



Diseño, síntesis y caracterización de nanopartículas mesoporosas de sílice multifuncionales para aplicaciones biomédicas.

Rodrigo Rubio-Govea, Flavio F. Contreras-Torres, Nancy Ornelas-Soto*

Laboratorio de Nanotecnología Ambiental, Centro del Agua para América Latina y el Caribe,
Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo León.

*correspondencia: ornel@itesm.mx

RESUMEN

La liberación controlada de sustancias bioactivas a través de nanopartículas mesoporosas de sílice (NMSi) es de amplio interés en el campo biomédico, como por ejemplo, sistemas de liberación controlada específicos para miocardio en terapia génica. En el diseño de NMSi multifuncionales se han tomado en cuenta los procesos de síntesis (e.g., método sol-gel), tamaño de partícula (ca. 10 – 600 nm), tamaño de poro (ca. 2 – 15 nm), funcionalización química (i.e., silanización), modificación (e.g., péptidos y biomoléculas) y expresión genética (e.g., SERCA2a). En el presente trabajo se presentan y se discuten: (i) los métodos condensación y funcionalización post-síntesis (i.e., grafting) con alcoxisilanos (e.g. APTES), (ii) la remoción del surfactante por medio del método de extracción química (e.g., NH_4NO_3), y (iii) la funcionalización química con BSA. La caracterización de las NMSi pristinas y modificadas ha sido llevada a cabo por medio de microscopía SEM, adsorción de N_2 y espectroscopías FT-IR y DRX.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, uno de los mayores desafíos que las industrias farmacéuticas deben superar es el diseño de nuevas técnicas de liberación de fármacos. Por lo anterior, la liberación controlada de sustancias bioactivas en un sitio específico es uno de los campos emergentes con mayor alcance en la ciencia de los materiales. Entre las propuestas más interesantes que se han presentado, se encuentra la metodología de sistemas de liberación controlada (DDS, por sus siglas en inglés) a través de la cual es posible obtener un aumento de la actividad en el tejido u órgano deseado minimizando los efectos secundarios de la droga [1].

Dentro de los diversos materiales que han sido investigados para ser utilizados en DDS se ha encontrado que los nanomateriales a base de sílice (dióxido de silicio, SiO_2) son buenos candidatos debido a sus características intrínsecas como son el total control del tamaño de partícula (5 – 1000nm) y tamaño de poro, alta área superficial ($> 800\text{m}^2/\text{g}$), gran volumen de poro ($> 0.9\text{cm}^3/\text{g}$), biocompatibilidad, baja toxicidad [2]. En particular, el control en el tamaño del poro permite obtener nanopartículas mesoporosas de sílice (NMSi) las cuales fácilmente pueden ser funcionalizadas con biomoléculas para agregar especificidad hacia receptores celulares específicos; entre las biomoléculas utilizadas para la modificación destacan péptidos, enzimas, proteínas y ADN [3].

El presente trabajo se enfoca en el diseño, síntesis, funcionalización y caracterización de NMSi para su utilización como DDS en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (estudios futuros). Se espera que las NMSi con la superficie modificada por péptidos específicos para el corazón le



permitan tener mayor especificidad hacia el tejido cardiaco al igual que una mejor capacidad de transfección del material genético que sobreexpresen proteínas deseadas.

2. TEORÍA

La síntesis de las NMSi se lleva a cabo por el método sol-gel, el cual está basado en la catálisis en medio amoniacal de ortosilicatos y alcoxisilanos en presencia de algún surfactante—empleado para formar micelas que funcionan como direccionadoras de poros. En general la síntesis se realiza por medio de la condensación de un ortosilicato (i.e., ortosilicato de tetraetilo, TEOS) en presencia del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Para realizar la síntesis por medio de la condensación de TEOS según el método reportado por Lin y Haynes [4] utilizando CTAB como surfactante, primero se disuelve el CTAB en una solución de hidróxido de amonio a la cual posteriormente se agrega una solución etanólica de TEOS. Una vez que se obtienen las nanopartículas estas son puestas en una solución de nitrato de amonio bajo agitación constante, con el propósito de extraer el CTAB de los poros. La obtención de NMSi de diferentes tamaños se puede realizar por medio de la variación de la concentración de hidróxido de amonio que es utilizado en la síntesis.

Una etapa importante posterior a la síntesis de las nanopartículas obtenidas de la condensación de TEOS es la funcionalización y modificación de su superficie, en la cual se puede utilizar una combinación de grupos funcionales con lo cual es posible producir un sistema multifuncional, en el que las características de cada fracción funcional juegan un papel importante en el funcionamiento de las NMSi en sistemas de liberación controlada [5]. Para llevar a cabo la funcionalización de las NMSi es necesario realizar dos pasos secuenciales. Primero se realiza la funcionalización de la superficie con (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) con lo cual se añaden grupos terminales amino y después se realiza una hidrólisis de los grupos alcoxisilanos que no reaccionaron.

Posteriormente se lleva a cabo la modificación de la superficie con biomoléculas. Para realizar esto se utiliza el método de carbodiimidas, en el cual se utiliza el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS), en donde el EDC reacciona con grupos carboxílicos para formar una O-acilisourea intermediaria que es desplazada fácilmente por el ataque nucleofílico de los grupos amino primarios de las biomoléculas. Después la amina primaria forma un enlace amida con el grupo carboxilo original, y un subproducto de EDC se libera como un derivado de urea soluble.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos. Ortosilicato de tetraetilo (TEOS, $\geq 99\%$), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES, 99%), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $\geq 99\%$), isotiocianato de fluoresceína (FITC, $\geq 90\%$) y nitrato de amonio ($\geq 99.5\%$) fueron comprados de Sigma-Aldrich. Etanol anhidro ($\geq 99.5\%$), hidróxido de amonio (25–30% NH_3) y ácido clorhídrico (37%) fueron comprados de Fermont. Se utilizó agua milliQ ($18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$). Todos los químicos son de grado reactivo y fueron utilizados sin realizarles ninguna purificación adicional.

Instrumentación. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7800F de JEOL, difractómetro de rayos X Empyrean de PANanalytical, espectrofotómetro de infrarrojo Spectrum 400 FT-IR de PerkinElmer.

Síntesis. La síntesis de las NMSi se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Lin y Haynes [5]. Para la síntesis de las NMSi con un tamaño promedio de 250 nm, primero se disolvieron 0.96 g de CTAB en 500 mL de una solución etanólica de NH_4OH (1.024 M) y se puso bajo agitación magnética a 700 rpm a temperatura ambiente. Una vez que la solución se volvió transparente se agregaron 13.33 mL de una solución etanólica de TEOS (0.88 M) y se dejó bajo



agitación a 700 rpm por 1 h. Después la solución se dejó en reposo por 12 h. Para remover el CTAB de los poros, las NMSi se centrifugaron a 3500 rpm por 7 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 mL de una solución etanólica de NH_4NO_3 (0.075 M) y se pusieron bajo agitación por 1 h a 60 °C, el lavado con NH_4NO_3 se realizó por triplicado. Después de la última extracción las nanopartículas se lavaron con etanol (x3) y se secaron a 45 °C.

Funcionalización con APTES. Para funcionalizar la superficie de las NMSi se realizaron ligeras modificaciones al métodos reportados por Szegedi et al. [6]. Brevemente, para poder funcionalizar las NMSi con APTES es necesario tener grupos silanol ($-\text{Si}-\text{OH}$) en la superficie, para lo cual las NMSi se resuspendieron en HCl (0.5 M, 4 mg/mL) y se dejaron bajo agitación a 700 rpm por 1 h, después se centrifugaron a 3500 rpm por 7 min y se lavaron con etanol hasta obtener un pH neutro. Posteriormente las NMSi se resuspendieron en etanol (4 mg/mL) y se agregó a cada solución APTES con una relación estequiométrica de (0.797 g APTES/g NMSi) y se dejó bajo agitación por 5 h a 40 °C, después se centrifugaron a 3500 rpm por 7 min y se lavaron con etanol para remover la fracción de APTES que quedó sin reaccionar, el lavado se realizó por triplicado.

Caracterización. La obtención de los espectros de FT-IR de las NMSi prístinas y funcionalizadas con APTES se realizó en el espectrofotómetro Spectrum 400 FT-IR de PerkinElmer. La medición se realizó por medio de la técnica de ATR de las muestras en sólido. La morfología de las NMSi fue estudiada con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7800F de JEOL con un voltaje de aceleración de 15 kV. Para conocer el grado de porosidad y el tamaño promedio de los poros se realizó la determinación del área superficial de las NMSi prístinas por medio de la isoterma de adsorción de nitrógeno utilizando un adsorptómetro Autosorb-1 de Quantachrome, el área superficial fue calculada por el método de Brunauer–Emmett–Teller (BET) y el promedio del tamaño de poro se calculó por medio del método de Barrett–Joyner–Halenda (BJH). La difracción de rayos X de las NMSi prístinas y modificadas se llevó a cabo utilizando el difractor de polvos de rayos X Empyrean de PANalytical utilizando irradiación de $\text{Cu K}\alpha$.

4. RESULTADOS

La figura 1a muestra los resultados obtenidos de la microscopía electrónica de barrido en la cual se puede observar que las NMSi presentan una morfología esférica las cuales tienen un tamaño promedio de 265 ± 56 nm; la figura 1b muestra la distribución de tamaños.

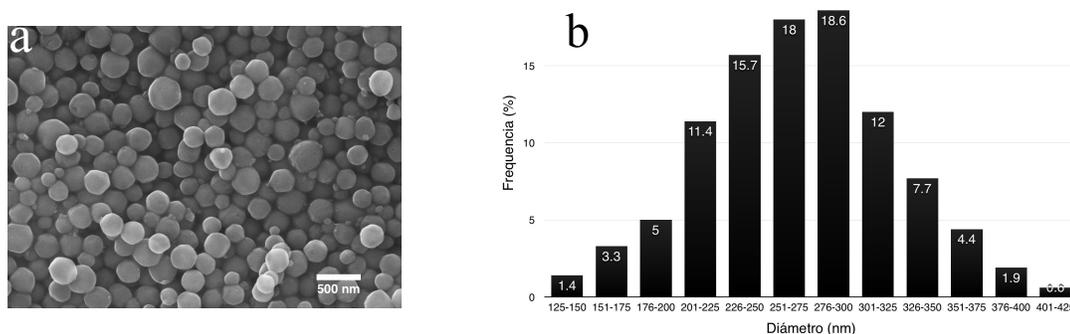


Figura 1. a) Imagen SEM y b) distribución de tamaño de las NMSi prístinas.



En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la adsorción de N_2 . Las NMSi presentaron una isoterma del tipo IV, la cual es característica de los materiales mesoporosos y presentan un área superficial de $1436 \text{ m}^2/\text{g}$. De igual manera en el inset de la figura 2 se puede observar que el tamaño promedio de poros es de 24.5 \AA .

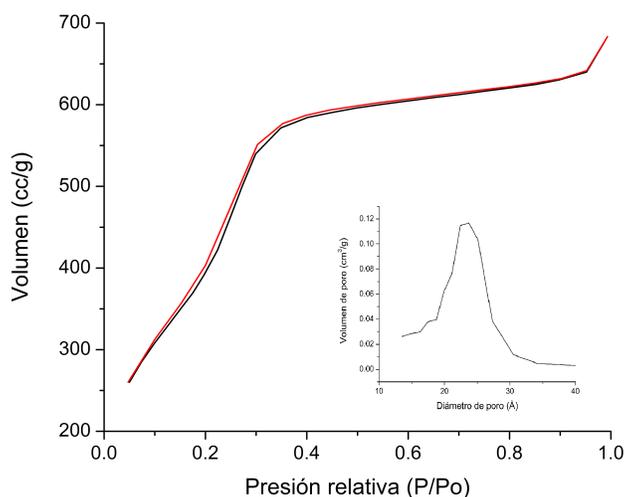


Figura 2. Isotherma obtenida de la adsorción de N_2 y distribución de tamaño de poros.

Análisis de infrarrojo de las NMSi prístinas y funcionalizadas con APTES fueron realizadas para comprobar que la modificación química en la superficie de las partículas. En la figura 3 se muestran los espectros obtenidos en donde se puede observar una banda ancha característica de los grupos hidroxilo alrededor de los 3400 cm^{-1} , y de igual manera se presenta otra banda pequeña al rededor de los 800 cm^{-1} la cual es característica de los grupos silanol ($-\text{Si}-\text{OH}$). Así mismo en el espectro de las NMSi funcionalizadas con APTES (rojo) se puede observar alrededor de los 1650 cm^{-1} dos picos pequeños característicos de aminas primarias y alrededor de los 1385 cm^{-1} se observa el pico característico del enlace $\text{C}-\text{N}$ con lo cual se comprueba la presencia de APTES en las NMSi.

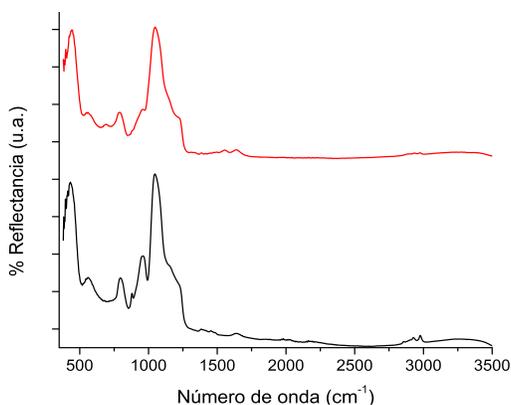


Figura 3. Espectros FT-IR de las NMSi prístinas (negro) y funcionalizadas con APTES (rojo).



En la figura 4 se puede observar el patrón de difracción de rayos X en el cual se presenta un pico ancho a los 22 grados característico de NMSi coloidales amorfas.

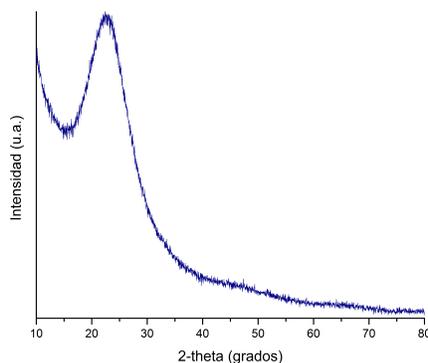


Figura 4. Patrón de difracción de rayos X de las NMSi prístinas.

5. CONCLUSIONES

Se presenta un método para la obtención de nanopartículas mesoporosas de sílice por medio de la hidrólisis y condensación de ortosilicato de tetraetilo utilizando bromuro de hexadeciltrimetiamonio como direccionador de poro. Las partículas sintetizadas presentan alto grado de porosidad debido a su área superficial de $1436 \text{ m}^2/\text{g}$. El tamaño promedio calculado de las partículas es de $265 \pm 56 \text{ nm}$. La efectiva funcionalización de la superficie de NMSi con (3-aminopropil)trióxido de silano fue observada por la espectrofotometría IR. Por lo anterior las nanopartículas sintetizadas presentan buenas características para ser empleadas en estudios futuros de desarrollo de sistemas de liberación controlada en donde es importante la obtención de materiales altamente porosos. Además la funcionalización permite añadir grupos funcionales amino con lo cual se forma un intermediario para la obtención de acarreadores versátiles a los cuales se les puede agregar un moléculas bioactivas específicas que pueden ser utilizadas para dirigir la carga a su lugar objetivo, reduciendo así la aparición de efectos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, “Mesoporous silica nanoparticles in medicine—recent advances.” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, no. 5, 2013, pp. 689–702.
- [2] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, “Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers.” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 11, 2008, pp. 1278–1288.
- [3] M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, “Biochemically functionalized silica nanoparticles,” *The Analyst*, vol. 126, no. 8, 2001, pp. 1274–1278.
- [4] Y.-S. Lin, C. L. Haynes, “Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity.” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 13, 2010, pp. 4834–4842.
- [5] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, “Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Therapeutic, Diagnostic and Targeted Action in Cancer Treatment,” *Current Drug Targets*, vol. 12, pp. 1166–1186.
- [6] X. Lin, N. Zhao, P. Yan, H. Hu, F.-J. Xu, “The shape and size effects of polycation functionalized silica nanoparticles on gene transfection.” *Acta biomaterialia*, vol. 11, 2015, pp. 381–392.