sanitario. Además, pueden contener tanto drogas hidrofílicas como hidrofóbicas, o incluso una mezcla de ambas. Y podemos, a la hora de sintetizar estos liposomas, variar la naturaleza lipídica

de su composición, para hacerle variar su comportamiento frente a un pH o una temperatura determinada. Resultan particularmente útiles en infecciones hepáticas e infecciones en el bazo.<sup>8,9</sup>

- Nanopartículas sólido-lípido (SLNs):

Las nano partículas sólido-lípido pueden ser consideradas como un híbrido entre las nano partículas poliméricas y los liposomas. A diferencia de estos últimos, las nano partículas sólido-lípido no tienen una estructura bifásica, están constituidas por un Core sólido-lípido estabilizado por surfactantes; lo que les confiere, una ventaja frente a los liposomas: estabilidad a largo plazo.<sup>8,9</sup>

- Nanopartículas poliméricas:

Las nanopartículas poliméricas son partículas sólidas hechas a partir de una matriz polimérica (nanoesferas), o de una coraza polimérica (nanocápsulas). Su tamaño puede oscilar entre los 10 y los 1000 nm (siendo las medidas más comunes las comprendidas entre 50 y 350nm), y el origen de los polímeros que se utilizan para su construcción puede ser tanto natural (albúmina, colágeno, gelatina Etc..) como sintético (PLA, PLGA Etc..).<sup>8</sup>

- Dendrímeros:

Son macromoléculas definidas, que presentan una estructura altamente ramificada formada por un núcleo y múltiples ramas. Su estructura molecular les permite cargar diferentes agentes activos.<sup>8,9</sup>

- Nano tubos de carbono:

Se trata de monocapas de grafeno enrolladas en forma de cilindros. Presentan una elevada superficie específica que permite anclar una amplia variedad de moléculas terapéuticas.<sup>7</sup>

- MSNs: las estudiaremos en profundidad más adelante.

Debemos recalcar que todas estas nanopartículas, para ser unos nanotransportadores de fármacos eficientes, deben seguir y cumplir una serie de criterios:

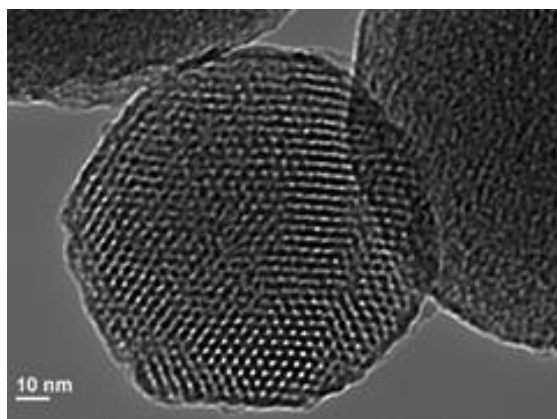
- Ser capaces de liberar el fármaco en el sitio correcto del cuerpo.
- Poder contener fármacos en cantidad suficiente, para alcanzar concentraciones terapéuticas en las células o tejidos con la patología a tratar, incluso en formas de liberación modificada.

- Tienen que ser inertes frente al fármaco que encapsulan y protegerlo frente a su posible degradación o metabolismo por parte del organismo.
- No debe producirse la salida del fármaco encapsulado hasta que alcance su target.<sup>8</sup>

#### 4-4. Nanopartículas de sílice mesoporosa:

Para ejemplificar la nanotecnología como solución avanzada y eficiente en tratamientos de diversas patologías, entre las cuales la infección bacteriana, en esta revisión nos centraremos en las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs). Aunque en gran medida, el modus operandi para el desarrollo y la búsqueda de soluciones para los tratamientos con nanotransportadores, es común al resto.

En primer lugar, debemos destacar que las MSNs son un tipo de nanopartículas sólidas (NPs) de un tamaño de entre 100 a 150 nm (Añadir menor de 50 y mayor de 300) y con un alto nivel de biocompatibilidad demostrado. De hecho, los materiales de sílice mesoporosa son altamente utilizados en biocerámicas para implantes inteligentes que permitan un tratamiento más eficaz a las posibles infecciones sobre los mismos.<sup>9</sup> Además, su elevada área superficial dota a estas nanopartículas de una mayor capacidad de carga que otras NPs.<sup>6</sup>



*Figura 2: MSNs observadas con microscopía electrónica de transmisión*

#### Características:<sup>6</sup>

- Diámetro de poro: 2 - 50 nm
- Área superficial elevada: +/- 1000 m<sup>2</sup> ·g<sup>-1</sup>
- Volumen de poro: +/- 1 cm<sup>3</sup> ·g<sup>-1</sup>

- Orden de poro: +/- 2,5 nm

En los tratamientos con nanopartículas, la vía de administración más común es la intravenosa. Esto implica que, desde el primer minuto, los nanotransportadores, estarán en contacto con la sangre, fluido constituido entre otras, por una gran cantidad de proteínas y de células del sistema inmune.

Teniendo esto en cuenta, debemos saber que en la sangre, de entre todas las proteínas potencialmente reactivas con los transportadores, destacan las opsoninas. Estas proteínas se encargan de anclarse a las partículas ajenas al cuerpo para facilitar su detección por parte de las células del sistema inmune (como los macrófagos), ya que de otra forma no podrían detectar dichas partículas.

Para evitar esto, en el caso de las MSNs el método más utilizado, se llama PEGilacion, es un tipo de funcionalización (como veremos más adelante) y consiste fundamentalmente, en el recubrimiento de la nanopartícula con un polímero: el Polietilenglicol ( y derivados). Enmascarando la partícula (oculta los grupos reactivos de silanol) y evitando así la adhesión de las opsoninas a los nanotransportadores, aumentando su vida media.<sup>10</sup>

#### 4-4.1 Obtención MSNs:

Para la obtención de nanopartículas de sílice mesoporosa se recurre al método de stöber modificado; cuyo procedimiento estándar consiste en mezclar un precursor de silicato, generalmente tetraetilortosilicato (TEOS), con un surfactante catiónico, siendo el más utilizado el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), a una temperatura comprendida entre 30 y 60 C° en medio básico (pH = 11). Las nanopartículas se forman mediante el proceso de sol-gel catalizado en medio básico según dos reacciones principales: hidrólisis y condensación.<sup>6,11</sup>

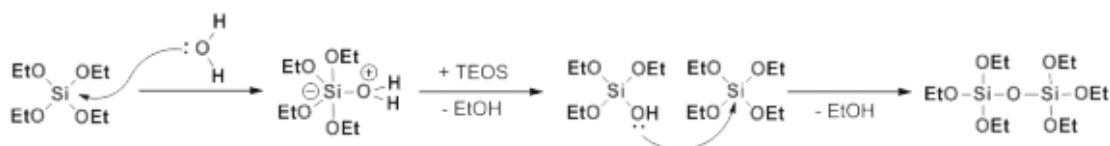


Figura 3: Reacciones para la síntesis de MSNs

En primer lugar, se produce la hidrólisis del alcóxido, obteniéndose una suspensión coloidal que contiene partículas de tamaño inferior a 100 nm, se forman grupos silanol (Si-OH) y se libera el alcohol correspondiente (Figura 3). En segundo lugar, los grupos silanol condensan y polimerizan formando estructuras unidas por enlaces siloxano (Si-O-Si) con eliminación de agua y alcohol (es en esta segunda etapa cuando se forma un gel). En este momento las micelas, formadas por el surfactante actúan a modo de molde y darán origen a la formación de los poros (Figura 4). Es en esta etapa cuando podemos añadir agentes expansores, como el DMHA, para modular (en este caso agrandar) el tamaño del poro. Se situarán en el interior de las micelas, aumentando su tamaño, y por consiguiente, también el del poro.<sup>12</sup>

El surfactante catiónico atrae las cargas negativas de las especies de sílice, las cuales se concentran alrededor de las micelas formando una estructura de sílice tubular. Hay que señalar que el tamaño, la forma y la regularidad de las nanopartículas dependen de diversas variables como son la temperatura, la velocidad de adición, la agitación y la cantidad de catalizador utilizado respecto a la de TEOS.<sup>6</sup>

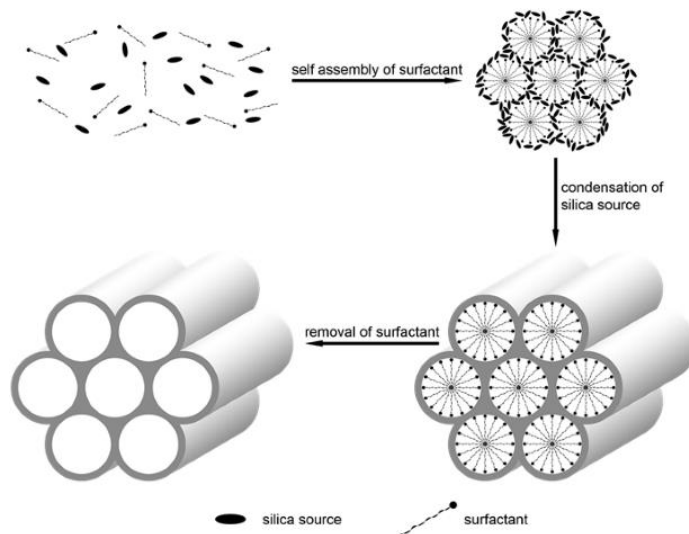


Figura 4: Proceso de síntesis de las MSNs

#### 4-4.2 Funcionalización:

Uno de los aspectos esenciales a tener en cuenta para el diseño de las nanopartículas, debe ser una vehiculización (targeting) activa, que permita al nanotransportador, reconocer determinados marcadores en determinadas células donde actuará liberando el

fármaco. Y dotar a las MSNs de marcadores para permitir una vehiculización (entre otras funciones) es lo que se conoce como: **funcionalizar** la nano partícula. Siendo el segundo paso en la cadena de síntesis. Y éste proceso se puede realizar por distintos mecanismos, en función del momento a lo largo de la síntesis en el que marquemos las nanopartículas:

- Método post-sintético: Permite modificar la superficie de la MSNs incorporando grupos funcionales por silanización. Los grupos silanol superficiales (Si-OH), actúan como puntos de anclaje por tratamiento con un siloxano funcionalizado con el grupo deseado. Sin embargo, con este método la distribución de los grupos funcionales suele ser heterogénea.<sup>6,11</sup>
- Método de co-condensación: Este método implica una funcionalización desde el principio de la síntesis, dónde añadimos un siloxano funcionalizado junto con el precursor de sílice (TEOS) Ej: DAMO-T<sup>13,14</sup>. Este método es capaz de distribuir homogéneamente grupos orgánicos en la superficie interna de los poros. Además, permite controlar más fácilmente la morfología de las MSNs.<sup>6,11</sup>

En este sentido, existen distintos tipos de marcadores para la funcionalización de la superficie de las MSNs. Algunos de estos serían:

- Proteínas: Por ejemplo, la transferrina para vehiculización a ciertos tipos de tumores que sobre expresan los receptores complementarios.
- Anticuerpos: Son proteínas, pero que pueden reconocer de forma más específica, antígenos presentes en patógenos o células tumorales. Sin embargo, una de sus mayores limitaciones, es su baja estabilidad en condiciones fisiológicas.
- Oligopéptido: Son una alternativa a los anticuerpos. Sin ser de naturaleza inmunogénica, son más estables y, por tanto, garantizan una mayor eficacia en ciertos tratamientos.<sup>15</sup>
- Aptámeros: Son macromoléculas capaces de reconocer receptores en otras superficies celulares o en biomoléculas. Están constituidos por una cadena de oligonucleótidos, con bajo poder inmunogénico y con alta estabilidad en el medio fisiológico.

- Pequeñas moléculas: Como principal ventaja, por su tamaño y su fácil acoplamiento a la superficie de las nanopartículas, se puede conseguir mayor densidad en el recubrimiento utilizando moléculas de tamaño pequeño.<sup>15</sup>

Todos con características diferentes y útiles según el tipo de tratamiento; son capaces de reconocer otros marcadores presentes en las células diana de nuestro tratamiento, anclándose, accediendo a su interior o permaneciendo alrededor de ellas para actuar localmente de forma más eficaz. Esto tiene especial relevancia en tratamientos anticancerígenos donde, con este tipo de tratamientos, se puede disminuir la toxicidad de los citostáticos.

#### 4-4. 3 Extracción y llenado:

Posteriormente debemos proceder a la eliminación del surfactante de los poros de la MSNs para así poder proceder con el llenado, y para ello, existen dos métodos:

- **Calcinación:** Consiste en un tratamiento térmico que precisamente por diferencia térmica, induce la eliminación del surfactante<sup>12</sup>
- **Eliminación por solvente:** Se utiliza un disolvente que disminuye las interacciones entre el agente tensoactivo y la pared de sílice, lo que permite eliminar el surfactante. Es el método más utilizado y no afecta a la estructura de las MSNs.

Finalmente, con la MSNs sintetizada y funcionalizada, se procede a cargar el interior de los poros con el fármaco que elijamos empapando las MSNs en una solución con el fármaco de elección: En este caso un antibiótico como por ejemplo el levofloxacino<sup>12,13</sup>. (Aunque podríamos utilizar otro tipo de fármacos como el topotecan, un citostático).<sup>16</sup>

#### 4-4.4 Liberación modificada:

Siguiendo en esta línea, como avanzamos al principio, los nanotransportadores no sólo deben ser capaces de llegar al lugar al que nosotros queramos, sino también deben ser capaces de liberar el fármaco en dicho lugar y frente a determinados estímulos. Una vez sintetizadas las MSNs y llenadas con el fármaco que deseamos, existen una serie de moléculas y mecanismos con los que podemos dotar a las MSNs de una liberación modificada del fármaco. Un ejemplo muy concreto serían unas compuertas que se



abriesen y dejaran libre al fármaco en zonas donde el pH fuese ácido en unos valores determinados, como lo es en las zonas de infección. Y es que parámetros como el pH, la temperatura, determinadas enzimas, glutatión, campos magnéticos o radiación ultravioleta, pueden generarnos una serie de estímulos (diferenciando entre estímulos externos e internos) en las nanopartículas, que las induzcan a liberar su contenido. Atendiendo a tres mecanismos principales de liberación:

- Apertura por eliminación de un grupo bloqueante: Se trata de anclar un grupo bloqueador en los poros de la MSNs mediante un enlace (covalente) reactivo capaz de escindirse o sufrir isomerización a través de un estímulo, liberándose así la carga contenida.
- Apertura mediante polímeros: En este caso, para bloquear los poros de las MSNs se utilizarían polímeros anclados mediante absorción o unión covalente a la superficie de las MSNs. Envuelven fuertemente la superficie externa de las nanopartículas taponando la salida de los poros.
- Apertura mediante válvulas: En este caso debemos hablar del concepto de una nanoválvula, donde una molécula inmovilizada se uniría covalentemente a la matriz de sílice (eje) así como a una molécula cíclica que actuaría a modo de tapón.<sup>11,7</sup>

Mediante dichos mecanismos surgen, como avanzábamos, distintos tipos de liberaciones modificadas:<sup>15</sup>

- Liberación inducida por cambios de PH: En estos casos, se utilizan para recubrir las nanopartículas y mantener el fármaco en el interior, polímeros con grupos funcionales que puedan actuar como ácidos y bases débiles. De este modo, jugando con los estados “neutro” e “ionizado” de las moléculas, podemos conseguir diferentes configuraciones en el polímero. En el caso de las formas neutras, tienden por lo general a interaccionar menos con el medio y a mantener la estructura globular entorno a la nanopartícula. Sin embargo, la forma ionizada tiende a interaccionar más con el medio acuoso y a perder la estructura inicial y liberar el fármaco. (Estímulo interno).<sup>17</sup>
- Liberación inducida por cambio de temperatura: Utilizaremos en estas situaciones una combinación de nanopartícula y polímeros termolábiles. De esta forma, un

aumento de la temperatura interno (producido por tumores, inflamaciones, infecciones) o uno externo, facilitarán la liberación localizada del fármaco. <sup>19</sup>

- Liberación inducida por presencia de enzimas: Las enzimas son capaces de realizar procesos de hidrólisis a determinados polímeros. Para estos casos, se deben recubrir los nanotransportadores con polímeros susceptibles de ser hidrolizados por las enzimas presentes localmente en la zona dónde queremos que el fármaco sea liberado. (Estímulo interno)<sup>18,19</sup>
- Liberación inducida por glutatión/ reacciones Redox: Este tipo de liberación está diseñada para actuar a nivel intracelular. Esto se debe a que los compartimentos intracelulares contienen glutatión y, en el caso de algunas células cancerígenas, en niveles mucho más altos que los normales. El glutatión actúa como agente reductor de puentes disulfuro, y por ello, si dotamos a los nanotransportadores de una cobertura que dependa de dichos puentes para mantener el fármaco en el interior, en presencia de glutatión, los puentes se romperán y se liberará el fármaco. (Estímulo interno)<sup>19,20</sup>
- Liberación inducida por radiación: Para conseguir este tipo de liberaciones modificadas, empleamos MSNPs modificadas con componentes orgánicos susceptibles de sufrir modificaciones estructurales por radiación, como el azobenceno, el pyreno o el nitrobenzeno. (Estímulo externo)<sup>17</sup>
- Liberación inducida por campos magnéticos: En estos casos se usan campos magnéticos como estímulos externos que modifiquen la configuración del recubrimiento de las nanopartículas. (Estímulo externo)<sup>17</sup>.

Este tipo de liberaciones, combinadas con el targeting activo permiten un tratamiento mucho más localizado y por tanto mucho más eficaz frente a las infecciones bacterianas. Como avalan muchos experimentos con este tipo de nanopartículas. <sup>13,14,16</sup>

##### 5. Conclusión:

Las nanopartículas de sílice mesoporosa parecen una prometedora alternativa a los tratamientos antibióticos tradicionales en infecciones bacterianas de difícil acceso. Su capacidad de targeting activo y su capacidad para liberar el fármaco que contiene respondiendo a estímulos concretos (tanto internos como externos) permiten un tratamiento más eficaz, más eficiente y más localizado que los clásicos. Son muchos

los experimentos y los grupos de investigación que apuntan en esta dirección. Sin embargo, todavía quedan muchos ensayos y pruebas a realizar antes de que esta prometedora nanotecnología se convierta en realidad terapéutica.

#### 6. Bibliografía:

1. Julian Davies and Dorothy Davies. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance Microbiol. Mol. Biol. Rev, Vol. 74, September 2010, pp: 3417-433
2. Eliana Drenkard & Frederick M. Ausubel Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature. Volume 416. (18 April 2002), pp: 740–743.
3. Robert Y. Pelgrift<sup>a</sup> Adam J. Friedman. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance Author links open overlay panel. Advanced Drug Delivery Volume 65, Issues 13–14, 30 November 2013, pp: 1803-1815
4. Rodney M. Donlan. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. Clinical Infectious Diseases, Volume 33, Issue 8, 15 October 2001, pp: 1387–1392.
5. Kinam Park. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. J Control Release, Vol 120 (1-2), 2007 Jul 16; pp: 1–3.
6. Maria C. Llinàs, David Sánchez-García\* Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull. Silica nanoparticles: preparation and applications in biomedicine. Afinidad LXXI, 565, 5 de diciembre de 2013
7. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating [...] resistant era. J Control Release, Vol 156(2), 2011 Dec 10; pp: 128-45
8. Abed N, Couvreur P Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to [...] bacterial infections. Int J Antimicrob Agents. Volume 6. 2014 Jun; P: 485-96.
9. NA Ocheke, PO Olorunfemi, NC Ngwuluka. Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery Tropical Journal of Pharmaceutical Research. Vol 8. 2009.
10. Veronese, F. M.; Pasut, PEGylation, successful approach to drug delivery., G., Drug Discov. Vol: 10 (21), Today 2005, pp: 1451-1458.
11. Li, Z. X.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I., Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. Chem. Soc. Rev. Vol 41(7). 2012, pp: 2590-2605.

12. HessamZiaei-Azad Joel M.Kolle NabilAl-Yasser Abdelhamid Sayari. One-pot synthesis of large-pore AlMCM-41 aluminosilicates with high stability and adjustable acidity. *Microporous and Mesoporous Materials*, Volume 262, 15May2018, pp:166-174.
13. González B, Colilla M, Díez J, Pedraza D, Guembe M, Izquierdo-Barba I, Vallet Regí M. Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment . *Acta Biomater.* Vol 68, 2018 Mar, pp:261-271.
14. Pedraza, D y Díez, Jaime y Izquierdo-Barba, Isabel y Colilla, Montserrat y Vallet Regí, María. Amine-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles: A New Nanoantibiotic for Bone Infection Treatment. *Biomedical Glasses*, (2018).
15. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Controlled Release Applications Montserrat Colilla Alejandro Baeza María Vallet-Reg. *The Sol-Gel Handbook*. Chapter 42.
16. M. Martínez-Carmona, D. Lozano, M. Colilla and M. Vallet-Regí. Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles. *RSC advances*. Vol 6, 19 May 2016. pp 50923-50932.
17. Colilla, M., and Vallet-Regí, M Ducheyne, P., Grainger, D.W., Healy, K.E., Hutmacher, D.W., and Kirkpatrick, C.J. (eds.), *Ordered Mesoporous Silica Materials*. *Comprehensive Biomaterials II*, Vol.4, (2017), pp. 644-685.
18. Nanovehículos para el tratamiento de la infección bacteriana. Saucedo Pereyra, J [trabajo fin de grado] Madrid, Facultad de Farmacia. Junio 2017.
19. Xin Chen , Xiaoyu Cheng, Alexander H. Soeriyadi, Sharon M. Sagnella , Xun Lu, Jason A. Scott , Stuart B. Lowe , Maria Kavallaris and J. Justin Gooding Stimuli-responsive functionalized mesoporous silica nanoparticles for drug release in response to various biological stimuli. *Biomater. Sci.*, Vol: 2, 2014, pp. 121-130
20. Dr. Zhong Luo Prof. Kaiyong Cai Dr. Yan Hu Dr. Li Zhao Dr. Peng Liu Lin Duan Dr. Weihu Yang. Mesoporous Silica Nanoparticles End-Capped with Collagen: Redox-Responsive Nanoreservoirs for Targeted Drug Delivery. *Angewandte Chemie*. Vol 50, January 17, 2011. pp 666-669.

#### 7. Agradecimientos:

El autor agradece expresamente la ayuda prestada a las profesoras investigadoras de la Universidad Complutense de Madrid: Isabel Izquierdo Barba y Montserrat Colilla Nieto, fundamentales para la realización de esta revisión.