



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**“Síntesis y caracterización de cerámicas mesoporosas tipo
SBA-15 para aplicaciones biomédicas”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA:

ZULEMA VARGAS OSORIO

TUTOR PRINCIPAL

Marco Antonio Álvarez Pérez
Posgrado de Odontología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Raúl Alejandro Valenzuela Monjarás
Ignacio Alejandro Figueroa Vargas
Instituto de Investigaciones en Materiales



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Abel Moreno Cárcamo
PRIMER VOCAL	Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez
SEGUNDO VOCAL	Dr. José Rivas Rey
TERCER VOCAL	Dra. Lucia Téllez Jurado
SECRETARIO	Dr. José Israel Betancourt Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS

Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Posgrado de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio NANOMAG, Instituto de Investigaciones Tecnológicas de la Universidade de Santiago de Compostela, España.

TUTORES EXTRANJEROS (USC)

Dr. José Rivas Rey
Dra. Yolanda Piñeiro Redondo
Dr. Carlos Vázquez Vázquez

COMITÉ TUTORAL

Tutor Principal: Marco Antonio Álvarez Pérez
Dr. Raúl Alejandro Valenzuela Monjarás
Dr. Ignacio Alejandro Figueroa Vargas

SUSTENTANTE

Zulema Vargas Osorio

DEDICATORIAS

A mi familia que son mi pilar y principal motor. Estoy eternamente agradecida con la vida por tener la enorme fortuna de que sean mis padres y mis hermanos. Son el perfecto ejemplo de amor, amistad, talento, liderazgo, constancia, voluntad, esfuerzo, humildad, hermandad,... podría escribir una tesis completa de sus cualidades y todo lo que representan para mí, así que cualquier palabra que aquí quede plasmada, estará muy lejos de describir todo lo que siento por ustedes. Mamita (Señora Tuti) eres la máxima representación de lo que es ser una madre, mujer, compañera y amiga. Pa, gracias por todas esas madrugadas de pláticas, por tus enseñanzas, experiencias y apoyo, y por supuesto, por adoptar y cuidar de mis bebecitos más hermosos. Andy te espera un gran futuro, eres una emprendedora innata, una chica mega inteligente y guapa, como dicen en Galicia la vas a petar!!. Dany PARTICIPARÁS EN LOS JUEGOS OLÍMPICOS DE RÍO 2016!!!, qué más puedo decir, eso lo dice todo, me llenas de orgullo, donde quiera que estés, siempre estaré a tu lado. Concluyo diciéndoles que los AMO CON TODA MI ALMA y este logro sin duda alguna, es suyo.

A mi gran y amada familia (abuelitos, tíos, primos, sobrinos.....) que este logro sea sólo uno de los muchos que tendremos, luchemos por un mejor presente y futuro, no sólo para nosotros, sino para México y el mundo.

No sólo agradezco, sino dedico esta tesis a toda la familia NANOMAG por abrirme las puertas de su laboratorio, pero más aún por brindarme su amistad, a su lado viví una de las mejores experiencias de mi vida. Por todos y cada uno de los momentos que convivimos y disfrutamos juntos, por esas enseñanzas, por su compañía, por sus pláticas amenas y agradables, pero sobre todo por ser personas maravillosas, MIL GRACIAS!!!

Aleixo eres una de las personas más extraordinarias que he conocido, un ser muy bondadoso, positivo, lleno de luz, agradezco hayas llegado a compartir el mismo piso, a tu lado los días y las noches fueron mucho más divertidas, tranquilas y agradables. Gracias por todos esos viajes a lugares sorprendentes, por compartir a tu hermosa familia y hacerme sentir como en casa, gracias por ser TÚ. Que nunca nadie te diga que no puedes, que no vales, que no eres, hacen falta más personas como tú para que este mundo sea mejor, TQM.

Isma eres muy importante en mi vida. Me ayudaste cuando más lo necesitaba, siempre estuviste para mí, he disfrutado todos y cada uno de los momentos que hemos vivido juntos, espero no se pierdan, perdóname por todo lo que pude haberte causado, por ser tan exigente y estresada. Eres una magnífica persona, lleno de cualidades, súper creativo, con un gran corazón, está demás decir que tú tienes parte del mío.

A mis amigos de materiales, en especial a toda la banda magnética (incluido el Doc) que sin ustedes, el doctorado y en general este tiempo no hubiera sido el mismo, los quiero mucho, donde quiera que se encuentren y lo que sea que estén haciendo, cuentan conmigo para lo que necesiten, por supuesto les deseo todo el éxito y felicidad del mundo.

A todos los del laboratorio de Bioingeniería por esos jueves geniales de convivencias y por su compañía día con día.

A todos mis amigos por los buenos momentos que hemos pasado juntos, que me han hecho reír, enojar, llorar.....sólo por el simple hecho de ser mis amigos, muchísimas gracias.

Finalmente a mis babies, que aunque no leerán estas palabras, representan para mí: felicidad, ternura, asombro, fascinación..., a esos pequeños seres quiero decirles que siempre los voy a querer y cuidar.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada UNAM que desde los 11 años me acogió, regocijó y enseñó que se siente tener sangre azul y oro, porque a su lado me he desarrollado física, social, moral e intelectualmente, PUMA POR SIEMPRE!!!

Al Programa de Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales por darme la oportunidad de pertenecer a su Elite!!

A Marco por su apoyo, amistad y más aún por creer y confiar en mí.

A Pepe, Yoli y Carlos por ser los mejores co-tutores que pude haber tenido, por su apoyo incondicional, sus atenciones, sus consejos, por incentivarme a aprender y ser mejor, por ese compromiso con mi trabajo y por darme la oportunidad de tener una experiencia sin igual.

A los miembros de mi comité tutorial, Raúl e Ignacio, que no sólo son unos fantásticos investigadores, sino unos amigos muy queridos. Mil gracias por abrir las puertas de sus laboratorios, hacerme sentir como del grupo, confiar en mí y apoyarme.

A los Drs. José Castillo, Francisco Campos, Tomas Sobrino, Bárbara Argibay y Andrés Alexander Da Silva Candal del Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela por su tiempo, trabajo en equipo, por una magnífica colaboración, por los excelentes estudios realizados y resultados obtenidos de MRI, marcaje celular, citotoxicidad y los que vendrán en un futuro.

Al Dr. Francisco Otero de la Facultad de Farmacia de la USC por todas sus atenciones, integrarme a su laboratorio, enseñarme a elaborar andamios 3D novedosos, por brindarme su apoyo y darnos la oportunidad de desarrollar una nueva línea de investigación para consolidar una maravillosa colaboración.

A la Dra. Luci Téllez por su apoyo, tiempo y amistad, por ayudarme en la caracterización de mis materiales y por sus buenos consejos. Así como a Jerry por las buenas imágenes de MEB obtenidas en el ESIQIE, IPN.

A los Drs. Octavio Álvarez, Israel Betancourt, Pepe Chávez, Lauro Bucio, Julio Juárez y Abel Cárcamo por sus pláticas, consejos y asesorías.

A todo el personal del IIM en general y en particular a Carlos, Adri y Omar por la determinación y caracterización de mis muestras, y a Rosario por su gran apoyo en facilitarme las cosas, siempre dispuesta a ayudar.

A las chicas de microscopía del CACTUS, USC y LUGO por su ayuda, tiempo y esfuerzo en las micrografías de MEB y MET de mis materiales y además por ser excelentes personas. A los distintos departamentos del CACTUS u otras instancias de la USC que participaron en la caracterización de mis materiales haciendo posible la culminación exitosa de este trabajo.

A CONACyT por la beca otorgada durante la realización de mi Doctorado y durante mi estancia en la Universidad de Santiago de Compostela.

Al departamento de Movilidad Estudiantil de la UNAM por el apoyo complementario en la compra del boleto de avión.

Al PAEP y al Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales por todos los apoyos económicos recibidos.

A la UNAM y a la DGAPA por el apoyo económico brindado, en el proyecto PAPIIT (IN210815).

A MEC, España (CTQ2013-44762-R) por el apoyo económico.

Al programa FP7 (0681_InveNNta_1_E; Future NanoNeeds-N.604602)

Al jurado por la revisión de esta tesis, sus buenas críticas y sugerencias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 NANOTECNOLOGÍA	10
2.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS	10
2.3 BIOMATERIALES	12
2.4 ANDAMIOS 3D	14
2.5 MATERIALES MESOPOROSOS DE SÍLICE (MMS)	17
2.5.1 Sólidos Porosos	17
2.5.2 Origen de los MMS	18
2.5.3 Síntesis de los MMS	18
2.5.4 Mecanismos de formación de los MMS	21
2.5.5 Funcionalización de los MMS	23
2.5.5.1 Método de co-condensación	24
2.5.5.2 Método de post-síntesis	24
2.5.6 Aplicaciones biomédicas de los MMS	25
2.5.6.1 Sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos y otras entidades biológicas	25
2.5.6.2 Aplicación en ingeniería de tejido óseo	27
2.6 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS	27
2.6.1 Nanopartículas	27
2.6.2 Nanopartículas magnéticas (NPMs)	28
2.6.3 Magnetita	29
2.6.4 Propiedades de las NPMs	30
2.6.4.1 Tamaño de partícula	30
2.6.4.2 Temperatura	32
2.6.4.3 Cristalinidad	33
2.6.4.4 Curva de Histéresis	33
2.6.4.5 Superparamagnetismo	34
2.6.5 Recubrimientos de las NPMs	35
2.6.6 Síntesis de NPMs	35
2.6.6.1 Coprecipitación	36
2.6.6.2 Microemulsión	36
2.6.6.3 Solvoterma	37
2.6.7 NPMs aplicadas a biomedicina	37
2.6.7.1 Agente de contraste para imagen por resonancia magnética (RMI)	38

2.6.7.2 Liberación de medicamentos	41
2.6.7.3 Transfección genética	42
2.6.7.4 Tratamiento del cáncer	42
2.6.7.5 Hipertermia	42
2.7 NANOCOMPOSITES MAGNÉTICOS (SBA-15/Fe ₃ O ₄)	43
2.8. ESTRUCTURAS CORE-SHELL (Fe ₃ O ₄) _n @C	45
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3.1 HIPÓTESIS	47
3.2 OBJETIVOS	47
3.2.1 Objetivos Específicos	48
4. METODOLOGÍA	50
4.1. MATERIALES	50
4.2 SÍNTESIS DE CERÁMICAS MESOPOROSAS DE SÍLICE A BAJA TEMPERATURA	51
4.2.1 Síntesis de SBA-15	51
4.2.2 Síntesis de SBA-15/NaCl	51
4.2.3 Síntesis de SBA-15 funcionalizadas por co-condensación con grupos etilendiamino y tetrasulfuro	51
4.3 SÍNTESIS DE NANOCOMPOSITES MAGNÉTICOS (SBA-15/Fe ₃ O ₄)	52
4.3.1 Síntesis de cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15	52
4.3.2 Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe ₃ O ₄ @PAA) y (SBA-15/Fe ₃ O ₄ @PEI)	53
4.3.3 Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂)	54
4.3.4 Síntesis de nanocomposites magnéticos [SBA-15/(Fe ₃ O ₄) _n @C]	56
4.3.5 Síntesis de cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15 en presencia de glicerol	56
4.3.6 Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15@glicerol/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ funcionalizados con NH ₂)	57
4.4 TÉCNICAS EXPERIMENTALES DE CARACTERIZACIÓN	57
4.4.1 Difracción de Rayos-X (DRX)	58
4.4.1.1 Difracción de Rayos X a Bajo Ángulo	58
4.4.1.2 Difracción de Rayos X de Polvos	58
4.4.2 Análisis Químico Elemental (AQE) y Espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS)	59
4.4.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IR-TF)	60
4.4.4 Análisis Termogravimétrico (TGA/DTG)	60
4.4.5 Porosimetría de Adsorción de N ₂ (BET)	61
4.4.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	63
4.4.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	63
4.4.8 Resonancia Magnética Nuclear de ²⁹ Si (RMN- ²⁹ Si)	64
4.4.9 Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM)	64
5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS	65
5.1 ANDAMIOS 3D	65
5.1.1 Materiales	65
5.1.2 Elaboración de <i>andamios</i> 3D	65
5.1.3 Proceso de carga de simvastatina en los <i>andamios</i> 3D	67

5.1.4 Liberación de simvastatina	67
5.1.5 Técnicas experimentales de caracterización de los <i>andamios</i> 3D	68
5.1.5.1 Porosimetría de intrusión de mercurio (PIM)	68
5.2.5.2 Microscopía electrónica de barrido	68
5.2.5.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	68
5.2 MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA RMI A PARTIR DE ESTRUCTURAS CORE-SHELL (Fe ₃ O ₄) _n @C	68
5.2.1 Síntesis de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄) _n @C	69
5.2.2 Técnicas experimentales de caracterización de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄) _n @C	69
5.2.3 Biocompatibilidad, marcaje celular y respuesta RMI de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄) _n @C. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por la Dra. Bárbara Arbigay.	70
5.2.3.1 Respuesta RMI de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄) _n @C.	71
5.3. ENSAYO IN VIVO, MARCAJE CELULAR, CITOTOXICIDAD Y RESPUESTA RMI DEL NANOCOMPOSITE MAGNÉTICO SBA-15@GLICEROL/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ FUNCIONALIZADO CON NH ₂ Y CH ₃ , PARA SU APLICACIÓN EN ISQUEMIA CEREBRAL. Experimentos realizados en el clinical neurosciences research laboratory del hospital clínico universitario por el Dr. Andrés Alexander Da Silva Candal.	72
5.3.1 Estudio <i>in vivo</i>	72
5.3.1.1 Administración en yugular	72
5.3.1.2 Administración intraarterial	73
5.3.1.3 Administración intraparenquimal	73
5.3.2 Estudio <i>in vitro</i> para conocer la efectividad del material en el marcaje celular (x cuadruplicado)	74
5.3.3 Ensayo de citotoxicidad por análisis de Lactato Deshidrogenasa (LDH) (x cuadruplicado)	74
5.3.4 Respuesta RMI del NC MNCN _{1HP}	75
5.4 HIPERTERMIA DE LOS NANOCOMPOSITOS MAGNÉTICOS (SBA-15/Fe ₃ O ₄)	75
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
6.1 CARACTERIZACIÓN POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X	77
6.1.1 Difracción de Rayos X a Bajo Ángulo	77
6.1.2 Difracción de Rayos X por el Método de Polvos	81
6.2 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER	83
6.3. CARACTERIZACIÓN POR ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL	88
6.4 CARACTERIZACIÓN POR ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y SU PRIMERA DERIVADA	92
6.5 CARACTERIZACIÓN POR POROSIMETRÍA DE ADSORCIÓN DE N ₂	96
6.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	103
6.7 CARACTERIZACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ²⁹ Si	115
6.8 CARACTERIZACIÓN POR MAGNETOMETRÍA DE MUESTRA VIBRANTE	120
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS	124
7.1 ANDAMIOS 3D	126
7.1.1 Microscopía electrónica de barrido	127
7.1.2 Porosimetría de intrusión de mercurio y Adsorción de N ₂	133
7.1.3 Ensayo de carga de simvastatina	141
7.1.3.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	144

7.1.4 Ensayo de liberación de simvastatina	145
7.1.5 Degradabilidad	154
7.2 MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA RMI A PARTIR DE ESTRUCTURAS CORE-SHELL (Fe ₃ O ₄)n@C	158
7.2.1 Caracterización estructural y magnética de estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄)n@C	158
7.2.2 Biocompatibilidad, marcaje celular y respuesta RMI de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄)n@C. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por la Dra. Bárbara Arbigay.	161
7.2.3 Estudio por RMI de las estructuras core-shell (Fe ₃ O ₄)n@C	166
7.3 ENSAYO <i>IN VIVO</i> , CITOTOXICIDAD, MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA RMI DEL NANOCOMPOSITE MAGNÉTICO SBA-15@GLICEROL/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ FUNCIONALIZADO CON NH ₂ Y CH ₃ , PARA SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ISQUEMIA CEREBRAL. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por el Dr. Andrés Alexander Da Silva Candal.	168
7.3.1 Estudio <i>in vivo</i> del NC MNCN1 _H	168
7.3.2 Estudio <i>in vitro</i> , efectividad del NC MNCN1 _{HP} en el marcaje celular	170
7.3.3 Ensayo de citotoxicidad por análisis de Lactato Deshidrogenasa	173
7.3.4 Estudio por RMI del NC MNCN1 _{HP}	173
7.4 HIPERTERMIA MAGNÉTICA	175
8. CONCLUSIONES	180
8.1 SBA-15 SINTETIZADO A BAJA TEMPERATURA	180
8.2 NANOCOMPOSITOS MAGNÉTICOS SBA-15/Fe ₃ O ₄	180
8.3 NANOCOMPOSITOS MAGNÉTICOS SBA-15@GLICEROL/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ FUNCIONALIZADOS CON NH ₂	181
8.4 ANDAMIOS 3D	181
8.5 NPs CORE-SHELL (Fe ₃ O ₄)n@C	183
8.6 NCs MNCN1 _{HP} (SBA-15@GLICEROL/Fe ₃ O ₄ @NH ₂ Y CH ₃) PARA SU APLICACIÓN EN CEREBRO	183
8.7 HIPERTERMIA MAGNÉTICA	184
9. PERSPECTIVAS A FUTURO	185
10. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	186
11. ANEXO. ARTÍCULOS	194

RESUMEN

Recientemente los nanosistemas SBA-15/magnetita, están emergiendo como uno de los candidatos más atractivos para producir nuevos nanodispositivos, se componen de dos materiales que por separado, cada uno posee un gran potencial y diversas aplicaciones. Entre las aplicaciones biomédicas de estos nanocomposites (NCs) se incluyen: MRI, hipertermia, sistemas de liberación controlada y selectiva de fármacos/biomoléculas, *andamios* para ingeniería de tejido óseo, dispositivos para tratamiento de cáncer, entre otros. Por su parte, la cerámica mesoporosa de sílice tipo SBA-15 ostenta una elevada área superficial, grandes volúmenes de poro, estrecha distribución de tamaño de poro, una alta reactividad debida a la presencia de grupos silanol (Si-OH) y la facilidad de modificar orgánicamente su superficie con diversos grupos funcionales; cualidades que la dotan para ser una excelente matriz de soporte catalítico, de protección de sustancias lábiles (vitaminas, enzimas, genes...) y un sistema eficiente de liberación controlada de fármacos/moléculas. Mientras que las nanopartículas (NPs) de magnetita se destacan por su carácter superparamagnético, su tamaño capaz de atravesar barreras fisiológicas, su biocompatibilidad y su funcionalización.

En esta tesis se presenta la síntesis, la caracterización fisicoquímica, estructural y magnética, así como algunas aplicaciones biomédicas de las cerámicas mesoporosas SBA-15 y los NCs SBA-15/magnetita. En las micrografías de MEB se observaron las distintas morfologías obtenidas debidas a la variación de los parámetros de síntesis, mediante MET, los NCs evidenciaron la presencia de una disposición hexagonal y un sistema de canales ordenados de poros aún tras el anclaje de la magnetita. Los difractogramas de rayos X de policristales y de ángulo bajo mostraron la presencia de los picos característicos de la magnetita cristalina, y las reflexiones convencionales de un material SBA-15 ordenado, respectivamente. El análisis por BET exhibió grandes áreas superficiales por encima de los 150 m²/g y estrechas distribuciones de poro con diámetros entre 2-18 nm. La caracterización magnética se realizó por VSM, revelando el comportamiento superparamagnético. Así mismo, la caracterización mediante hipertermia magnética presentó dos tipos de respuesta, sin aumento de temperatura o un incremento relativo de la misma, lo que dependió de la ubicación de las NPs en la nanoestructura.

En cuanto a las aplicaciones biomédicas, se diseñaron y desarrollaron nuevos *andamios* 3D (polímeros naturales/SBA-15/magnetita) para ingeniería de tejido óseo que presentaran los tres niveles de porosidad (macroporos, mesoporos y microporos), para propiciar una buena adhesión y proliferación celular, además de mantener un tránsito adecuado de nutrientes y sustancias de desecho. A partir de ellos se realizó la liberación de simvastatina, mostrando la capacidad de estos sistemas para liberar fármacos de forma controlada y prolongada. Los ensayos de MRI y marcaje celular se hicieron con los sistemas core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$ y con el NC MNCN1_{HP}, para el primero, el marcaje celular se realizó en presencia y ausencia de poli-L-lisina (PLL) para estudiar la implicación de este polímero en la internalización de las NPs por las células, obteniéndose que la PLL ayuda al proceso de internalización aún a altas concentraciones de NPs. En el caso del NC MNCN1_{HP}, además se estudiaron su biocompatibilidad *in vivo* y su citotoxicidad mediante el ensayo por análisis de la lactato deshidrogenasa (LDH), comprobándose su excelente biocompatibilidad y confirmando su potencial para aplicaciones biomédicas en cerebro. En cuanto a la respuesta por MRI, el valor de la velocidad de relajación transversal (r_2) de los sistemas core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$ fue de $218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, mostrando un valor superior a los productos comerciales tales como Resovist o Endorem, en el caso del material MNCN1_{HP} este valor fue $r_2 = 113.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, menor al de las NPs core-shell, sin embargo alto considerando que este material sólo posee el 5% en peso de Fe.

En resumen, las cerámicas mesoporosas tipo SBA-15 y los nanocomposites magnéticos mesoporosos SBA-15/ Fe_3O_4 fueron sintetizados por diferentes rutas, variando distintos parámetros químicos y físicos para obtener propiedades fisicoquímicas, morfológicas y magnéticas, deseables en un amplio rango de aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

Multifunctional nanocarriers, integrating diagnostic and therapeutic functions, have attracted increasing scientific attention recently. Magnetic-mesoporous silica nanocomposite materials are emerging as one of the most appealing candidates to produce novel nanodevices for personalized medicine, theranostic carriers, cellular and diagnostic MRI *in vivo*, magnetofection, hyperthermia, magnetic bioseparation, molecular diagnostics, magnetic-controlled drug release systems and osseous regeneration devices. The main driving force for this trend is connected to the possibility of combining synergistic magnetic, mesoporous, and biological entities and functions in a well-defined host matrix, also looking for tissue engineering constructs capable of combining the replacement of damaged parts with local cancer treatment. The synthesis of mesoporous silica materials with controlled physicochemical characteristics like large pore volume, high surface area, narrow pore size distribution, tunable pore size and high hydrothermal stability, is of large interest due to its inert, harmless, and inexpensive character and their ever-expanding list of applications. The incorporation of magnetic nanoparticles (MNPs) into these biocompatible mesoporous scaffold formulations provides final materials with additional magnetic functionality and reinforced mechanical properties for bone tissue engineering applications. Magnetic functionality comprise different beneficial effects like magnetic stimulation on biological media (i.e., enhancement of cell adhesion/proliferation), guiding of growth factors loaded magnetic nanocarriers, or the *in vivo* localized heat release by magnetic hyperthermia with the help of an externally applied alternating magnetic field.

So the aim of this study was conducted by the synthesis, the structural and physicochemical characterization and the applications as scaffolds for bone tissue engineering; soft, hard hyperthermia devices for cancer treatment, and nanosystems for MRI and cells labeling of magnetic-mesoporous silica nanocomposite materials.

In the present work we report the synthesis procedure of magnetic mesoporous SBA-15 ceramics with controlled morphology. Different procedures and synthetic parameters are varied in order to control the physico-chemical, textural and magnetic properties of these materials.

Our results show that magnetic mesoporous silica presents a flat two-dimensional hexagonal symmetry with the presence of mesoporous ordination cylindrical geometries, opened at both ends, with magnetite nanoparticles anchored on their surface and in the channels as shown by TEM and SEM micrographs. Measured by BET, these materials show a surface area above 150 m²/g, which assures a higher ability to be loaded with different molecules than conventional ceramics. The presence of crystalline magnetite is corroborated by the XRD spectra which reveals the typical iron oxide crystalline pattern peaks. Magnetic characterization was performed with a vibrating sample magnetometer (VSM), where field dependent magnetization cycles were performed at room temperature for the samples. The magnetization cycles show no hysteresis or coercive forces, which is highly desirable for biomedical applications to avoid magnetic agglomeration of particles. In addition hyperthermia characterizations have been performed to assess the magneto-thermal abilities of the samples. The hyperthermia response can be tuned by varying the content of magnetite as evidenced, where negligible temperature increase or a high increase of about 40 °C in only one minute can be obtained depending on the physicochemical properties of the ceramic and the magnetite content and location. This tunable response can be an advantage for different tissue engineering purposes since it allows for magnetic enhancement of bone cell growth and differentiation (low thermal increase) or locally killing cancer cells (high thermal increase) with magnetic hyperthermia by selecting the proper magnetite doping. In addition the porous character of SBA-15 ceramics allows to functionalize the material with growth factors, specific antibiotics or therapeutic drugs to promote regeneration and healing in bone diseases.

In summary, magnetic mesoporous SBA-15 ceramics have been synthesized by different routes and varying chemical and physical parameters to obtain tunable physicochemical, morphological and magnetic properties suitable for different biomedical applications.

ABREVIATURAS

NOMENCLATURA GENERAL

NC: nanocomposite

NP: nanopartícula

NPM: nanopartícula magnética

PLL: poli-L-lisina

PAA: ácido poliacrílico

PEI: polietilenimino

OA: ácido oleico

SBA-15: cerámica o matriz mesoporosa de sílice que se obtiene por un proceso similar al sol-gel

Fe₃O₄: magnetita

Core-shell: núcleo-capa, núcleo-recubrimiento, hueco-cubierta (por sus siglas en inglés)

IT: Ingeniería de Tejidos

MMS: materiales mesoporosos de sílice, en la mayoría de los casos son sistemas de canales ordenados

TLCT: Cristal líquido o True Liquid Crystal Templating

AC: agentes de contraste

B₀: campo magnético

M_z: relajación magnética componente longitudinal o magnetización longitudinal

M_{xy}: relajación magnética componente transversal o magnetización transversal

T₁ o T₁: Tiempo de relajación longitudinal

T₂ o T₂: Tiempo de relajación transversal

R₂ o r₂: Velocidad de relajación transversal

B_{RF}: frecuencia de Larmor de los protones

BOLD: dependencia del nivel de desoxigenación de la sangre (blood desoxygenation level dependent por sus siglas en inglés)

T_C: Temperatura de Curie

M: magnetización

M_s: magnetización de saturación

M_r: magnetización remanente

H: campo magnético

H_c: campo coercitivo o coercitividad

K_{an} o K: constante de anisotropía

V: Volumen

KV: energía de anisotropía

kT: energía térmica

D_c: tamaño crítico

D_p: diámetro de poro

D_{BJH}: diámetro de poro por el método BJH

W_t: masa de simvastatina liberada a tiempo t

W₀: masa de simvastatina liberada a tiempo 0

K₁: constante cinética primera exponencial a las 9h de ensayo

K₂: constante cinética segunda exponencial de las 9h hasta la conclusión del ensayo

PS_{DFT}: tamaño de poro por el método NLDFT

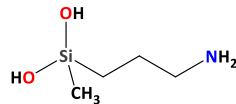
MSCs: células troncales mesenquimales (mesenchymal stem cells, por sus siglas en inglés)

LDH: lactato deshidrogenasa

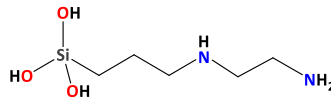
PBS: es un buffer salino de fosfatos, solución comúnmente usada en biología (phosphate buffered saline, por sus siglas en inglés)

MATERIALES

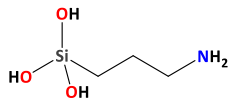
N1: 3-aminopropil-metil-dietoxisilano ($C_8H_{21}NO_2Si$),



N2: N-[3-(trimetoxisilil) propil] etilendiamina ($C_9H_{22}N_2O_3Si$),

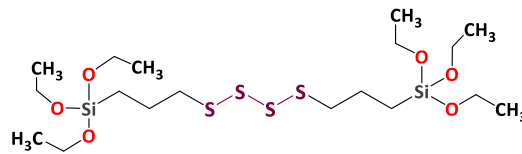


N3: 3 aminopropil-trietoxisilano,



N: igual a N2

S: Bis [3-(trietoxisilil)propil] tetrasulfuro ($C_{18}H_{42}O_6S_4Si_2$)



SBA-15: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura

SBA-15Na: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura en presencia de NaCl

SBA-N1: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 2.5% de N

SBA-N2: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 5% de N

SBA-N3: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 7.5% de N

SBA-S1: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 2.5% de S

SBA-S2: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 5% de S

SBA-S3: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, funcionalizado con el 7.5% de S

SBA-NaN: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura en presencia de NaCl, funcionalizado con el 10% de N

SBA-NaS: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura en presencia de NaCl, funcionalizado con el 10% de S

SBA-NaNS₁₁: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura en presencia de NaCl, funcionalizado con el 5% de N y el 5% de S

SBA-NaNS₃₁: material SBA-15 sintetizado a baja temperatura en presencia de NaCl, funcionalizado con el 7.5% de N y el 2.5% de S

Core-shell (Fe₃O₄)_n@C: nanopartículas esféricas con múltiples núcleos de magnetita que conforman el core, protegidos por una capa de carbono amorfo (shell)

S15_H: matriz mesoporosa ordenada de sílice tipo SBA-15 sintetizada con una disolución de HCl

S15_{HP}: matriz mesoporosa ordenada de sílice tipo SBA-15 sintetizada con una mezcla de HCl/H₃PO₄

S15G_H: matriz mesoporosa ordenada de sílice tipo SBA-15 sintetizada con glicerol y una disolución de HCl

S15G_{HP}: matriz mesoporosa ordenada de sílice tipo SBA-15 sintetizada con glicerol y una mezcla de HCl/H₃PO₄

H: NCs mesoporosos magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄) provenientes de S15_H o S15G_H

HP: NCs mesoporosos magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄) provenientes de S15_{HP} o S15G_{HP}

NCPAA: NCs mesoporosos magnéticos de S15 y NPs de magnetita funcionalizadas con PAA sintetizadas en el interior de los canales de poros de los materiales S15

NCHPAA: el mismo material que NCPAA, pero con un mayor porcentaje de magnetita funcionalizada.

NCPEI: NCs mesoporosos magnéticos de S15 y NPs de magnetita funcionalizadas con PEI, sintetizadas en el interior de los canales de poros de los materiales S15

MOA: NPs de magnetita recubiertas con ácido oleico estabilizadas en ciclohexano

LMNC: NCs mesoporosos magnéticos de S15 y NPs de magnetita ancladas covalentemente a la superficie externa del S15 mediante un recubrimiento nanométrico de SiO₂ amorfa

HMNC: el mismo material que LMNC, pero con un mayor porcentaje de magnetita

MANC: NCs mesoporosos magnéticos de S15 y agregados de NPs de magnetita con una capa de carbono amorfo, anclados covalentemente a la superficie externa del SBA-15

CSNC: NCs mesoporosos magnéticos de S15 y estructuras core-shell (Fe₃O₄)_n@C, ancladas covalentemente a la superficie externa del S15.

MNCN1: NCs mesoporosos magnéticos de S15G y NPs de magnetita ancladas covalentemente a la superficie externa del S15G mediante un recubrimiento nanométrico de SiO₂ amorfa funcionalizada con N1

MNCN2: mismo material que MNCN1 pero funcionalizado con N2

MNCN3: mismo material que MNCN1 pero funcionalizado con N3

Fe₃O₄@OA: MOA

SBA-15/Fe₃O₄@PAA: NCPAA y NCHPAA

SBA-15/Fe₃O₄@PEI: NCPEI

SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂: LMNC y HMNC

SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C: MANC Y CSNC

SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizado con NH₂: MNCN1, MNCN2 Y MNCN3

Andamio 3D: biomaterial elaborado a partir de una mezcla de polisacáridos naturales/SBA-15 o polisacáridos naturales/SBA-15/Fe₃O₄

HA: hidroxiapatita

Sc1: andamio 3D que contiene 70% de HA y 30% del material S15_{HP}

Sc2: andamio 3D que contiene 50% de HA y 50% del material LMNC_{HP}

Sc3: andamio 3D que contiene 50% de HA y 50% del material MANC_{HP}

Sc4: andamio 3D que contiene 100% del material S15_H

Sc5: andamio 3D que contiene 100% del material NCPEI_H

Sc6: andamio 3D que contiene 100% del material LMNC_H

Sc7: andamio 3D que contiene 100% del material HMNC_{HP}

Sc8: andamio 3D que contiene 100% del material NCPAA_{HP}

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

DRX: difracción de rayos X (por sus siglas en español)

AQE: análisis químico elemental (por sus siglas en español)

IR-TF: microscopía infrarroja por transformada de Fourier (por sus siglas en español)

TGA/DTG: termogravimetría y primera derivada de la curva de termogravimétrica

BET: porosimetría de adsorción de N₂ por el método de Brunauer-Emmett-Teller

BJH: Diámetro de poro por el método de Barrett-Joyner-Halenda

NLDFT: Tamaño de poro por el método Non-Local Density Functional Theory (por sus siglas en inglés)

MEB: microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en español)

MET: microscopía electrónica de transmisión (por sus siglas en español)

RMN-²⁹Si: resonancia magnética nuclear de silicio 29 (por sus siglas en español)

MAS: técnica de RMN conocida como *rotación en el ángulo mágico*, utilizada para realizar experimentos en estado sólido.

VSM: magnetometría de muestra vibrante (por sus siglas en inglés, vibrating sample magnetometer)

RMI: imagen por resonancia magnética

fMRI: imagen por resonancia magnética funcional (Functional magnetic resonance imaging or functional MRI por sus siglas en inglés)

PIM: porosimetría de intrusión de mercurio

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos de la medicina en este siglo, es el desarrollo de técnicas de diagnóstico precoz para numerosas enfermedades; así como, el diseño y desarrollo de una nueva generación de nanosistemas destinados a la regeneración de órganos, tejidos y funciones dañadas dentro del cuerpo humano; dado que la pérdida parcial o total de los mismos representa uno de los problemas más costosos, difíciles y de mayor gravedad que ha enfrentado la humanidad en los últimos años, el cual se ha incrementado aceleradamente debido al estilo de vida, el crecimiento poblacional, las demandas sociales, las necesidades clínicas, el desarrollo tecnológico, entre otros. De esta forma, encontrar una solución adecuada a estos retos podría tener una gran repercusión en nuestra sociedad en un futuro cercano, por lo tanto, el objetivo que se persigue al utilizar biomateriales vanguardistas, es salvar vidas, mejorar la calidad de vida, reducir el sufrimiento y contribuir a llegar en mejores condiciones físicas y mentales al final de nuestra vida.

El SBA-15 representa un interesante campo de investigación y desarrollo para la obtención de biomateriales de tercera generación destinados a inducir la regeneración de los tejidos, proporcionando un andamiaje apropiado para las células. Debido a sus propiedades sobresalientes y a la posibilidad de funcionalizar y nanoestructurar de manera fisicoquímica y topográfica su superficie, es posible diseñar nuevas cerámicas como punto de partida para ensayos mecánicos, estudios en cultivos celulares, ensayos *in vitro* e *in vivo*, que conduzcan a la fabricación de implantes con el valor añadido de poder incluir fármacos tales como antibióticos, antiinflamatorios, anticancerígenos, entre otros, para ser posteriormente liberados de forma gradual. Sin duda alguna, si la distribución de poros de la matriz cerámica es ordenada, la adsorción y liberación del fármaco correspondiente será homogénea teniendo el valor añadido de lograr resultados reproducibles, la adsorción y la liberación también dependerá de las propiedades texturales, estructurales y químicas de la matriz cerámica.

Los nanosistemas de sílice mesoporosa/NPs magnéticas aplicados a bionanotecnología y nanomedicina representan un prometedor progreso, integrando tanto funciones terapéuticas como de diagnóstico, su desarrollo está motivado por la búsqueda de nanomateriales para medicina personalizada. Entre los más novedosos nanotransportadores multifuncionales, las NPs magnéticas de sílice mesoporosa son una de las plataformas teranósticas de mayor potencial, no sólo poseen tamaños a nanoescala que cumplen con los requisitos para aplicaciones *in vivo*, sino que también son un nanocomposite capaz de provocar efectos sinérgicos a través de las nanopartículas superparamagnéticas y la nanoestructura mesoporosa con canales de poro modulables. En este sentido las NPs magnéticas proporcionan una mejora del contraste para resonancia magnética de imagen (MRI), las cuales además pueden ser magnéticamente dirigidas mediante la aplicación de un campo magnético adecuado. Por su parte la sílice mesoporosa funge como sistema de liberación controlada de fármacos y como una estructura soporte.

2. ANTECEDENTES

2.1. NANOTECNOLOGÍA

La investigación del comportamiento de la materia a escala nanométrica abre una prometedora perspectiva de nuevos conocimientos. Cuando las dimensiones de las partículas de un sólido tienen una dimensión del orden de 100 nanómetros, equivalente aproximadamente a un millar de átomos, la mayoría de ellos se encuentran situados en la superficie de las partículas; por lo tanto, las propiedades físicas de estas partículas son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño normal o macroscópico con la misma composición química. Hoy en día, es habitual utilizar técnicas experimentales que permitan fabricar, caracterizar y manipular materiales de tamaño nanométrico como: nanopartículas, nanocomposites, nanosistemas, nanocristales, nanoláminas, entre otros¹.

La nanotecnología surge como una disciplina poderosa capaz de proporcionar soluciones originales y novedosas en distintos campos de la ciencia (biomedicina, óptica, materiales, química, física, biología, de alimentos, energética...), la ingeniería y la tecnología. Particularmente en el ámbito de la biomedicina, los nanomateriales han adquirido recientemente un gran interés debido a la gran variedad de aplicaciones que pueden llegar a tener. La utilización de nanomateriales en biomedicina como área multidisciplinaria, requiere del trabajo conjunto de especialidades aparentemente muy alejadas entre sí, que pueden ir desde la física, las ingenierías, la ciencia de materiales hasta la medicina, la biología y la química. Los nuevos nanomateriales poseen múltiples aplicaciones relacionadas tanto con el diagnóstico como con la terapia de enfermedades neurológicas, músculo-esqueléticas, distintos tipos de cáncer, entre otras².

2.2. INGENIERÍA DE TEJIDOS

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se han abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos, sin embargo, esta opción se ve limitada por la baja disponibilidad de donantes³. Según el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), en el primer trimestre del 2016 se registraron en México 20,320 pacientes en espera de algún tipo de trasplante,

no obstante, es sabido que cada año muere un gran número de pacientes en listas de espera (alrededor de un 40 %) y, más grave aún, muchos otros no llegan siquiera a integrarlas^{4,5}.

Esta creciente necesidad de órganos ha llevado a los investigadores a plantear la posibilidad de utilizar células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos, para dar así nacimiento a una disciplina conocida hoy como Ingeniería de Tejidos (IT)⁶, la cual se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos⁷.

La IT tiene como estrategia la regeneración de partes dañadas del organismo, la cual es claramente distinta a la de los implantes biomédicos tradicionales utilizados en la actualidad. De esta forma, la reparación del cuerpo humano pasa de enfocarse en una aproximación biónica a hacerlo en una aproximación a la medicina regenerativa con dos vertientes, la ingeniería de tejidos y la terapia celular, que utilizan biomateriales de tercera generación. Buscando como objetivo el desarrollo de compuestos biológicos y biomateriales implantables en el organismo, con intención de regenerar, reparar, mantener o mejorar la función de órganos y tejidos⁸.

Particularmente, la Ingeniería de tejido óseo se sustenta en tres pilares, las células responsables de la osteogénesis (capacidad de producir tejido óseo), los factores bioquímicos: señales y factores de crecimiento responsables de la osteoinducción (capacidad para promover la formación de hueso), y los andamios, fabricados con biomateriales naturales y/o sintéticos, responsables de la osteoconducción (capacidad para permitir y favorecer el crecimiento y organización del tejido óseo)⁸, como se muestra en la figura 2.1.

Lo más sencillo para la Ingeniería de tejidos es implantar directamente el andamio con los únicos requisitos de ser biocompatible, poroso, biodegradable o reabsorbible, osteoconductor y con unas propiedades mecánicas mínimas; sin embargo, lo que en realidad se busca, es sembrar células del propio paciente previamente en el andamio, antes de implantarse. Otras dos opciones de la IT serían, implantar el andamio funcionalizado con diversas moléculas como factores bioquímicos, o implantar el andamio donde estén incluidas tanto señales como células. Estos andamios tridimensionales deben tener una porosidad con un tamaño de diámetro que permita la entrada de las células que va alojar.

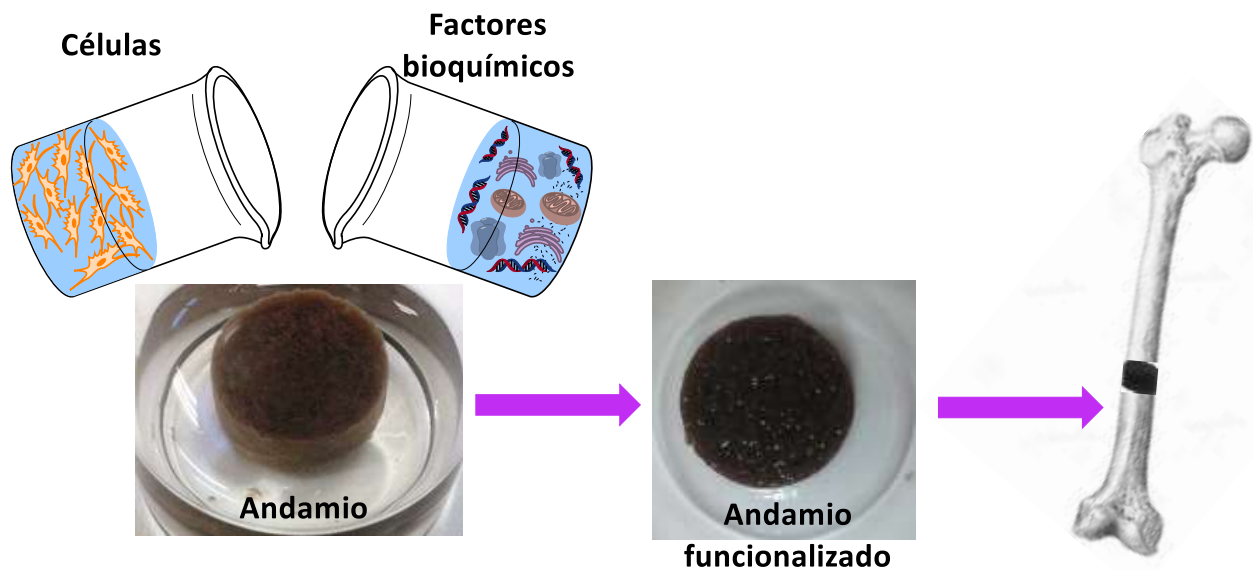


Figura 2.1. Esquema representativo de los 3 pilares en los que se sustenta la Ingeniería Tisular.

Los andamios ideales para ingeniería de tejidos deben ser biocompatibles, proporcionar un soporte mecánico que pueda sostener temporalmente la carga mecánica del tejido a considerar, tener una tasa de degradación apropiada, equivalente a la del proceso de regeneración del tejido y una porosidad interconectada con una elevada área superficial y una distribución de tamaño de poro adecuada que promuevan la adhesión, migración, proliferación, diferenciación celular y el tráfico de metabolitos. Si además permite adsorber y liberar de forma controlada fármacos, factores morfogénicos, entre otros, sería más que ideal⁸.

2.3. BIOMATERIALES

El término biomaterial fue por primera vez definido en el año de 1976 en la primera Conferencia de la Sociedad Europea de Biomateriales, siendo el siguiente: *“un biomaterial es todo aquel material usado como dispositivo médico destinado a interactuar con los sistemas biológicos”*, esta definición cambio rápidamente a *“material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”*⁹. Sin embargo, la gran importancia que han cobrado los biomateriales últimamente en el campo biomédico ha llevado a la publicación de una nueva definición: *“un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma definida, la cual por sí sola o como parte de un sistema más complejo, es usada para dirigir mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivientes, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico en la medicina humana o veterinaria”*¹⁰.

Al implantarse un biomaterial se genera una reacción en los tejidos vivos receptores, produciéndose un proceso inflamatorio, mismo que puede estar influenciado por otros procesos como: corrosión, degradación, abrasión, entre otros^{9, 11, 12}. Sin embargo, también la respuesta de los tejidos puede favorecer la incorporación del material, interactuando directamente con los componentes del tejido, resultando en la reparación del defecto o acelerando el proceso de regeneración de una lesión^{10, 13}.

Un estudio detallado de cualquier biomaterial debe considerar la valoración de los siguientes aspectos:

- ◆ Las características fisicoquímicas del material, tales como, composición, densidad, microestructura, propiedades termodinámicas, entre otras.
- ◆ Las propiedades mecánicas principales como elasticidad, resistencia y dureza.
- ◆ La estimación en un banco de pruebas de desgaste, fricción, fatiga, corrosión y envejecimiento del biomaterial.
- ◆ La evaluación biológica, que comprende el estudio de la biocompatibilidad del material.

Previo al empleo de cualquier biomaterial en la clínica humana es fundamental determinar su biocompatibilidad. Este concepto hace referencia al grado de aceptación de un material por parte del organismo^{14, 15}; misma que puede estudiarse evaluando los siguientes eventos:

- ◆ La interacción entre los biomateriales y tejidos receptores.
- ◆ La reacción resultante de la degradación del material.
- ◆ Los factores mecánicos involucrados.

El objetivo principal de los estudios de biocompatibilidad es analizar las posibles respuestas adversas, tales como, inflamación, pirogenicidad, toxicidad sistémica, sensibilización, mutagenicidad y carcinogenicidad. Además, estos ensayos permiten determinar el comportamiento y actuación de los nuevos materiales. El riesgo biológico de la utilización de los biomateriales depende de la composición química del material, de su actividad específica, de la concentración y de la frecuencia y/o del tiempo de exposición. Los ensayos de biocompatibilidad deben llevarse a cabo en condiciones similares a su aplicación en la clínica humana¹⁶.

Los factores que influyen en la biocompatibilidad de un material son los siguientes:

- ⊙ Factores químicos: La composición del material determina en gran medida su potencial toxicidad. Por ejemplo, los polímeros pueden ser tóxicos por sí mismos o por la acción de sus productos de degradación.
- ⊙ Factores eléctricos: Las corrientes de polarización anódica o catódica que presentan los metales condicionan su corrosión. Por ejemplo, la polarización anódica provoca la disolución de iones metálicos en el organismo.
- ⊙ Factores superficiales: La superficie de un material puede tener características hidrofílicas o hidrofóbicas, lo que condiciona la aptitud de las proteínas para la adsorción y, secundariamente, su tolerancia. En general, los materiales de superficie hidrófila son mejor tolerados, debido a que el agua es el principal componente del cuerpo humano.
- ⊙ Factores mecánicos: Las interacciones en la interfase entre el tejido y el biomaterial condicionan la respuesta tisular. Es el caso de los implantes intraóseos en que se puede producir la formación de tejido fibroso mediado por fuerzas de tracción o de cizallamiento, o de tejido óseo, por interacción de compresión.
- ⊙ Factores geométricos: La respuesta a un mismo material depende de la granulometría, geometría y cantidad de éste, de tal manera que la reacción es distinta si la formulación es compacta o particulada. En general, el implante en forma de partículas genera una respuesta cuantitativamente mayor¹⁴.

2.4. ANDAMIOS 3D

Los "Andamios" 3D, son biomateriales de alta porosidad que actúan como patrones para la regeneración, guiando el tejido en su crecimiento. En este apartado se explicarán de forma resumida los requerimientos funcionales, tipos y materiales utilizados en la elaboración de estas estructuras¹⁷.

El término de andamio fue considerado debido a su significado como una estructura de soporte para construcción. Dependiendo del tipo de tejido a reparar o regenerar, habrá un número determinado de consideraciones a tener en cuenta en el diseño y determinación del andamio más adecuado, como son¹⁸:

- a) Biocompatibilidad: anteriormente discutida, es el primer y más importante criterio a cumplir, ya que las células deben adherirse a él, funcionar normalmente y migrar sobre la superficie o

a través de ella. De esta forma un andamio biocompatible no presentará una respuesta negativa inmunitaria, inflamaciones o rechazo.

- b) Biodegradabilidad: Los andamios no son entendidos como un implante permanente, por lo que deben ser biodegradables de modo que permitan a las células desarrollar sus propias matrices de crecimiento. Los productos resultantes de esta degradación, por supuesto, deberán ser no-tóxicos.
- c) Propiedades mecánicas: De una forma ideal, el andamio deberá poseer propiedades mecánicas en consecuencia con el sitio donde va a ser implantado, siendo lo suficientemente fuerte como para soportar los esfuerzos mecánicos durante su implantación y durante el proceso de reconstrucción del tejido. En este punto el reto está en dotar al andamio de un equilibrio entre unas buenas propiedades mecánicas y una arquitectura porosa que permita la infiltración de las células y la vascularización, aumentando las posibilidades de éxito.
- d) Arquitectura del andamio: Los andamios deben tener una estructura porosa interconectada para asegurar la penetración celular y una adecuada difusión de los nutrientes a las células dentro de la estructura y a la matriz extra-celular formada por las mismas. Además, una estructura porosa interconectada no sólo permite una adecuada difusión, sino también la evacuación de los productos fruto de la degradación, impidiendo que influyan negativamente en otros órganos o tejidos circundantes del cuerpo. Un factor clave es el tamaño medio de poro, lo suficientemente grande como para permitir la migración de células dentro de la estructura, donde eventualmente se unirán a los ligandos grupos químicos con los que las células podrán interactuar sobre la superficie del material. Además, el tamaño de poro debe ser el adecuado para tener una suficiente superficie específica que lleve a una eficiente unión de un número crítico de células. Para cada andamio, existirá un tamaño de poro crítico que va a depender del tipo de células usadas y del tejido a tratar.
- e) Tecnología de fabricación: Para que un andamio o tejido particular sean considerados como viables desde un punto de vista clínico y económico, debería ser posible fabricarlos en un laboratorio de producción a pequeña escala con costes asumibles.

El punto clave es la elección de los materiales de partida con los cuales se fabricará el andamio, que determinarán cualquiera de los criterios expuestos en este apartado. Para la fabricación de andamios 3D para ingeniería de tejidos, se utilizan tres tipos básicos de materiales de partida^{18,19}:

- ◆ Cerámicas.
- ◆ Polímeros sintéticos.
- ◆ Polímeros naturales.

Los andamios cerámicos se caracterizan por una alta rigidez mecánica, baja elasticidad y una superficie frágil y dura. Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos óseos, muestran una excelente biocompatibilidad por su similitud química y estructural. Las interacciones entre las células osteogénicas con la cerámica son importantes para la regeneración ósea, ya que las cerámicas son conocidas por mejorar la diferenciación y la proliferación osteoblástica^{17, 20, 21}.

En el caso de los polímeros sintéticos, muchos han sido usados para producción de andamios, como poliestireno, ácidos: poliláctico (PLA), poliláctico-co-glicólico (PLGA), poliglicólico (PGA), etc. Estos materiales son altamente utilizados, debido a que son muy moldeables y se adaptan fácilmente a cualquier arquitectura. Además se puede controlar el tiempo de degradación de los mismos, variando la cantidad, la composición, el grado de polimerización... del o de los polímeros involucrados en la elaboración de un andamio. Sin embargo los procesos de degradación de algunos polímeros pueden ser tóxicos, por ejemplo la degradación del PLA y el PGA se producen mediante hidrólisis, generando dióxido de carbono, lo que disminuye el pH local, por lo que existe el riesgo de necrosis del tejido^{19, 22}.

La tercera posibilidad es la utilización de polímeros biológicos como el colágeno, los proteoglicanos, sustratos de base alginato, quitosano, los carragenatos, entre otros. A diferencia de los polímeros sintéticos, los naturales son biológicamente activos y muestran una excelente adhesión y proliferación celular. Además, son biodegradables, lo que permite a las células huésped producir sus propias matrices extracelulares y reemplazar el andamio degradado. Sin embargo la fabricación de andamios basados en polímeros naturales con propiedades homogéneas y reproducibles presenta muchas dificultades. Además, de que ostentan bajas propiedades mecánicas, lo que limita su uso, por ejemplo, en aplicaciones ortopédicas^{21, 22, 23}.

Los problemas expuestos han tratado de ser solucionados fabricando andamios a partir de nanocomposites, desarrollándose combinaciones donde se introducen cerámicas en andamios de base polimérica u otras donde se combinan polímeros sintéticos con naturales, para mejorar la capacidad biológica y mecánica. Además existe la posibilidad de incorporar fármacos/agentes biológicos en los biomateriales diseñados para la reconstrucción o regeneración de tejidos contrarrestando así a nivel local posibles respuestas inflamatorias, infecciosas, entre otras^{8, 10}.

2.5. MATERIALES MESOPOROSOS DE SÍLICE (MMS)

2.5.1. Sólidos Porosos

Un gran número de procesos y reacciones químicas de interés tienen lugar en la interfase entre un medio fluido y un sólido poroso, el resultado final de la interacción entre ambas depende, en buena medida, de las características del sistema poroso del sólido. Este hecho ha conducido al desarrollo de metodologías específicas para la síntesis de materiales con la porosidad más adecuada para la función que se desea que cumplan. Ejemplos bien conocidos son el carbón activado, la alúmina y la sílice, cuyas características porosas pueden modificarse, dentro de ciertos límites, mediante el control adecuado de sus respectivos procedimientos de preparación^{8, 11, 24}. El comportamiento de esos materiales se encuentra también limitado por la presencia de una ancha distribución de tamaños de poros, que pueden variar desde un nanómetro (e incluso inferiores) hasta varias micras, lo cual impide, por ejemplo, su aplicación efectiva en procesos en los que se requiera la adsorción selectiva de ciertas moléculas en función de su tamaño. Por el contrario, esta función la cumplen de manera muy eficaz una familia de silicatos llamada Zeolitas, que actúan como tamices moleculares al adsorber sólo aquellas moléculas lo suficientemente pequeñas como para penetrar en un sistema de poros, que es accesible únicamente a través de aperturas que tienen un diámetro de unos pocos Angstrom²⁵.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) establece una clasificación del tamaño de los poros, según sea el valor de su diámetro promedio, distinguiéndose así tres grandes grupos²⁶:

- ◆ Microporos: poros con diámetros medios inferiores a 2 nm
- ◆ Mesoporos: con diámetros medios comprendidos entre 2 y 50 nm.
- ◆ Macroporos: con diámetros medios superiores a 50 nm.

La síntesis, modificación y funcionalización de los diversos nanosistemas condicionan la arquitectura final del sólido, así como la manera en la que estas piezas se organizan en estructuras más complejas²⁴. En los últimos años, una de las áreas que más ha llamado la atención de la comunidad científica, ha sido el control de la estructura de sólidos porosos a varias escalas²⁵, debido a sus interesantes aplicaciones en catálisis, separación, adsorción, sensores y biomedicina^{24, 25}. Para conseguir un control preciso de la organización de estos sólidos, ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas sintéticas y biomiméticas, y la utilización conjunta de precursores inorgánicos y biomateriales.

2.5.2. Origen de los MMS

El descubrimiento de los materiales mesoporosos ordenados de sílice se originó en 1992 por investigadores de la compañía Mobil Oil, dando lugar a lo que se conoce como la familia de materiales M41S, donde se sitúan el MCM-41, MCM-48 y MCM-50^{27, 28, 29}. A posteriori se sintetizaron otras familias de materiales mesoporosos, como las series SBA, desarrolladas en 1998, por Zhao y colaboradores, científicos de la Universidad de Santa Barbara³⁰; MSU (Michigan State University)³¹; KIT-1 (Korea Advanced Institute Of Science and Technology nº1)³² y FSM-16 (Folded Sheet Material nº16)³³. Todos estos materiales se caracterizan por tener propiedades sobresalientes, tales como una mesoestructura estable, elevadas áreas superficiales, grandes volúmenes de poro, estrechas distribuciones de tamaño de poro y sistemas de canales de poro homogéneos y ordenados, organizados en mesoestructuras hexagonales (2D), entre los que se encuentra el SBA-15, o cúbicas (3D). Las propiedades texturales y estructurales de los materiales mesoporosos pueden ser modificadas mediante la selección del método de síntesis apropiado⁸.

2.5.3. Síntesis de los MMS

La síntesis está basada en la utilización de moléculas orgánicas a modo de "plantillas", que dirigen la formación de sólidos a su alrededor. Tales plantillas se caracterizan por conservar su forma y tamaño original durante la síntesis del material nanoestructurado, para posteriormente ser eliminadas en un proceso que da lugar a materiales con una porosidad controlada. Para que un compuesto orgánico pueda ser considerado como una plantilla molecular, debe poseer^{34, 35}:

- a) Estabilidad química en el medio de reacción.
- b) Interacción específica con el precursor del sólido.
- c) Posibilidad de ser eliminado una vez finalice la reacción de síntesis.

Las moléculas de surfactante cumplen con el criterio anterior, actuando como agentes directores de la formación de la estructura de sílice en disolución acuosa. Los surfactantes se definen como sustancias anfífilas, es decir, que poseen una doble afinidad que desde el punto de vista fisicoquímico, se define como una dualidad polar-apolar. La molécula anfífila típica consta de dos partes; por un lado, un grupo polar o cabeza, que contiene heteroátomos como O, S, P, o N, los cuales se encuentran en grupos: alcohol, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida...; y por otro, un grupo apolar o cola, que suele ser un grupo hidrocarbonado de tipo alquil o alquil benceno que puede contener, eventualmente, átomos de halógeno u oxígeno^{34, 35}. De esta forma, la parte

polar tiene afinidad por los solventes polares, agua en particular, denominándose comúnmente como parte hidrófila o hidrofílica; mientras, que la parte o grupo apolar se denomina parte hidrófoba o hidrofóbica. Así, los surfactantes pueden clasificarse en función de su carga, figura 2.2, en:

- ◆ Iónicos: Presentan una o más cargas en su cabeza polar.
 - Aniónicos: Cargados negativamente.
 - Catiónicos: Cargados positivamente.
 - Anfóteros: Presentan una carga positiva y una negativa. Su carga neta es cero.
- ◆ No iónicos: No presentan cargas superficiales, como es el caso del Pluronic® 123, plantilla precursora en la formación del SBA-15.

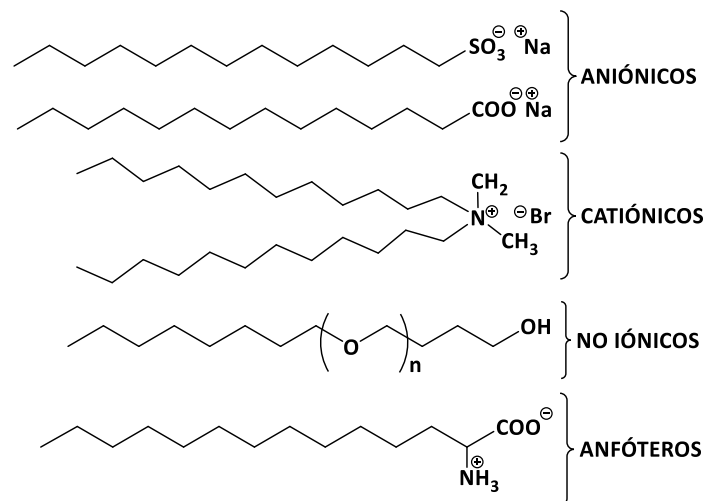


Figura 2.2. Tipos de surfactantes según su carga.

Debido a esta doble afinidad, la molécula anfifílica se encuentra en una disyuntiva dentro de un solvente, puesto que siempre existirá una interacción que no será satisfecha. Para minimizar este efecto, estas moléculas muestran una fuerte tendencia a migrar a las interfaces, de modo que el grupo polar se sitúa dentro del agua y el grupo apolar queda orientado hacia un solvente orgánico o hacia la superficie. Cuando la concentración del surfactante alcanza un valor umbral conocido como *concentración micelar crítica*, las moléculas tienden a formar agregados denominados *micelas*³⁶, donde su forma y tamaño depende de la naturaleza y composición química de la molécula del surfactante, de su concentración y de la temperatura. Otros factores como el pH de la disolución y la concentración salina total también influyen en el proceso de agregación. La asociación de moléculas anfifílicas se da con el objetivo de reducir la superficie de contacto de las regiones hidrofóbicas con el solvente acuoso³⁶. Las moléculas descritas pueden formar las estructuras mostradas en la figura 2.3, en función de su forma y características.

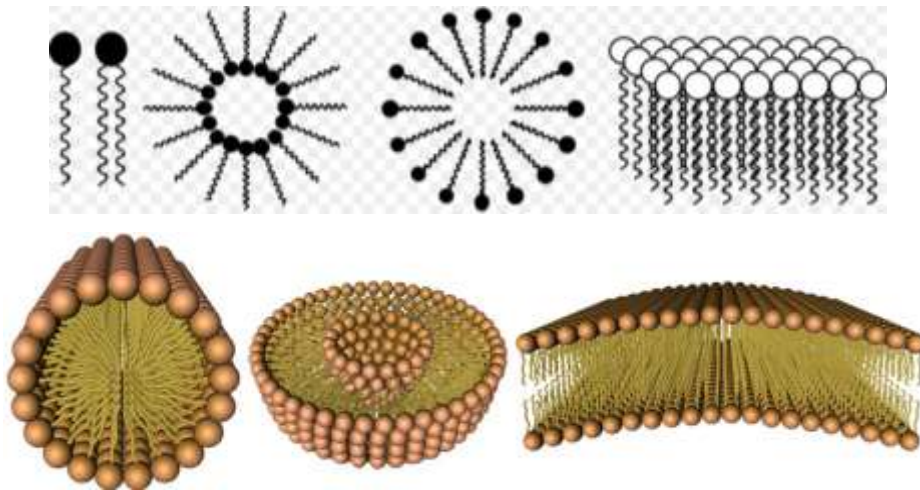


Figura 2.3. Tipos de arreglos micelares³⁷.

Particularmente para la formación de las MMS, las micelas tenderán a agregarse para formar estructuras supramicelares determinando su estructura final; en función de las condiciones síntesis, éstas serán hexagonales, cúbicas o laminares³⁸. El parámetro de empaquetamiento g ³⁵ y el tipo de surfactante pueden definir el tipo de estructura a obtener. El parámetro de empaquetamiento se define como:

$$g = \left(\frac{V}{a_0 * l_c} \right)$$

donde V se define como el volumen total de la porción hidrófoba del surfactante, a_0 el área superficial del grupo que forma la cabeza del surfactante y l_c es la longitud de la cadena hidrófoba (figura 2.4). Según el resultado, la estructura del surfactante será de un tipo u otro, si $g < 1/3$ se formaran fases hexagonales o cúbicas; si $1/3 < g < 1/2$ se formaran micelas cilíndricas que dan como resultado estructura hexagonal plana, como es el caso del SBA-15, y si $g > 1/2$ se obtendrán fases laminares.



Figura 2.4. Esquema de los parámetros de empaquetamiento.

La síntesis del SBA-15 es relativamente sencilla y da lugar a un material mesoestructurado biocompatible, lo que unido a su coste y ausencia de toxicidad lo hace muy interesante, sobre todo en aplicaciones biomédicas³⁹, a diferencia de otras MMS que presentan estructura ordenada hexagonal 2D y características similares como es el caso del MCM-41, el SBA-15 posee un sistema de canales de poros interconectados, lo que lo asemeja más a la arquitectura de los huesos, permitiéndole con mayor facilidad el flujo de sustancias como fármacos, nutrientes, metabolitos, moléculas de desecho, entre otras. Por otra parte, el uso del copolímero tribloque (Pluronic P123[®]) conlleva a la obtención de diámetros de poro grandes (8-9 nm) y paredes gruesas (5 nm), lo que genera un material muy estable^{40, 41}, en comparación con el MCM-41 con un D_p de 1-3 nm y paredes de 2-3 nm. Así mismo, el SBA-15 presenta una baja microporosidad, alta mesoporosidad ordenada y monodispersa y una alta superficie específica, características que pueden ser modificadas en función de los parámetros de síntesis utilizados^{42, 43, 44}.

2.5.4. Mecanismos de formación de los MMS

Hay dos mecanismos propuestos para la formación de los materiales mesoporosos de sílice, figura 2.5:

- ◆ **Cristal líquido (TLCT):** donde el surfactante es el director de la estructura sin que el precursor de sílice inorgánico intervenga en el proceso.
- ◆ **Interacciones orgánico-inorgánico:** postula que las interacciones orgánico-inorgánico de tipo electrostático entre la fase inorgánica de sílice y la fase micelar en medio acuoso, son las determinantes de los distintos tipos de interacciones existentes.

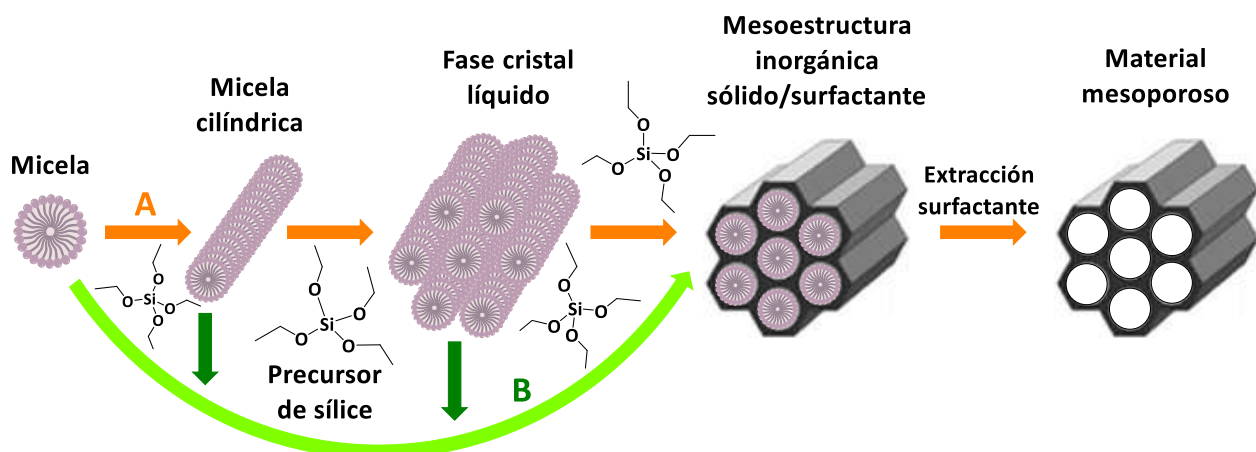


Figura 2.5. Formación de materiales mesoporosos: **A)** mecanismo de cristal líquido (TLCT) y **B)** interacciones orgánico-inorgánico.

Al ser el segundo método el más aceptado, con una correcta elección del surfactante y de las condiciones de síntesis, es posible controlar las interacciones entre la pared inorgánica y la parte polar del surfactante para lograr la ionización del precursor inorgánico. Estas interacciones se pueden clasificar de la siguiente forma (figura 2.6)^{42, 45}.

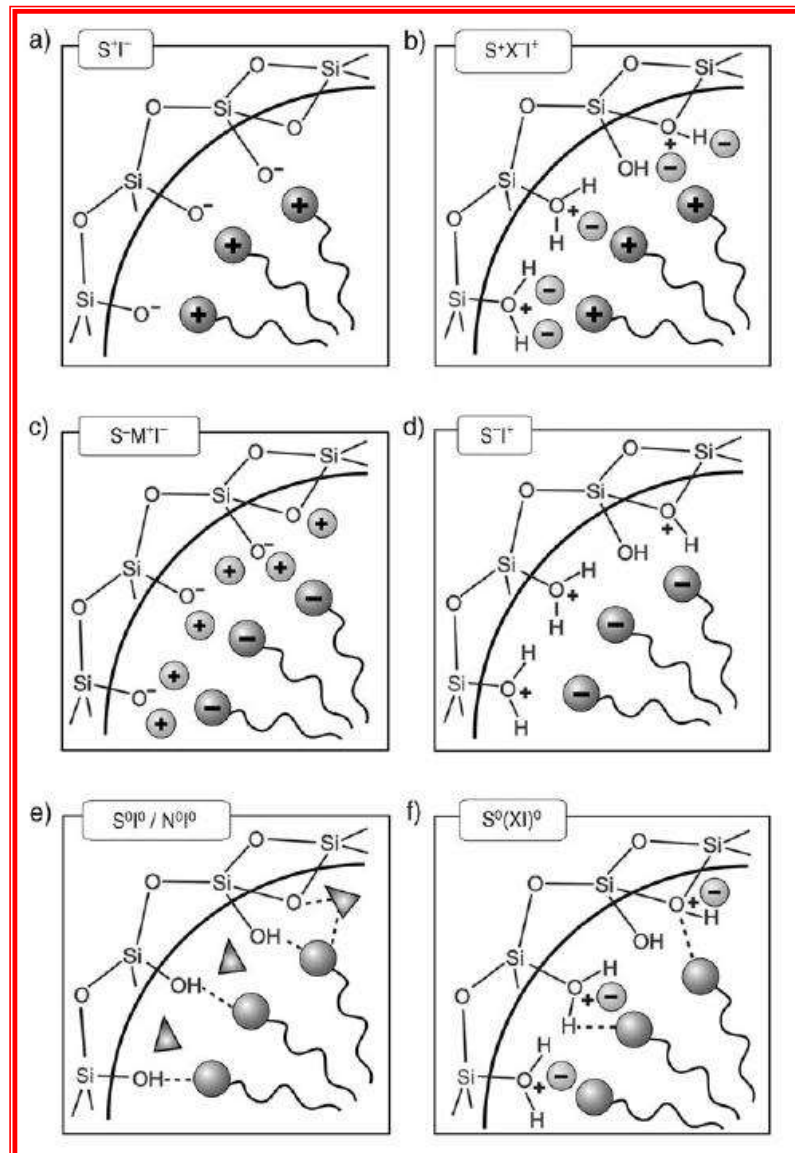


Figura 2.6. Interacciones entre las especies inorgánicas y el grupo de cabeza del surfactante (S: Surfactante; I: especie inorgánica).

- S^+I^- : La reacción tiene lugar en medio básico y un surfactante catiónico. De este modo las especies de sílice se encuentran como aniones (es el caso de los mesoporosos de la familia M41S).
- S^+XI^+ : Se lleva a cabo bajo condiciones ácidas ($pH < 2$) por debajo del punto isoelectrónico de la sílice, para que estas especies se puedan protonar. Se produce una interacción con el

surfactante catiónico y por ello es necesaria la presencia de un contraión X^- , normalmente un haluro.

- c) $S^-M^+I^-$: Cuando se trabaja con surfactantes cargados negativamente es posible trabajar en medio alcalino, pero es necesario el uso de un mediador alcalino M^+ .
- d) S^-I^- : Se emplean surfactantes aniónicos y paredes inorgánicas catiónicas en medio ácido.
- e) S^0I^0/N^0I^0 : se emplean surfactantes neutros y las interacciones se producen por enlaces de hidrógeno entre los átomos del surfactante y la sílice hidroxilada sin carga. (S^0 : amina de cadena larga; N^0 : Polioxietileno)
- f) $S^0(XI^0)$: se produce por formación de pares iónicos actuando el anión X^- como mediador catalizando la hidrólisis de los alcoxisilanos, es el caso de la síntesis de SBA-15 en presencia de Cl^- ⁴⁶.

Una vez sintetizado el material, se debe eliminar el surfactante para dotar al material mesoporoso resultante de las propiedades texturales finales.

2.5.5. Funcionalización de los MMS

La complejidad de estos sistemas híbridos ha permitido la adaptación de sus propiedades en función de sus necesidades específicas. En mucho de los casos, principalmente en el área biomédica y en lo que respecta a la liberación selectiva y controlada de fármacos, es necesario modificar orgánicamente la superficie interna y externa de las paredes de los mesoporos de sílice a través de la unión covalente de uno o varios grupos funcionales. Gracias a que los materiales mesoporosos de sílice presentan una elevada concentración de grupos silanol (Si-OH) en su superficie, como consecuencia de la existencia de defectos estructurales^{8, 10, 47}; es fácil incorporar un funcionalizante trialcoxisilano que posea una estructura similar al precursor inorgánico. De esta manera, los componentes orgánicos modificarán las propiedades superficiales, texturales y biológicas de los materiales de acuerdo a su aplicación, proporcionando a su vez flexibilidad al esqueleto, mientras que las paredes inorgánicas de sílice ofrecen estabilidad térmica, mecánica y estructural.

Dos de los métodos más usados para la síntesis de materiales mesoporosos funcionalizados con compuestos orgánicos son^{48, 49, 50, 51}: a) la condensación simultánea del correspondiente compuesto de sílice y el precursor orgánico, llamado método de co-condensación, y b) método de post-síntesis, cuando la modificación se produce en los poros del material inorgánico una vez se ha eliminado el surfactante.

2.5.5.1. Método de co-condensación

Este método de funcionalización consiste en la condensación conjunta de las especies precursoras orgánicas (trialcoxisilanos $(R'O)_3SiR$) y los precursores silíceos (tetraalcoxisilanos, TEOS ó TMOS). Así, en presencia de los agentes directores de la estructura, los residuos orgánicos se unen covalentemente a las paredes de los poros. La principal ventaja de este método es que no se necesitan tratamientos posteriores y los grupos orgánicos quedan distribuidos e incorporados homogéneamente a lo largo de la superficie de los poros, evitando el bloqueo de los poros del material mesoporoso, como se muestra en la figura 2.7^{48, 49, 50}. Sin embargo, cada función incorporada a la matriz sólida representa un defecto en la red, la estabilidad de la mesofase puede ser un problema; como resultado, el porcentaje de modificación orgánica es limitado, ya que altas grados de funcionalización pueden producir materiales estructuralmente inestables⁵², así mismo, la distribución de poro es menos homogénea según se va aumentando la cantidad de trialcoxisilanos. La eliminación del surfactante se realiza mediante la extracción con disolventes, la calcinación no es apropiada debido a que ocasionaría la pérdida del grupo orgánico. Los materiales presentan propiedades catalíticas y de adsorción^{53, 54}.

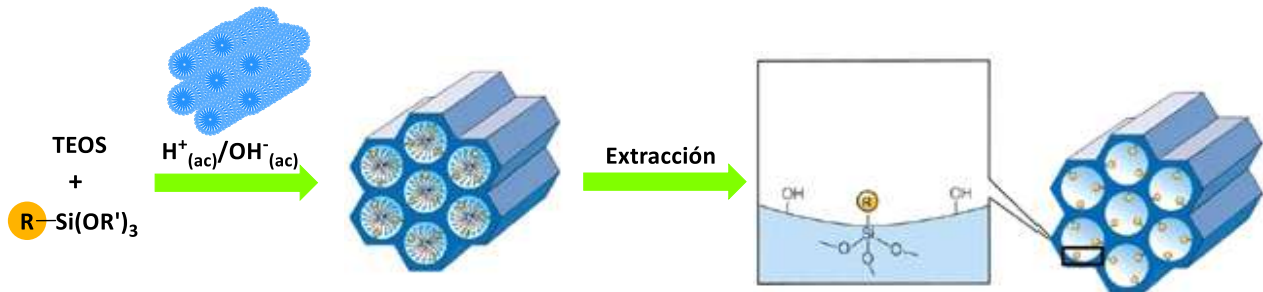


Figura 2.7. Modificación orgánica de un mesoporoso de base sílice por el método de co-condensación.

2.5.5.2. Método de post-síntesis

La funcionalización por post-síntesis se produce por la reacción de compuestos organosilanos $((R'O)_3SiR)$ con los grupos silanol libres que hay en las superficies del poro (figura 2.8). Este anclaje puede ser por una unión covalente o de coordinación. Por este método, todos los grupos orgánicos quedan expuestos en la superficie más externa y el grado de funcionalización de los MMS depende exclusivamente de los lugares de anclaje disponibles que tenga la molécula funcionalizante. La eliminación del surfactante por calcinación reduce enormemente la cantidad de grupos silanol disponibles para una posterior funcionalización^{53, 54, 55}.

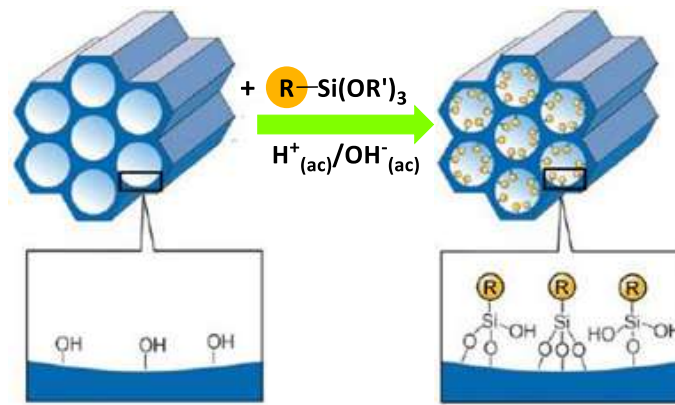


Figura 2.8. Método de post-síntesis para la modificación orgánica de un material mesoporoso.

Esta funcionalización se puede llevar a cabo con una gran variedad de grupos orgánicos y en un porcentaje alto. Por este método la mesoestructura final no presenta alteración; sin embargo, se reduce la porosidad y notablemente el diámetro de poro del material, así mismo, la distribución de los funcionalizantes es poco homogénea. Estos compuestos presentan propiedades adsorbentes y en catálisis. Además hay estudios que demuestran sus propiedades como sensores ópticos o controladores fotoquímicos^{53, 54, 55}.

2.5.6. Aplicaciones biomédicas de los MMS

2.5.6.1. Sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos y otras entidades biológicas

Cualquier cerámica que disponga de numerosos poros con un tamaño adecuado para alojar a las moléculas de fármaco que se deseen incluir, son buenas candidatas para utilizar en liberación controlada. El primer paso para obtener una cerámica apta, requiere del control en el número, tamaño, forma, distribución, conectividad y la posible funcionalización de los poros, en función del fármaco que se quiera utilizar^{47, 56}, por ejemplo, el ibuprofeno en su dimensión más larga mide 1 nm, la gentamicina 0.9 nm y el cis-platino 0.5 nm, como se observa en la figura 2.9. Una gran cantidad de fármacos tiene un tamaño del orden del nanómetro; por tanto, cualquier material poroso puede albergar fácilmente estas moléculas si sus poros tienen tamaños superiores al nanómetro^{57, 58, 59}.

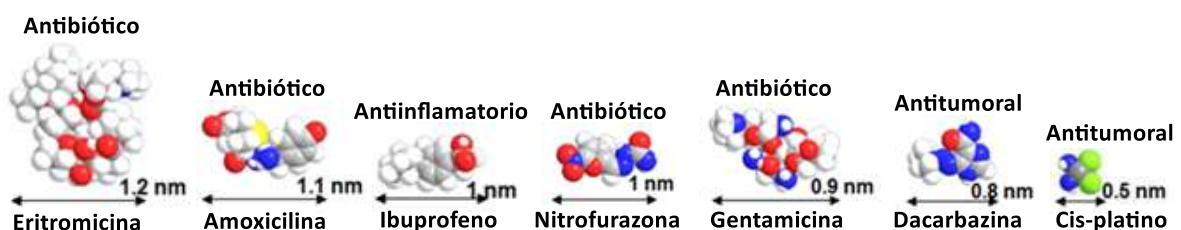


Figura 2.9. Moléculas de varios fármacos y sus dimensiones.

Ahora, si la distribución de poros de la matriz es ordenada, la adsorción y liberación de moléculas será homogénea y más eficiente, obteniéndose resultados reproducibles en comparación con un material con un arreglo de poros desordenado. Sin embargo, la adsorción y posterior liberación de entidades de interés biomédico/biológico no sólo depende de la cerámica, sino también de la solubilidad de las moléculas, de la interacción que se lleve a cabo entre éstas y los grupos funcionales que componen las paredes de los poros de la matriz, del disolvente usado, del valor del pH durante el proceso y de la concentración de las moléculas en la disolución. Finalmente, la velocidad con la que se produce la liberación depende del conformado del material^{60, 61}. Todos estos aspectos son cruciales para ajustar las condiciones y obtener el control deseado en ambos procesos. Control que se obtiene con los materiales mesoporosos de sílice, en gran parte por su versatilidad química, al funcionalizar su superficie con una amplia variedad de moléculas químicas, modificando su capacidad de adsorción a conveniencia, lo que permite alojar distintas moléculas y cederlas de manera sostenida durante periodos de tiempo prolongados en un medio apropiado^{60, 61}. Existen muchos ejemplos ya reportados en la literatura que corroboran las propiedades de las cerámicas mesoporosas de sílice como sistemas aptos para la liberación controlada de fármacos^{62, 63, 64, 65, 66}.

El entendimiento de la biocompatibilidad de los sistemas mesoporosos de sílice dentro del contexto biológico requiere el conocimiento no sólo de las características fisicoquímicas de los nanomateriales, sino también de las condiciones específicas en las que las interacciones bio-nano se llevarán a cabo. Por un lado, las MMS pueden obtenerse con diferentes dimensiones de partícula, formas, tamaños de poro, topografía de la superficie, cristalinidad, mesoporosidad y funcionalidad, cada una de estas variaciones pueden resultar en arreglos con diferentes propiedades estructurales y superficiales. Por otro lado, la complejidad de las condiciones biológicas en las que se aplican las NPs mesoporosas de sílice, también pueden conducir a distintas respuestas biológicas impredecibles, cómo específicamente estos procesos se ven afectados por las MMS o cómo las MMS interactúan con los sistemas biológicos varía en función del tipo de célula o MMS en cuestión. La posible citotoxicidad de una MMS puede observarse tras la internalización de las NPs en el cuerpo humano o animal, pudiéndose manifestar en forma de alteraciones en el pulmón, cerebro, piel, el sistema inmunológico, en la circulación sanguínea, etc. Así, al conjuntar todas las variables tanto de las MMS como de los sistemas biológicos, un complejo set de escenarios entorno a la biocompatibilidad se puede esperar. Sin embargo, a pesar de estas complejidades, debido a las prometedoras aplicaciones de las MMS en los campos biológicos y médicos, es de vital importancia seguir investigando su biocompatibilidad y comportamiento para un estudio clínico más avanzado^{67, 68}.

2.5.6.2. Aplicación en ingeniería de tejido óseo

En los últimos años, los materiales mesoporosos ordenados de sílice han atraído la atención de los investigadores del área biomédica debido a su aplicabilidad como sistemas de liberación controlada y como excelentes materiales de partida para la elaboración de *andamios* 3D para ingeniería de tejido óseo¹⁰. Jerárquicamente los materiales macroporosos con poros interconectados con un tamaño del orden de los micrómetros, son apropiados para ser utilizados como *andamios*. Aún así, el reto es obtener *andamios* que combinen la macroporosidad responsable de la oxigenación y vascularización ósea, con la mesoporosidad permitiéndoles adsorber y liberar moléculas/fármacos para distintas aplicaciones, siendo el objetivo principal, diseñar materiales que puedan aumentar y mejorar las propiedades de regeneración en el cuerpo humano, no sólo recuperando la estructura del tejido dañado, sino también su función. Por lo tanto, la posibilidad de usar materiales mesoporosos en el proceso de manufactura de los *andamios* añade gran valor al material final, debido a su capacidad para almacenar moléculas de interés biomédico para el tratamiento local de patologías óseas como: infecciones óseas, osteoporosis, cáncer, entre otras⁸. Desde el punto de vista biomédico, la superficie de estos materiales, principalmente los grupos químicos que la componen, regirán las interacciones con el cuerpo vivo. Estas matrices mesoporosas están compuestas de una red de sílice cubierta de un alto porcentaje de grupos silanol tanto en la superficie interna de los poros como en la superficie externa de las partículas, tomando en cuenta que poseen una superficie química similar a los biovidrios, éstas deberían ser capaces de desarrollar una capa de nanoapatita, de similar cristalinidad a la apatita del hueso natural, al estar en contacto con fluidos fisiológicos; en consecuencia, el material implantado podría enlazarse fuertemente con el tejido óseo del cuerpo, siendo materiales muy atractivos para ser aplicados en tecnologías de regeneración ósea al presentar un comportamiento bioactivo^{69,70}.

2.6. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

2.6.1. Nanopartículas

Las nanopartículas se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas con un tamaño en el intervalo de 3 a 100 nm o con una o varias dimensiones a nanoescala^{71,1}. La IUPAC las define como partículas de cualquier forma con dimensiones en el rango de 1×10^{-9} y 1×10^{-7} m. Esta definición incluye varios tipos de materiales como: NPs de carbono (fulerenos, nanoláminas de grafeno, nanotubos, nanofibras y nanoespumas), NPs inorgánicas tanto metálicas como de óxidos metálicos (tales como Fe_3O_4 magnetita); y puntos cuánticos (Quantum Dots, QDs)⁷². De igual forma están

consideradas en este concepto las partículas orgánicas y biológicas como liposomas, polímeros a nanoescala, entre otros⁷³.

Las NPs se utilizan exitosamente en diversos sectores industriales con la finalidad de mejorar las propiedades o el desempeño de sus productos, aplicándose ampliamente en la industria automotriz, química, electrónica, cosmética, de salud y vivienda. Las NPs también representan gran potencial en nanomedicina, protección al medio ambiente, catálisis y energía⁷⁴. De esta forma, las NPs poseen varias propiedades gracias a su organización a escala nanométrica. Dada la gran fracción de átomos superficiales en relación al volumen, $F = S/V$, las propiedades de las NPs están fuertemente influidas por sus propiedades superficiales, lo que químicamente se traduce, por ejemplo, en una mayor reactividad, solubilidad y actividad catalítica. Además, debido a su tamaño pueden estar involucradas en experimentos bioquímicos exclusivos, dado que la mayoría de los procesos biológicos se producen a escala nanométrica^{73, 74}.

2.6.2. Nanopartículas magnéticas (NPMs)

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son de gran interés para los investigadores de una amplia gama de disciplinas, incluyendo fluidos magnéticos, catálisis, biotecnología/biomedicina, imagen por resonancia magnética, almacenamiento de datos, y remediación ambiental⁷⁵. Si bien, se han desarrollado una serie de métodos adecuados para la síntesis de NPMs de varias composiciones, su aplicación exitosa en las áreas anteriormente mencionadas, dependerá en gran medida de su estabilidad bajo un amplio rango de condiciones.

Específicamente, para aplicaciones *in vivo* se requiere que las partículas no presenten agregación magnética para evitar que el sistema inmune capte esos grandes agregados y los eliminen del torrente sanguíneo. Por ello, se busca que el tamaño de las NPs esté por debajo de un valor crítico, que es dependiente del material, típicamente alrededor de 10 a 20 nm⁷⁶, para asegurar que las partículas se encuentren en el rango superparamagnético (SPM).

Los principales tipos de NPMs están basados en tres elementos: hierro, cobalto y níquel⁷⁷. La mayoría de las NPMs de hierro consisten en NPs de hierro puro y NPs de óxidos de hierro, tales como: α -Fe, γ -Fe, las de Fe amorfo, α -Fe₂O₃ (hematita), Fe₃O₄ (magnetita), FeO (wustita) y α -FeOOH (goetita). Las NPs de cobalto puro, Co₃O₄ y las cúbicas de óxido de cobalto (CoO); finalmente, las NPs de níquel puro⁷⁷ y óxido de níquel (NiO).

2.6.3. Magnetita

La magnetita (Fe_3O_4 , óxido férrico-ferroso) se trata de una ferrita de hierro con una estructura cristalina de espinela inversa ($\text{B}[\text{AB}]\text{O}_4$, $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$), de grupo espacial $Fd3m$, que presenta una estructura cristalina cúbica compacta centrada en las caras formada por oxígenos⁷⁸. El valor del parámetro de red "a" de 8.396 Å, determina el tamaño de la celda unitaria, misma que está formada por 8 unidades. La temperatura de Curie a la cual ocurre la transición hacia el paramagnetismo, es 847 K⁷⁹. La magnetita es un mineral de origen natural, está considerada como el material más magnético de la tierra, se encuentra presente a lo largo del planeta y representa la fuente de magnetismo para la mayoría de los sistemas magnéticos biológicos⁷⁸, razón por la cual ha sido estudiada profundamente durante décadas.

Los iones de hierro dentro de la magnetita ocupan dos posiciones distintas. El Fe^{3+} ocupa las posiciones tetraédricas, tetracoordinado por oxígenos; mientras que en las posiciones octaédricas se encuentran distribuidos de manera equivalente iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , hexacoordinados por oxígenos (figura 2.10). Los iones en posiciones octaédricas interactúan a través de los oxígenos con los iones de las posiciones tetraédricas, alineándose los momentos magnéticos de forma antiparalela a los anteriores, dando lugar a un comportamiento ferrimagnético por la cancelación parcial de los momentos⁷⁸.

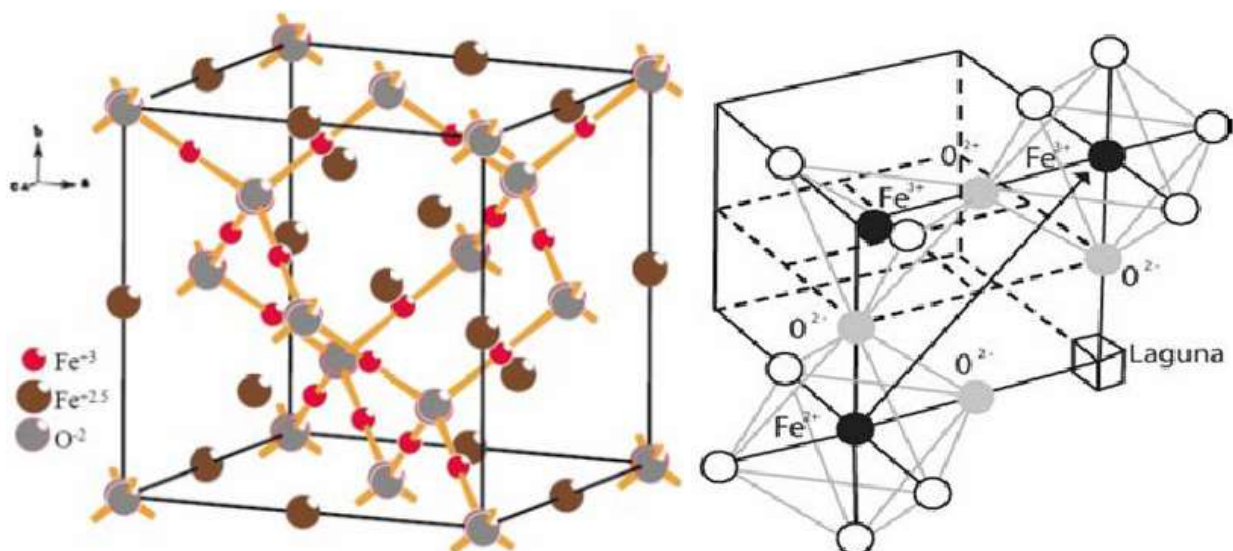


Figura 2.10. Estructuras cristalinas tipo espinela inversa de la magnetita⁸⁰.

2.6.4. Propiedades de las NPMs

El magnetismo es un fenómeno que resulta de la combinación de interacciones de origen cuántico (interacción de intercambio y campo de anisotropía cristalina) y de interacciones macroscópicas (campo desmagnetizante, interacción de Zeeman e interacción dipolar), da lugar a materiales sin magnetización espontánea (diamagnéticos y paramagnéticos) y con magnetización espontánea (ferromagnéticos, ferrimagnéticos, y anti-ferromagnéticos).

La construcción de las propiedades magnéticas de los materiales viene gobernada por la estructura electrónica de los mismos y la geometría de su red cristalina. Los materiales alcanzan la estabilidad magnética cuando se organizan en distintos dominios magnéticos de diferente dirección de magnetización, separados por paredes de dominio donde la magnetización varía suavemente de una a otra dirección de los dominios fronterizos. A medida que los materiales magnéticos son sometidos a temperaturas cada vez más altas se introduce desorden en el orden magnético, la magnetización se reduce y se hace nula a una temperatura llamada temperatura de Curie, T_C . En el caso de materiales macroscópicos, sus propiedades magnéticas (saturación, M_S , campo coercitivo, H_C , constante de anisotropía, K_{an} , etc.) dependen solo de la composición del material, sin embargo en el caso de las partículas éstas dependen además del tamaño de manera muy decisiva.

Para el caso de la magnetita, desde un punto de vista biomédico es recomendable un tamaño en el rango de entre 10 y 20 nm, dado que a estos tamaños desaparecen las fuerzas coercitivas y el material muestra un comportamiento superparamagnético cuando la temperatura se encuentra por encima de la temperatura de "bloqueo"⁸¹.

2.6.4.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es una de las variables que influyen en la capacidad de magnetización⁸². En la siguiente figura se puede observar como varía el campo coercitivo con respecto al tamaño de partícula. En partículas grandes la configuración magnéticamente más estable se alcanza mediante la formación de varios dominios magnéticos, separados por paredes de dominio. En esta situación la aplicación de un campo magnético produce el crecimiento de aquellos dominios alineados con el campo en detrimento de los que no lo están, requiriéndose la aplicación de un campo coercitivo no nulo para desmagnetizar el material.

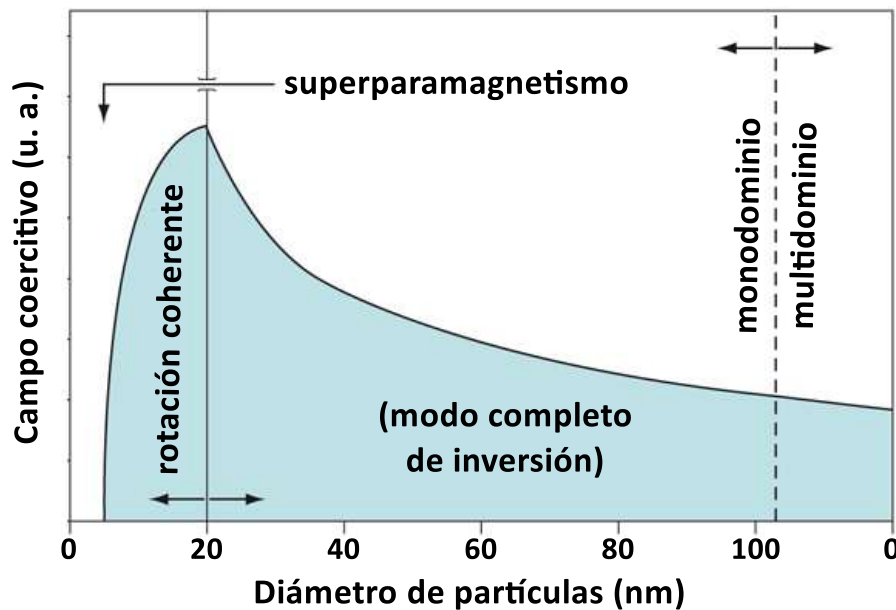


Figura 2.11. Campo coercitivo en función del tamaño de partícula⁸³.

La estructuras en dominios magnéticos de los materiales ferro-ferrimagnéticos se deben a la interacción de intercambio entre los electrones desapareados; la energía de anisotropía; la energía magnetostática (el campo desmagnetizante; la energía magnetoelástica, etc.), que se equilibran buscando el mínimo de energía y eso produce que las partículas se arreglen formando dominios magnéticos separados por paredes de dominios. Al ir disminuyendo el tamaño de partícula, las paredes de dominio se irán aproximando, de manera que las interacciones se incrementan, aumentando la resistencia a la movilidad (requiriéndose un mayor campo magnético para orientar todos los momentos magnéticos y alcanzar la magnetización de saturación). Cuando las partículas se reducen a tamaños muy pequeños (entre algún nanómetro y decenas de nanómetros, dependiendo del material), el equilibrio energético se logra con la estructura de un solo dominio (monodominio), en el cual, la resistencia a la alineación de los momentos magnéticos que lo componen, es máxima. Cuando se llega a un tamaño por debajo del tamaño crítico, el campo coercitivo se hace nulo y la partícula presenta una remanencia nula^{80, 84}, figura 2.12.

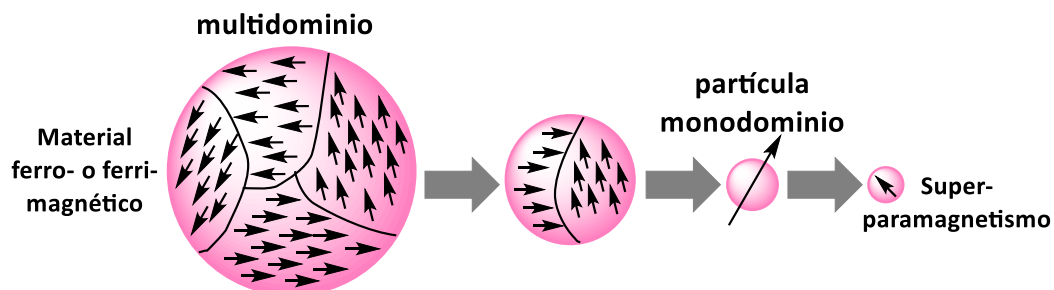


Figura 2.12. Tamaño de partícula, evolución de la estructura multidominio hasta la monodominio de un material magnético.

En el monodominio, los momentos atómicos se alinean en una única dirección a modo de un espín único y gigante. El espín se refiere a una propiedad física de las partículas subatómicas, las cuales tienen un momento angular intrínseco de valor fijo, dicho de otra forma, el espín, son los momentos magnéticos resultantes de los electrones no apareados, que además son poseedores de una carga eléctrica negativa, que al girar sobre su propio eje generan un campo magnético. Por su parte, las NPs que cumplen las características para convertirse en un monodominio, muestran un comportamiento superparamagnético por debajo de un cierto tamaño, con un gran momento magnético constante, rápida respuesta a campos externos aplicados, y despreciable magnetismo remanente y coercitividad, resultando en un átomo gigante paramagnético⁷⁶.

Estas características hacen a las NPs superparamagnéticas tremendamente interesantes para su aplicación biomédica, ya que el riesgo de formación de aglomerados es despreciable a temperatura ambiente^{75, 81}. Sin embargo, un problema difícil de evitar asociado a estos tamaños y escalas, es la inestabilidad intrínseca que muestran las NPs después de un largo periodo de tiempo, ya que tienden a aglomerarse para reducir la energía asociada con una gran superficie con respecto al volumen. Para muchas aplicaciones es vital el desarrollo de métodos para la protección de las NPMs que tiendan a su estabilización a largo plazo, evitando su degradación durante o después de la síntesis^{85, 86}.

2.6.4.2. Temperatura

Otro factor a tener en cuenta con respecto a la capacidad de magnetización es la temperatura, que tiende a introducir desorden en la estructura magnética. Este efecto se traduce en la disminución de la magnetización de saturación que los materiales presentan a temperaturas elevadas. Cuando la energía térmica es mayor que la energía magnética, los momentos magnéticos individuales pueden orientarse al azar y el material pierde su magnetización. Esto sucede en la llamada temperatura de Curie, que para la magnetita ocurre a 847 K⁷⁹.

Para partículas monodominio suficientemente pequeñas, la energía de anisotropía, que depende directamente del volumen, es menor que la energía térmica, incluso a temperatura ambiente, en esta situación su momento magnético fluctúa presentando una magnetización neta nula. En estas condiciones se dice que la partícula se encuentra en estado superparamagnético. Al bajar la temperatura, la energía magnética empieza a dominar frente a la energía térmica, de tal manera que a una determinada temperatura denominada de bloqueo, la partícula presenta un momento magnético permanente. La temperatura de bloqueo que marca la transición entre el estado bloqueado y el estado superparamagnético, ocurre cuando la energía térmica y la energía de

anisotropía cristalina son comparables y por ello depende del tamaño de la partícula^{76, 84}. Por lo tanto la temperatura de bloqueo y la energía de anisotropía disminuyen conforme decrece el tamaño (volumen) de las NP_s, consiguiendo que el momento magnético cambie de orientación (fluctue) aplicando una energía térmica más pequeña (temperatura de bloqueo menor).

2.6.4.3. Cristalinidad

Además de la influencia del tamaño de partícula y la temperatura, la cristalinidad es otro factor importante, ya que la anisotropía morfológica tiene un efecto considerable sobre el magnetismo. En la superficie de las partículas de escala nanométrica, se presenta un mayor desordenamiento de momentos magnéticos, rompiéndose la simetría del cristal en estas regiones. Debido a la elevada relación superficie/volumen, el efecto de la superficie tiene gran influencia sobre la magnetización, aumentando la susceptibilidad en determinadas direcciones cristalográficas a causa de la anisotropía. En el caso ideal, se esperarían partículas de menor tamaño con una mayor cristalinidad, dado que, una mayor cristalinidad repercute en una mejor magnetización^{82, 87}. De esta forma, la saturación se mejora de dos maneras: una, procurando que la capa muerta superficial no sea ancha, es decir evitando lo más posible la oxidación de la superficie; y dos, mejorando la estructura cristalina de la partícula, mediante procesos de síntesis adecuados. En el caso de la magnetita, todos los iones hierro y oxígeno tendrían que estar situados en las posiciones de la red cristalina que les corresponde, para conseguir que el orden de sus momentos magnéticos, sean lo más parecido a la estructura ideal de la red cristalina^{77, 78}.

2.6.4.4. Curva de Histéresis

Para caracterizar el comportamiento magnético de diferentes materiales magnéticos, se miden sus ciclos magnetización entre campo +H y -H. Cuando la magnetización (M) de un material en función de un campo magnético (H) aplicado en direcciones tanto positivas como negativas, sigue dos trayectorias distintas de magnetización y desmagnetización, se dice que el material presenta histéresis magnética. A campos muy grandes los momentos magnéticos se alinean prácticamente en su totalidad y la magnetización se aproxima a un valor máximo, llamado magnetización de saturación (M_s). Los materiales magnéticos en un estado ferromagnético tienen una magnetización residual a campo cero, llamada magnetización remanente (M_r). La coercitividad (H_c) caracteriza a la fuerza de campo inverso necesaria para reducir la magnetización a cero. Por tanto, las medidas de histéresis permiten obtener información acerca de la coercitividad, magnetización remanente y magnetización de saturación de un material dado (figura 2.13)^{78, 84, 87}.

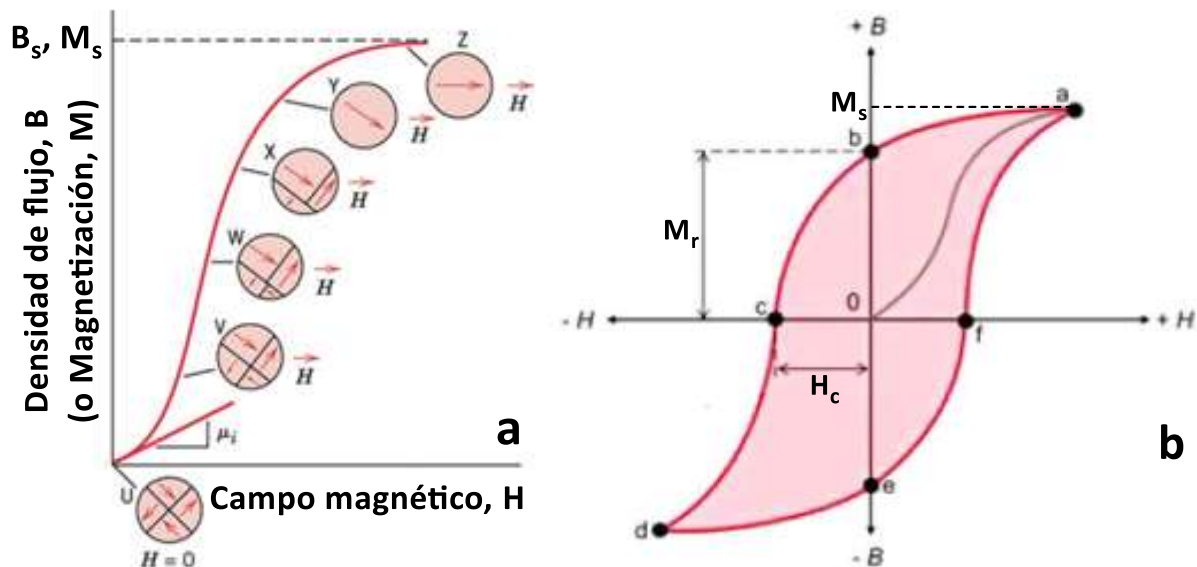


Figura 2.13. a) Representación de la rotación de los momentos magnéticos y variación de las paredes de dominio al modificar el campo magnético aplicado; b) Descripción de un ciclo de histéresis, representando la magnetización M frente a campo magnético H .

2.6.4.5. Superparamagnetismo

Por debajo de la temperatura de Curie de un ferromagneto o ferrimagneto, todos los spins están interactuando magnéticamente dando lugar a un momento magnético permanente. Este momento viene determinado por la anisotropía de volumen y la superficie de la nanopartícula, de manera efectiva esta energía de anisotropía KV , depende del volumen de la partícula (V) y de la constante de anisotropía efectiva (K). Conforme se reduce el tamaño de las partículas, KV disminuye hasta ser superado por la energía térmica (kT) y el momento magnético total ($\mu_p = M_s V$) fluctúa produciendo un momento neto cero. Este tamaño se denomina tamaño crítico D_c y en la magnetita se encuentra entre 20-30 nm. El momento μ_p puede ser bastante grande, miles de magnetones de Bohr; de forma que al aplicar un campo, éste tendería a alinearlo, pero kT trataría de contrarrestar el alineamiento de igual forma que lo haría en un material paramagnético, a este fenómeno se le conoce como superparamagnetismo^{78,84}, figura 2.14.

Por lo tanto, el superparamagnetismo es un efecto que sólo se produce en materiales de dimensiones por debajo del tamaño de monodominio y a una temperatura superior a la temperatura de bloqueo, caracterizándose porque la nanopartícula carece de remanencia y campo coercitivo. Por su parte, el paramagnetismo electrónico ocurre cuando a escala atómica el ion tiene una capa incompleta con algún electrón desapareado, estos electrones además, no interactúan con ningún vecino a través de la interacción de intercambio, esto es, no se ordenan en ausencia de campo

magnético, sólo lo hacen cuando se les aplica uno. Por eso su susceptibilidad magnética es pequeña, positiva y lineal (es proporcional al campo aplicado).

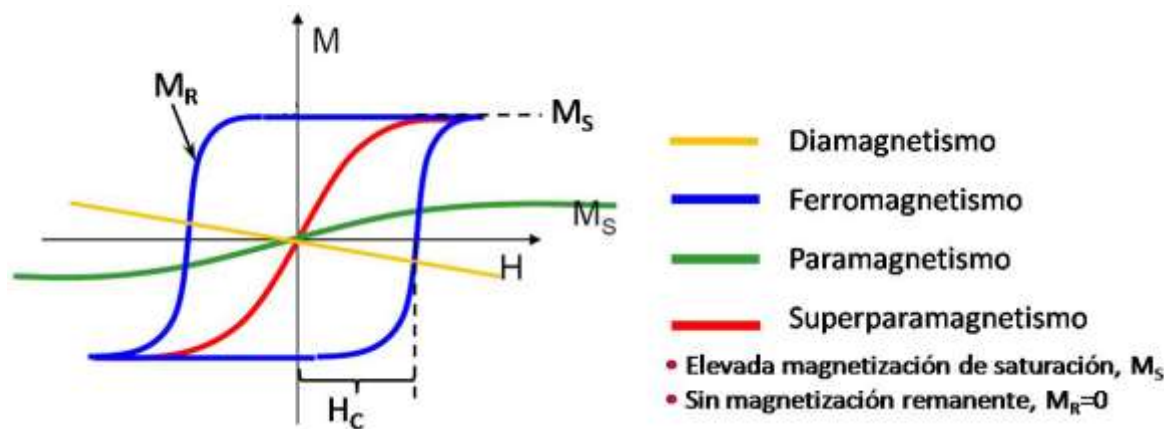


Fig. 2.14. Estados magnéticos y su curva M-H característica.

2.6.5. Recubrimientos de las NPMs

El recubrimiento de NPMs consiste básicamente en el injerto de especies orgánicas, que incluyen surfactantes, polímeros u otras especies, o bien, la formación de una capa inorgánica de sílice o carbono⁸⁹. Estos recubrimientos sirven como estabilizantes y barreras de protección, proveyendo al mismo tiempo a las nanopartículas de una funcionalización. Por otra parte, los efectos superficiales pueden llevar a una disminución de la magnetización de las NPs. Esta reducción está asociada con diferentes mecanismos, tales como la existencia de una capa magnéticamente muerta en la superficie de las partículas⁷⁶.

Para aplicaciones biológicas y biomédicas, se requiere producir nanopartículas que sean tanto estables en agua como biocompatibles⁷⁵. De esta forma, la síntesis de NPs de óxido de hierro (magnetita) recubiertas con diversas moléculas, por ejemplo, ácido poliacrílico^{90,91}, poli-etilenimino^{92,93}, ácido oleico, ácido láurico⁹⁴, ácido glucónico, ácido lactobiónico, entre otros⁹⁵, obtenidas mediante distintos métodos, principalmente por co-precipitación, tendrán un gran potencial en numerosas aplicaciones biomédicas.

2.6.6. Síntesis de NPMs

Para la síntesis de NPMs, es fundamental poder controlar las variables asociadas al proceso, siendo cruciales el control del tamaño de partícula y la cristalinidad, dichas variables determinarán sus propiedades^{76,96}.

Al disminuir el tamaño de partícula, la cristalinidad de la misma tiende a disminuir. Se ha comprobado que la anisotropía morfológica puede influir en las propiedades físicas y magnéticas, pudiendo tener relevancia en las aplicaciones posteriores. En los últimos años el número de métodos disponibles para la síntesis de NPs de óxido de hierro se ha incrementado de una manera importante. Para esta tesis se ha optado por los métodos de coprecipitación, microemulsión y solvothermal; ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas^{75, 76, 77}.

2.6.6.1. Coprecipitación

El método de coprecipitación consiste en la mezcla de iones férrico y ferroso en proporción molar 2:1 en disolución acuosa. El tamaño de las NPs obtenidas, además de su forma, van a depender del tipo de sal empleada (cloruro, sulfato, nitrato...), de la proporción de iones férrico y ferroso, de la temperatura de reacción, de los valores de pH, de la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y la velocidad de adición de la disolución básica⁹⁷.

Las propiedades físicas y químicas de las NPs resultantes se verán muy afectadas por pequeñas modificaciones en los parámetros descritos, especialmente por la temperatura de reacción. Los valores de la magnetización de saturación de las NPs varía entre 30-80 emu/g_{Fe₃O₄}, siendo menores que los presentes en los materiales macroscópicos (alrededor de 90-95 emu/g_{Fe₃O₄}), lo cual pudiera estar asociado a un proceso de oxidación de la magnetita a maghemita (γ -Fe₂O₃), provocando que la M_s caiga hasta 70 emu/g, cuando se disminuye el tamaño de las NPs por debajo de 10 nm.

Por coprecipitación suelen obtenerse partículas polidispersas con diámetros que van de los 2 a los 20 nm con cristalinidad variable. Sin embargo, posee la ventaja de ser un método fácil, rápido, que no requiere de instrumentación especializada, barato y que es ampliamente utilizado para aplicaciones biomédicas, debido a que se obtienen materiales funcionalizados e hidrofílicos, por lo tanto, estables en medios acuosos^{90, 93, 95}.

2.6.6.2. Microemulsión

El método de microemulsión consiste en utilizar una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos fases inmiscibles (agua y disolvente orgánico) en presencia de un surfactante. Las moléculas de surfactante forman una monocapa en la interfase entre el agua y la fase orgánica, de modo que la parte apolar del surfactante queda disuelta en la fase hidrófoba y la parte polar

(cabezas hidrofílicas) en la fase acuosa. La síntesis por microemulsión permite obtener NPs monodispersas y con comportamiento superparamagnético^{89,94}.

2.6.6.3. Solvotermal

El método solvotermal está basado en el mismo concepto que el método hidrotermal^{76, 80}, la diferencia consiste en usar un componente orgánico como solvente en lugar de agua. Los precursores de Fe utilizados, deberán ser completamente solubles en el solvente orgánico elegido para la síntesis, misma que se llevará a cabo en condiciones de alta temperatura y presión, por lo que se requerirá el uso de una autoclave. Dependiendo del control de las condiciones, este método permite obtener NPs monodispersas de alta cristalinidad, principalmente con morfología esférica, las cuales suelen presentar desviaciones estándar $\sigma \leq 5\%$ diámetro y una mayor M_s que las sintetizadas por coprecipitación. La síntesis de estas partículas monodispersas se basa en una rápida nucleación seguida de un crecimiento lento controlado⁹⁸.

2.6.7. NPMs aplicadas a biomedicina

Particularmente en el campo multidisciplinario de la nanomedicina, las nanopartículas magnéticas, sobre todo las basadas en óxidos de hierro (con estructura tipo espinela), son especialmente prometedoras, tanto por su tamaño como por sus propiedades magnéticas^{75, 78, 80}, usándose más concretamente como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética en Medicina Nuclear⁸⁵; como medio de transporte de moléculas con actividad biológica^{1, 73}; como material de partida para la síntesis de nanocomposites multifuncionales que puedan ser útiles tanto para diagnóstico como para terapia; además de presentar hipertermia magnética, la capacidad para generar calor cuando son sometidas a la acción de un campo magnético alterno, este fenómeno posibilita su uso como agente terapéutico^{75, 81}.

Las NPMs basadas en óxido de hierro, han sido investigadas durante los últimos 40 años con diversos recubrimientos para diagnóstico *in vitro*^{86, 88}. Sin embargo, el nuevo reto de la biomedicina es su aplicación *in-vivo*^{99, 100, 101}, debido a su reducido tamaño son susceptibles de ser transportadas por el torrente sanguíneo o por el sistema linfático (para lo cual deben estar unidas a receptores de las células o bien incorporadas dentro de células para su transporte), así mismo poseen la capacidad de ser combinadas con genes o medicamentos haciéndolas extremadamente atractivas para la industria farmacéutica. No obstante, queda la incógnita de los posibles efectos secundarios que puedan tener

estas partículas al pasar a través del cuerpo humano y la necesidad de que sean rápidamente interiorizadas por las células diana (unido a otras necesidades más genéricas como la especialización o la eficiencia del proceso)^{67, 68}. Para la adecuación de las NPMs a las aplicaciones biomédicas hay varios aspectos a tener en cuenta y que deben resolverse^{76, 77}:

- a) La tendencia a agregarse debido a su gran relación superficie/volumen.
- b) La corta vida media de las partículas en el torrente sanguíneo, ya que son eliminadas del flujo sanguíneo por macrófagos del sistema fagocítico mononuclear antes de llegar a la célula diana.
- c) La baja eficiencia del proceso de captación intracelular.
- d) La orientación o dirección no específica.

Para hacerlas coloidalmente estables y prevenir su oxidación por el oxígeno (principalmente en NPs de óxidos metálicos), corrosión por ácido o bases y agregación espontánea; varias técnicas de protección han sido establecidas. Estas estrategias de estabilización son de diferente naturaleza, pero todas basadas en el principio de armadura del núcleo. Estas protecciones se encaminan a retener la estructura de dominio simple de las NPs, para preservar sus propiedades magnéticas. Dicho de otro modo, las corazas no solo sirven para proteger a las partículas magnéticas contra la degradación, sino también pueden ser usadas para la funcionalización con componentes específicos como especies catalíticas activas, medicamentos u otros grupos funcionales, dependiendo de las aplicaciones deseadas.

2.6.7.1. Agente de contraste para imagen por resonancia magnética (RMI)

La imagen por resonancia magnética (RMI) se ha convertido en una poderosa herramienta no invasiva en la asistencia al diagnóstico médico debido a su gran resolución en contraste y a su radiación no ionizante. El contraste en estas imágenes se puede modificar empleando algunas sustancias magnéticas llamadas Agentes de Contraste (AC)^{96, 102}.

La imagen por resonancia magnética es una técnica en la que se fuerza de manera selectiva a que los protones de las moléculas de agua, ubicuas en el cuerpo humano, efectúen relajaciones magnéticas discernibles espacialmente para poder reconstruir una imagen 3D¹⁰³.

2. ANTECEDENTES

El fundamento de la técnica comienza en los años 40, con los trabajos de Purcell y Bloch¹⁰⁴, que cuantificaron el fenómeno de la resonancia magnética nuclear en medios materiales. Cuando un protón es expuesto a un campo magnético B_0 empieza a precesar en torno a él con la frecuencia de Larmor, que depende del radio giromagnético del protón (42.6 MHz/T) y del campo B_0 , consiguiendo de esta manera minimizar su energía, figura 2.15.

Los protones del hidrogeno en las moléculas de agua se alinearán de manera paralela o antiparalela a este campo, produciendo una magnetización longitudinal apreciable, M_z , y estática que no permite su aprovechamiento para producir información espacial útil.

Fue Lauterbur¹⁰⁵, en los inicios de los años 70, el primero en generar una imagen 2D mediante el uso adicional de campos con gradiente magnético para perturbar selectivamente a los protones. A partir de ahí la técnica se ha ido afinando hasta llegar a los equipos actuales que combinan gradientes y pulsos de radiofrecuencia y permiten reconstruir imágenes de gran resolución en 3D.

Actualmente, se aplican pulsos magnéticos de radiofrecuencia sintonizados para oscilar a la frecuencia de Larmor de los protones (B_{RF}). De esta manera los protones absorberán esa energía entrando en resonancia y su magnetización efectuará un recorrido complejo entorno a ambos campos¹⁰³, tal y como se indica en la figura 2.15 (en el centro y derecha).

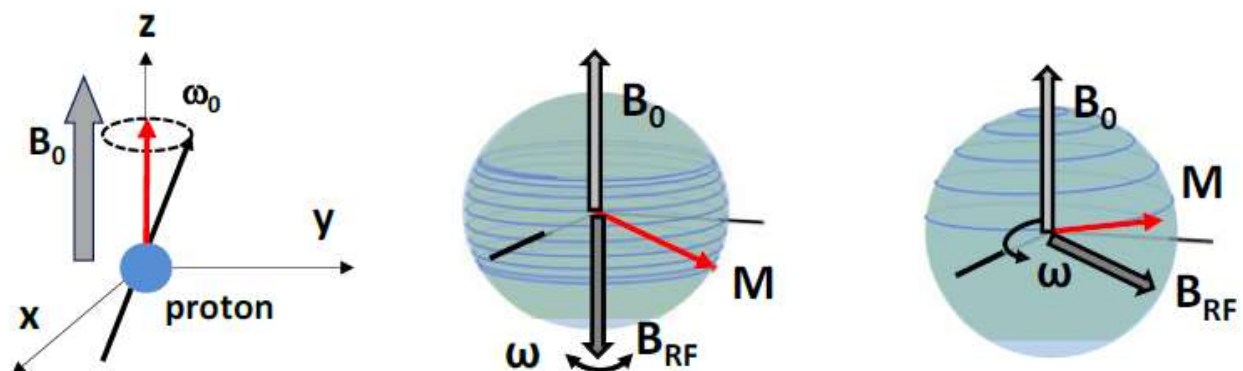


Figura 2.15. Esquema de la magnetización de un protón sometido a un campo magnético estático B_0 , en primer lugar, y combinado con pulso de radio frecuencia a 180° en el centro, y con un pulso de radio frecuencia a 90° al final.

En cuanto cesan los pulsos, los protones devuelven esa energía absorbida mediante un proceso de relajación magnética donde la componente transversal, M_{xy} , ira desfasándose hasta desaparecer y reaparecerá la componente longitudinal, M_z . Los tiempos que tardan en relajar la componente transversal y longitudinal, respectivamente T2 y T1, son diferentes para cada tipo de tejido y

2. ANTECEDENTES

dependen del entorno magnético de cada molécula, su libertad para difundir entre los tejidos, la inhomogeneidad del campo magnético a su alrededor, etc¹⁰³.

El contraste de las imágenes obtenidas depende de los valores de los tiempos de relajación en cada tejido, ya sea en los modos de medida T1 o T2. Para realzar este contraste se requiere el uso de agentes específicos, que alteren magnéticamente el entorno de zonas o tejidos de interés e induzcan un cambio en los tiempos de relajación¹⁰³.

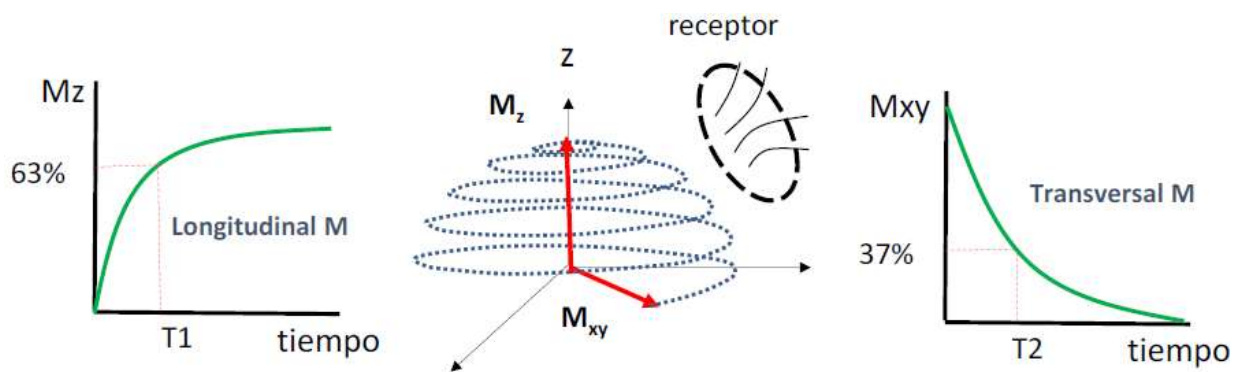


Figura 2.16. Esquema de la relajación magnética de un protón después de un pulso, en el centro, relajación de su componente longitudinal a la izquierda, y la transversal a la derecha.

La relajación del momento magnético produce una señal que se induce en un receptor, (figura 2.16 centro) y se relaciona con la configuración de medida del equipo (situación de los pulsos, gradientes y receptores), para distinguir su localización espacial y recomponer una imagen 3D.

Una actualización de esta técnica denominada **MRI funcional (fMRI)**, permite registrar la función cerebral o de otros tejidos basándose en el incremento del flujo de sangre en la vasculatura local que acompaña a la actividad neuronal o celular. El aumento del flujo sanguíneo es la respuesta a un incremento del metabolismo que requiere mayor cantidad de oxígeno en la zona activa y el hierro contenido en la hemoglobina funciona como agente de contraste que reduce T_2^* a nivel local¹⁰³. El decaimiento T_2^* , se refiere a una disminución exponencial en M_{xy} , es detectada por la bobina receptora tras la finalización del pulso de inducción, presenta una magnitud mucho mayor que T2 en los tejidos debido a la falta de homogeneidad inherente del campo magnético.

La sangre arterial oxigenada contiene a su vez hemoglobina oxigenada que tiene señal diamagnética y por tanto una baja susceptibilidad magnética, mientras que La sangre desoxigenada es

paramagnética y altera la señal de la imagen de resonancia magnética T_2^* . La T_2^* total, crítica para el contraste en fMRI, viene determinada por la proporción de hemoglobina oxigenada y desoxigenada en cada voxel (constituye la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional y es, por tanto, el equivalente del píxel en un objeto 2D), que a su vez es función del flujo sanguíneo. Como consecuencia de todo esto, el efecto de la dependencia del nivel de desoxigenación de la sangre (BOLD) se puede observar mediante resonancia magnética a campos elevados y esta diferencia se utiliza como hecho identificador y permite construir mapas de las funciones cognitivas de las diferentes regiones asociadas con la percepción visual, el lenguaje, la memoria^{103,106}...

La característica más importante de las NPs magnéticas cuando se emplean como agentes de contraste en RMI, es su diámetro, ya que éste define en gran medida la relajación y eficacia del AC. La mayoría de las aplicaciones exige el transporte de los agentes de contraste por vía intravenosa, lo que determina el tamaño de partícula. Para una aplicación satisfactoria, las partículas deben atravesar la pared capilar, dependiendo del tamaño, carga y configuración del recubrimiento, estas partículas son metabolizadas por el sistema fagocítico mononuclear, que consiste en macrófagos y monocitos, células que son acumuladas en los nódulos linfáticos, bazo e hígado. Las partículas más pequeñas generalmente son asimiladas por el sistema linfático y la médula ósea, mientras que aquellas de más de 50 nm son asimiladas por células del hígado. Si las partículas no son enteramente capturadas por el hígado o el bazo, esto puede ser evaluado como un marcador de inflamación para el diagnóstico de inflamaciones y trastornos degenerativos asociados con una alta actividad fagocítica de los macrófagos en isquemias cerebrales^{101,106}.

2.6.7.2. Liberación de medicamentos

La investigación en la liberación de medicamentos y la transfección genética⁹³ está motivada por la necesidad clínica de una liberación controlada y selectiva de medicamentos, especialmente para aquellos fármacos que muestran una baja biocompatibilidad, solubilidad o tiempo medio de circulación. En este sentido las NPMs constituyen una buena alternativa, en especial las que puedan evitar a los macrófagos, el sistema fagocítico mononuclear en tejidos, sistema linfático y circulatorio, para que esto ocurra, las NPs se funcionalizan con diversas moléculas, lo que les permite ser reconocidas como señal para las células diana⁹⁰.

2.6.7.3. Transfección genética

Un amplio número de trastornos pueden ser explicados más detalladamente a través de la información genética, que puede ser utilizada para la detección temprana o para el tratamiento posterior. Durante muchos años se han intentado métodos para la liberación dirigida de genes por medios virales o no virales (aunque en el caso de los virales, con potentes efectos nocivos)^{80, 86}. Recientemente se ha optado por tratamientos mediante NPs complementadas con ADN para penetrar la membrana celular o bien dotando a la superficie celular de un receptor que brinde un vector dentro de ella. Sin embargo, la pobre eficiencia de la transfección en comparación con los métodos virales está limitando la aplicación de estas terapias *in vivo*⁹⁶.

2.6.7.4. Tratamiento del cáncer

La detección de células tumorales de metástasis con precocidad y la minimización de los efectos tóxicos de la quimioterapia son dos de los aspectos a investigar más relevantes en la biomedicina actual¹⁰. El uso de mecanismos de liberación dirigida basados en NPs evita los problemas anteriormente expuestos, ya que el medicamento es dirigido en contra de las células cancerígenas, protegiendo el resto de los tejidos de la toxicidad del mismo, así como al fármaco de una degradación temprana⁶⁸. Por otra parte, las NPMs unidas a medicamentos, tienen el valor añadido de poder ser endosadas al objetivo mediante un campo magnético externo, aunque al día de hoy no es realista pensar en una combinación de NPMs y moléculas como proteínas o anticuerpos, que puedan ser perfectamente dirigidas a cualquier célula, por la imposibilidad de tener un campo magnético lo suficientemente intenso como para guiar las partículas por el torrente sanguíneo⁹⁶. Sin embargo, estas NPs funcionalizadas son capaces de ser visualizadas por resonancia magnética en el tejido objetivo, lo que es realmente útil en diagnóstico temprano⁸⁵, otra limitante estaría relacionada con el periodo de tiempo en el que liberan el medicamento, así como la cantidad que son capaces de liberar.

2.6.7.5. Hipertermia

Una de las potenciales aplicaciones en nanotecnología que se ha venido estudiando, desarrollando, y de la cual se espera una amplia aplicación futura, es la hipertermia mediante campos magnéticos alternos⁷⁵. La respuesta de las NPs magnéticas al campo magnético provoca varios fenómenos físicos, los cuales suministran energía térmica al organismo estudiado, produciendo sobrecalentamiento en

el mismo. Este tipo de técnica es empleada para la eliminación de tejido canceroso y para la liberación controlada de fármacos, recientemente se está estudiando su potencial aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos, observándose que la presencia de NPs magnéticas en sistemas más complejos favorece la adhesión celular/proliferación, mediante la aplicación de estímulos magnéticos⁸¹.

El tratamiento eficiente para la eliminación de tejido canceroso, mediante hipertermia, requiere de alcanzar un rango de temperatura entre 45 y 56 °C para causar la muerte de las células tumorales por ablación, o bien provocar una leve calefacción para desencadenar debilidad biológica, $T = 40-45\text{ °C}^{75}$. En el caso de la técnica de liberación controlada de fármacos, lo indispensable es conocer las condiciones adecuadas dependientes de la frecuencia e intensidad del campo, para liberar la cantidad deseada de fármaco a estudiar, sin que la temperatura afecte su efectividad¹⁰⁷.

La hipertermia es producida por la excitación de las NPMs que se encuentran embebidas en la muestra a una determinada cantidad de energía, la cual es definida por la magnitud del campo magnético a una cierta frecuencia. La temperatura alcanzada depende de la excitación magnética externa y de las propiedades magnéticas de las NPMs, y de la viscosidad del medio donde se encuentran inmersas las mismas, es decir, del ferrofluido en conjunto. Los valores de frecuencia y campo magnético aptos para este tipo de tratamientos no deben exceder el límite de seguridad, $H \cdot f < 4.85 \times 10^8\text{ A m}^{-1}\text{ s}^{-1}$, cuando se trabaja con muestras celulares^{75, 107}.

2.7. NANOCOMPOSITOS MAGNÉTICOS (SÍLICE MESOPOROSA/Fe₃O₄)

El diseño y la fabricación de materiales avanzados biocompatibles y bioabsorbibles capaces de imitar los tejidos biológicos o solucionar los problemas presentes en el cuerpo humano, constituye un reto importante en el campo de la biomedicina. Las propiedades dependientes del tamaño que exhiben los materiales a nanoescala, como consecuencia de su mayor relación superficie-volumen, han abierto una amplia gama de oportunidades para aplicaciones en casi todos los campos imaginables. Respecto a esto, la incorporación de NPMs en formulaciones de *andamios*/nanocomposites biocompatibles proporciona materiales finales con multifuncionalidad adicional y propiedades mecánicas reforzadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, en adición a esto, debido a su carácter magnético presenta otras implicaciones biológicas, es decir, los estímulos magnéticos favorecen la adhesión celular y la proliferación, entre otras actividades biológicas⁸¹.

Durante décadas se han estudiado las micro y nanopartículas orgánicas (NPs) para ser aplicadas a este campo, principalmente los liposomas y las elaboradas a partir de polímeros, encontrado su lugar en el mercado; mientras que sus contrapartes inorgánicas recientemente han sido objeto de un creciente interés en el área biomédica. Clásicamente, los materiales inorgánicos estructurados eran considerados principalmente en aplicaciones tales como catálisis y separación, que requerían resistencia mecánica o química, la cual era proporcionada por las matrices inorgánicas, y que no se alcanzaba con materiales orgánicos¹⁰⁸. Una vez que se dieron cuenta de que estas matrices podían utilizarse en la protección de fármacos y biomoléculas especialmente sensibles, tales como proteínas (péptidos, enzimas, anticuerpos) o ácidos nucleicos (ADN, ARN, plásmidos), de la degradación o pérdida de actividad fisiológica o de otras deficiencias debidas a ambientes severos; estos materiales se convirtieron en un gran campo de estudio en el área biotecnológica, gracias a sus parámetros estructurales controlables en combinación con su alta reactividad y su capacidad de modificar orgánicamente su superficie con diversos grupos funcionales para crear materiales compuestos híbridos orgánico-inorgánico^{8, 10}. Desde el descubrimiento de los materiales M41S en 1992 por científicos de Mobil, las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice (MMS) han recibido mucha atención debido a sus propiedades superiores, como elevada área superficial, volúmenes de poro grande, estrechas distribuciones de tamaño de poro en el rango de 2-30 nm, siendo aplicadas en catálisis, separación, láseres, sensores, celdas solares, etc. Una década después estos materiales dieron un salto al campo biomédico. Con el avance de las investigaciones, hoy en día es posible tener control en la morfología, lo que permite la síntesis de partículas de sílice mesoporosa de tamaño nanométrico, siendo susceptibles y eficientes a la adsorción celular, el tráfico intracelular y la circulación en el cuerpo¹⁰⁹.

Por su parte las NPMs, principalmente, las de óxido de hierro, también han recibido considerable interés debido a su amplia gama de posibles aplicaciones en electrónica, catálisis, energía, como dispositivos magnéticos y en aplicaciones *in vitro/in vivo*. En este último aspecto, la capacidad de algunos NCs superparamagnéticos para mostrar simultáneamente hipertermia magnética cuando un campo magnético externo dinámico es aplicado, se convierte en una herramienta prometedora para el tratamiento de diversos cánceres malignos, a través de una terapia combinada que consiste en el aumento de temperatura y liberación de fármacos activados térmicamente⁸¹.

De esta forma el ensamblaje de diferentes materiales en una sola nanoestructura puede proporcionar propiedades superiores y versátiles, a veces sin precedentes, al obtenerse funcionalidades múltiples derivadas de los compuestos involucrados, determinando así, sus aplicaciones futuras¹¹⁰. Así, los nanocomposites magnéticos NPMs/MMS, han sido el foco de

atracción de muchos investigadores en los últimos años, combinando las ventajas tanto de las matrices mesoporosas ordenadas de sílice como de las NPs de magnetita superparamagnética, abriendo nuevas oportunidades para generar plataformas multifuncionales para ser aplicadas en situaciones complicadas, por ejemplo, liberación controlada y selectiva de fármacos.

En general, los nanocomposites $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MMS}$ se pueden sintetizar mediante las siguientes vías:

- 1) Dentro de los poros de la sílice mesoporosa mediante impregnación de sales de hierro, por ejemplo, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, seguido por una pirólisis u otro proceso^{111, 112, 113}.
- 2) La adsorción de nanocristales de óxido de hierro uniformes en los poros funcionalizados de las matrices mesoporosas de sílice¹¹⁴.
- 3) Formación de estructuras core-shell, en las cuales el recubrimiento o encapsulado está conformado por un material de sílice mesoporosa que rodea un núcleo o varios núcleos de nanocristales magnéticos de óxido de hierro magnético. Estas estructuras son una de las más reportadas en la literatura para este tipo de nanocomposites^{110, 115, 116, 117}.
- 4) Deposición de la sílice mesoporosa sobre las NPs, o la impregnación de las NPs con los precursores de la sílice mesoporosa o bien mediante la posterior síntesis de la MMS en presencia de las NPs. Al igual que en el caso anterior, también se pueden encontrar muchos ejemplos de estos materiales reportados en la literatura^{118, 119, 120, 121}.
- 5) Emulsión combinada y evaporación de disolventes u otras técnicas para crear nanocomposites con nanocristales incrustados en las paredes de la sílice mesoporosa¹²².

2.8. ESTRUCTURAS CORE-SHELL (Fe_3O_4)_n@C

Las NPs core-shell con propiedades superparamagnéticas han atraído mucha atención en los últimos años debido a sus posibles aplicaciones en catálisis, separación de contaminantes ambientales, bioseparación, administración de fármacos, tecnología médica (agentes de contraste), alimentos y biomedicina. Tales NCs se componen de NPMs embebidas o encapsuladas en una matriz inorgánica¹²³. En particular, los materiales basados en cúmulos de nanocristales de magnetita superparamagnéticos con alta solubilidad en agua y gran respuesta magnética, han sido muy importantes. Una suspensión coloidal de NPs de tamaño nanométrico posee un alto momento magnético permanente. Con el fin de contrarrestar las atracciones de Van Der Waals y el momento dipolar magnético, la estabilidad coloidal de la suspensión magnética requiere una repulsión

adicional entre las partículas. Esto puede lograrse a través de un impedimento estérico, recubriendo las partículas, o bien mediante repulsión electrostática.

El recubrimiento de la superficie con polímeros o SiO₂ de agregados magnéticos, es un ejemplo exitoso de la introducción de un impedimento estérico, mejorando la estabilidad y la tolerancia a las variaciones ambientales, tales como fuerza iónica e hidrofobicidad. En comparación con los recubrimientos poliméricos y de sílice, los de carbono exhiben mucho mayor estabilidad en diversos entornos químicos y físicos, tanto en medio ácido como básico, así como a altas temperaturas y presiones¹²⁴. El recubrimiento o encapsulamiento de las partículas de magnetita con carbono y la creación de grupos carboxilo a partir de la oxidación del carbono en la superficie, confiere a los NCs de impedimento estérico y de repulsión electrostática. El encapsulado protege a los núcleos de magnetita de la oxidación, mientras que la carboxilación de la superficie mejora la estabilidad de las suspensiones coloidales debido a que la presencia de estos grupos conduce a la aparición de un alto potencial zeta negativo¹²⁵.

Varios enfoques han sido desarrollados para la síntesis de las nanoestructuras core-shell (Fe₃O₄)_n@C. La más común es usando el proceso hidrotermal, sin embargo existen otros como deposición química de vapor, método híbrido láser-magnetron y por microondas, sin embargo, la mayoría pueden llegar a ser complicados, ya que requieren de equipo especial y de un alto consumo de energía¹²⁶.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El diseño, síntesis y caracterización de los materiales mesoporosos de sílice tipo SBA-15, permitirá obtener biomateriales de tercera generación destinados a inducir la regeneración de los tejidos y que conduzcan a la fabricación de implantes con el valor añadido de poder incluir moléculas de interés biomédico/bioquímico para ser posteriormente liberados de forma gradual; por otra parte, la incorporación de NPs superparamagnéticas de magnetita en la estructura del SBA-15 mediante diversas rutas sintéticas, dará origen a una nueva generación de nanodispositivos magnéticos mesoporosos con múltiples funcionalidades que podrán ser utilizados en aplicaciones tanto de diagnóstico como terapéuticas.

3.2. OBJETIVOS

La presente tesis tiene tres objetivos fundamentales.

- ◆ El objetivo principal fue diseñar, sintetizar, funcionalizar y caracterizar tanto estructuralmente como fisicoquímicamente materiales tipo SBA-15.
- ◆ El segundo objetivo consistió en diseñar, sintetizar y caracterizar nanocomposites magnéticos mesoporosos (SBA-15/Fe₃O₄) innovadores.
- ◆ El tercer y último objetivo se basó en estudiar las aplicaciones biomédicas de los nanocomposites magnéticos mesoporosos (SBA-15/Fe₃O₄). Principalmente radicó en diseñar, desarrollar y caracterizar *andamios 3D* de última generación para ser aplicados en ingeniería de tejido óseo y medicina regenerativa; y probar su efectividad como sistemas de liberación controlada de fármacos.

3.1.1. Objetivos específicos

- ◆ Diseñar y sintetizar a baja temperatura materiales mesoporosos de sílice tipo SBA-15 orgánicamente modificados utilizando N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (N) y Bis [3-(triethoxisilil)propil] tetrasulfuro (S) como agentes funcionalizantes. Utilizar NaCl como modificador de la red de sílice en la síntesis de matrices mesoporosas. Llevar a cabo el proceso de funcionalización por el método de co-condensación.
- ◆ Por el método de co-condensación; utilizar diferentes relaciones molares N/TEOS, S/TEOS y N+S/TEOS durante la síntesis del SBA-15 para obtener distintos grados de funcionalización y diversas morfologías. Una vez sintetizados los materiales, eliminar el surfactante mediante extracción con disolventes. Optimizar el método de extracción con el fin de minimizar la cantidad de surfactante residual.
- ◆ Diseñar y sintetizar materiales mesoporosos ordenados de sílice tipo SBA-15, que sirvan como cerámicas precursoras para elaborar nanocomposites mesoporosos magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄) con múltiples funcionalidades. La magnetita se podrá sintetizar tanto en el interior de los canales de poros del SBA-15, como anclarse covalentemente a la superficie externa de los mismos.
- ◆ Utilizar diversas técnicas de caracterización como son análisis químico elemental (AQE), análisis termogravimétrico y su primera derivada (ATG/DTG), espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF), difracción de rayos-X (DRX), porosimetría de adsorción de N₂ (BET), microscopía electrónica de barrido y de transmisión (MEB y MET), resonancia magnética nuclear (RMN-²⁹Si) y magnetometría de muestra vibrante (VSM).
- ◆ Estudiar su aplicación como nanodispositivos de hipertermia magnética. Para los materiales core-shell (Fe₃O₄)_n@C y MNCN1_{HP}, estudiar sus propiedades tanto como agentes de contraste para MRI, como marcadores celulares, en el caso del último, también se realizará un ensayo de citotoxicidad por LDH.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- ◆ Desarrollar y elaborar *andamios* 3D de última generación utilizando polímeros naturales para facilitar la adhesión y el anclaje de los NCs (SBA-15/Fe₃O₄). Determinar sus propiedades mediante diversas técnicas de caracterización como son porosimetría de intrusión de mercurio (PIM), BET, MEB e IR-TF. Obtener con el software Pore Core, diversos modelos 3D simulados del sistema de poros de los *andamios*, usando los datos obtenidos por PIM. Así mismo, realizar estudios de adsorción y liberación de simvastatina a partir de los *andamios* 3D sintetizados. Tras adsorción de la simvastatina bajo agitación orbital, caracterizar los biomateriales mediante IR-TF. Finalmente monitorizar la concentración de fármaco liberado en función del tiempo mediante espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) y obtener las cinéticas de liberación ajustándolas a los modelos matemáticos correspondientes.

4. METODOLOGÍA

En este apartado se describe la parte experimental correspondiente a la síntesis a baja temperatura de SBA-15, SBA-15/NaCl, así como su modificación orgánica con grupos tetrasulfuro y etilendiamino. Asimismo, se describen las síntesis de distintos nanocomposites magnéticos de innovación propia elaborados a partir de cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice tipo SBA-15 y nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), también se muestra la síntesis de nanocomposites magnéticos funcionalizados con diversos grupos amino, partiendo de matrices SBA-15 ordenadas modificadas en presencia de glicerol. Por último se describen las técnicas experimentales empleadas para la caracterización química y estructural de los materiales resultantes.

4.1. MATERIALES

Para la síntesis de los materiales se emplearon los siguientes reactivos: tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{SiO}_4$ 98%, Aldrich); N-[3-(trimetoxisilil) propil] etilendiamina ($\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$ 97%, Aldrich); 3 aminopropil-trietoxisilano (APTES Aldrich); 3-aminopropil-metil-dietoxisilano ($\text{C}_8\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{Si} \geq 97\%$, Aldrich); Bis [3-(trietoxisilil)propil] tetrasulfuro ($\text{C}_{18}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{S}_4\text{Si}_2$ 90%, Aldrich); copolímero en bloque polioxietileno-polioxiopropileno (PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀, Pluronic® P123) suministrado por Aldrich; cloruro de sodio ($\text{NaCl} \geq 99\%$, Aldrich); cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 97%, Sigma Aldrich); sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 99%, Fluka Analytical); ácido clorhídrico (HCl 37%, Sigma Aldrich); ácido fosfórico (H_3PO_4 85%, Sigma Aldrich); hidróxido de amonio (NH_3 in H_2O 28%, Fluka Analytical); ácido poliacrílico [$(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$ average Mw 2000, Aldrich]; polietilenimina ramificada (average Mw 25,000, Aldrich); ácido oleico (extra puro, Merck); ciclohexano ($\text{C}_6\text{H}_{12} \geq 99.8\%$, Aldrich); Igepal CO-520 (Polioxietileno (5) nonilfeniléter, ramificado, Aldrich); ferroceno [$(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$ 98%, Aldrich]; peróxido de hidrógeno (H_2O_2 30%, Panreac); acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, CHROMASOLV, para HPLC, >99.9%, Aldrich); 2,2,4 trimetilpentano ($\text{C}_8\text{H}_{18} \geq 99\%$, Aldrich); 2-propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O} \geq 99.5\%$, Aldrich); etanol grado QP ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 99.9%, Scharlau); acetona QP ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \geq 99\%$, Scharlau); el agua desionizada (resistividad 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{m}$) se obtuvo con un sistema de agua ultrapura Milli-Q de Millipore®

4.2. SÍNTESIS DE CERÁMICAS MESOPOROSAS DE SÍLICE A BAJA TEMPERATURA

4.2.1. Síntesis de SBA-15

El material SBA-15 se sintetizó por el método sol-gel siguiendo el procedimiento descrito por Zhao y col³⁰. En una botella vidrio de 500 mL se incorporaron 8 g de Pluronic 123[®] a 276 mL de H₂O desionizada, la mezcla se colocó en un baño a 45°C, bajo agitación magnética vigorosa se adicionaron 20.6 mL de HCl (37%), una vez disuelto completamente el surfactante se añadieron 16.4 mL de TEOS, obteniéndose una composición molar de **1.0 TEOS / 0.017 P-123 / 208 H₂O / 3.4 HCl**. La reacción se dejó durante 24 h a 45°C, concluido este tiempo se suspendió la agitación y se introdujo en una estufa a 72 °C por un periodo de 24 h. Finalmente, el material resultante se filtró a vacío y se secó 24 h a 60 °C.

4.2.2. Síntesis de SBA-15/NaCl

Para comprobar el efecto que tendría la inclusión de NaCl en la reacción, se sintetizaron una serie de materiales SBA-15/NaCl. El procedimiento utilizado fue el descrito anteriormente, la variante consistió en incorporar 20 g de NaCl tras la adición del ácido clorhídrico durante la disolución del surfactante, quedando una composición molar de **1.0 TEOS / 0.017 P-123 / 208 H₂O / 3.4 HCl / 4.6 NaCl**.

4.2.3. Síntesis de SBA-15 funcionalizadas por co-condensación con grupos etilendiamino y tetrasulfuro

La funcionalización del SBA-15 por el método de co-condensación se llevó a cabo adicionando gota a gota el funcionalizante 20 minutos después de haber incorporado el TEOS a la disolución. El funcionalizante se disolvió previamente en isopropanol en una relación 1:5. Las cantidades de TEOS y de agente funcionalizante se calcularon con el fin de obtener una relación molar de funcionalizante del 2.5, 5, 7.5 y 10 % (respecto a los moles totales de los alcoxisilanos). Las distintas muestras se sintetizaron siguiendo el procedimiento descrito para el SBA-15, como se observa en las tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1. Cantidades de reactivos empleadas y composiciones molares para la síntesis de los materiales SBA-15 funcionalizados con los grupos etilendiamino y tetrasulfuro al 2.5, 5 y 7.5%.

Muestra	TEOS (mL)	N (mL)	S (mL)	Composición Molar
SBA-15	16.40			1 TEOS
SBA-N1	16.05	0.40		0.975 TEOS: 0.025 N
SBA-S1	16.05		0.92	0.975 TEOS: 0.025 S
SBA-N2	15.64	0.81		0.95 TEOS: 0.05 N
SBA-S2	15.64		1.84	0.95 TEOS: 0.05 S
SBA-N3	15.23	1.22		0.925 TEOS: 0.075 N
SBA-S3	15.23		2.76	0.925 TEOS: 0.075 S

Tabla 4.2. Cantidades de reactivos empleadas y composiciones molares para la síntesis de los materiales SBA-15 en presencia de NaCl, funcionalizados al 10 % y bifuncionalizados en relación 1:1 y 3:1 con los grupos etilendiamino y tetrasulfuro respectivamente.

Muestra	TEOS (mL)	NaCl (g)	N (mL)	S (mL)	Composición Molar
SBA-15Na	16.40	20			1 TEOS: 4.6 NaCl
SBA-NaN	14.80	20	1.63		0.9 TEOS: 4.6 NaCl: 0.1 N
SBA-NaS	14.80	20		3.68	0.9 TEOS: 4.6 NaCl: 0.1 S
SBA-NaNS ₁₁	14.80	20	0.81	1.84	0.9 TEOS: 4.6 NaCl: 0.05 N: 0.05 S
SBA-NaNS ₃₁	14.80	20	1.22	0.92	0.9 TEOS: 4.6 NaCl: 0.075 N: 0.025 S

4.3. SÍNTESIS DE NANOCOMPOSITES MAGNÉTICOS (SBA-15/Fe₃O₄)

Se desarrollaron procesos innovadores para la obtención de nanocomposites magnéticos con un amplio rango de aplicaciones. Cabe mencionar que un paso clave fue la síntesis previa de nanopartículas de magnetita por diferentes métodos, permitiendo conocer los parámetros y propiedades de las mismas, para ser modificados, optimizados y aplicados en las síntesis de las cerámicas magnéticas ordenadas de sílice.

4.3.1. Síntesis de cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15

Se sintetizaron dos cerámicas mesoporosas ordenadas como precursoras de los nanocomposites magnéticos. La síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento planteado en el apartado 4.2.1., sin embargo, la temperatura del proceso hidrotermal se modificó a 100°C. La composición molar fue **1.0 SiO₂ / 0.017 P123 / nH₃PO₄ / 3.4 HCl / 208 H₂O**, con $n=0$ para la muestra **S15_H** y $n=2.2$ para la muestra

S15_{HP}. En el caso del material S15_{HP}, tras la adición del TEOS la reacción se dejó bajo agitación vigorosa durante 2h y posteriormente se adicionó del H₃PO₄¹²⁷, ver tabla 4.3.

Tabla 4.3. Cantidades de reactivos empleadas para la síntesis de los materiales mesoporosos ordenados de sílice tipo SBA-15.

Muestra	Temp. (°C)	P123 (g)	H ₂ O (mL)	HCl (37%) (mL)	H ₃ PO ₄ (85%) (mL)	TEOS (mL)
S15 _H	100	16	552	41.2	0	32.8
S15 _{HP}	100	16	552	41.2	22	32.8

4.3.2. Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄@PAA) y (SBA-15/Fe₃O₄@PEI)

En un matraz bola de tres bocas se colocó una solución de HCl 0.01M, bajo agitación mecánica se añadieron FeCl₃•6H₂O y FeSO₄•7H₂O, pasados 15 minutos se adicionó la cerámica mesoporosa tipo SBA-15 (**S15**), la dispersión se dejó a temperatura ambiente bajo agitación mecánica vigorosa durante 30 minutos, posteriormente la mezcla se llevó a una temperatura de 60 °C, alcanzada la temperatura se adicionó NH₄OH, por lo que la muestra pasó de color castaño-marrón a negro cristalino indicando la formación de la magnetita, transcurridos 30 segundos se incorporó en la reacción ácido poliacrílico (PAA) o polietilenimina (PEI) según fuera el caso. Finalmente la reacción se llevó a cabo durante 1 hora. Las cantidades añadidas se muestran en la tabla 4.4. Concluida la reacción se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Bajo agitación mecánica se acidificó con HCl al 9% hasta conseguir un pH en torno a 4, separándose el precipitado con ayuda de un imán. Para lavar la muestra se agregó la misma cantidad de agua que el sobrenadante retirado y se agitó mecánicamente durante 15-20 min, posteriormente se colocó nuevamente sobre un imán para separar el agua de lavado, este proceso se repitió 3 veces. Finalmente el material obtenido se filtró a vacío y se secó a 60 °C durante 24h.

Tabla 4.4. Cantidades añadidas de reactivos en la síntesis de nanocomposites magnéticos sintetizados por el método de coprecipitación.

Muestra	Temp. (°C)	FeCl ₃ ·6H ₂ O (g)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g)	HCl (0.01M) (mL)	NH ₄ OH (mL)	PAA (g)	PEI (g)	S15 (g)
NCPEI _H	60	1.2	0.8	19	3.5	0	0.195	1
NCPEI _{HP}	60	1.2	0.8	19	3.5	0	0.195	1
NCPAA _H	60	1.2	0.8	19	3.5	0.195	0	1
NCPAA _{HP}	60	1.2	0.8	19	3.5	0.195	0	1
NCHPAA _H	60	1.8	1.2	25	5.2	0.292	0	1
NCHPAA _{HP}	60	1.8	1.2	25	5.2	0.292	0	1

4.3.3. Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂)

La síntesis innovadora de estos materiales se basó en el anclaje covalente de nanopartículas de magnetita a la superficie de las matrices mesoporosas de sílice, mediante un recubrimiento de SiO₂. Para lo cual fue necesaria la síntesis previa de las NPs de magnetita recubiertas con ácido oleico.

La síntesis de las NPMs se llevó a cabo por el método de coprecipitación, se eligió ácido oleico (OA) para funcionalizar la superficie de las nanopartículas para conferirles estabilidad en disolventes orgánicos (Tabla 4.5). En un matraz bola de tres bocas se colocó una solución de HCl 0.01M, bajo agitación mecánica se añadieron FeCl₃·6H₂O y FeSO₄·7H₂O, la mezcla se llevó a una temperatura de 60 °C, alcanzada la temperatura se adicionó NH₄OH, por lo que la muestra pasó de color castaño-marrón a negro cristalino indicando la formación de la magnetita, transcurridos 30 segundos se incorporó el ácido oleico. Terminada la reacción la muestra se trasvasó a un vaso de precipitado y se colocó sobre una placa calefactora a 100 °C con agitación magnética (sin usar barra agitadora) hasta que se produjera floculación (aproximadamente 10 - 40 min), la muestra se separó del sobrenadante usando un imán. Para lavar las NPMs se utilizaron 300 mL de agua desionizada, la dispersión se agitó mecánicamente, al cabo de 15-20 min se colocó en la placa, retirándose el sobrenadante nuevamente, este procedimiento se realizó tres veces. Sin secar por completo las partículas se redispersaron en ciclohexano (CHX) para obtener una solución orgánica final de magnetita recubierta con ácido oleico estabilizada en CHX (Fe₃O₄@OA en CHX, MOA) de 17.4 % en peso de Fe₃O₄@OA ó 12.1 % en peso de magnetita. El agua ocluida se eliminó separando la fase orgánica-magnética de la fase acuosa.

Tabla 4.5. Cantidades de reactivos utilizadas en la síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico por el método de microemulsión.

Muestra	Temp. (°C)	FeCl ₃ ·6H ₂ O (g)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g)	HCl (0.01M) (mL)	NH ₄ OH (mL)	OA (g)
MOA	60	24.3	16.7	200	60	4.0

Una vez sintetizadas las NPs se procedió al anclaje de las mismas sobre la superficie de los materiales mesoporosos de sílice, la síntesis se diseñó aprovechando las propiedades que tienen las NPMs de formar estructuras core-shell (Fe₃O₄@SiO₂). En base a esto se recubrió la superficie con una capa nanométrica de SiO₂ amorfa, lo que permitió conservar las propiedades de las NPMs.

El nanocomposite magnético (SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂), se preparó en un matraz bola de tres bocas al cual se añadió ciclohexano e Igepal, la mezcla se mantuvo en agitación mecánica durante 15 minutos con la finalidad de homogeneizarla. A continuación se adicionó la solución de NPMs (MOA). La mezcla se dejó bajo agitación mecánica vigorosa durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se incorporó NH₄OH, pasado un minuto se agregó la cerámica mesoporosa correspondiente (**S15**), la dispersión se dejó agitando durante 20 minutos antes de la adición del TEOS. Terminada la reacción se agregó alcohol isopropílico (IPA) para precipitar el material, la mezcla continuó en agitación por 15 minutos, transcurrido este tiempo se separó el nanocomposite resultante del sobrenadante con ayuda de un imán. Se realizaron cuatro lavados subsecuentes con etanol (EtOH) agitando vigorosamente la muestra a temperatura ambiente y separándola de la misma forma, posteriormente se llevaron a cabo cinco lavados con H₂O desionizada, dos bajo agitación mecánica, y tres en un baño ultrasónico de 20 min, la separación fue magnética en todos los casos. Tras los lavados el nanocomposite se filtró a vacío y se secó a 60°C por 24h, las cantidades se presentan en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Cantidades de reactivos empleadas en la síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄-SiO₂).

Muestra	MOA en CHX dil. 1:5 (mL)	MOA (mL)	CHX (mL)	Igepal (mL)	NH ₄ OH (mL)	TEOS (mL)	IPA (mL)	EtOH _L (mL)	H ₂ O (mL)	S15 (g)
LMNC _H	4.8	0	56	3.6	1.0	0.4	46	40	40	1
LMNC _{HP}	4.8	0	56	3.6	1.0	0.4	46	40	40	1
HMNC _H	0	4.8	56	3.6	1.0	0.4	46	40	40	1
HMNC _{HP}	0	4.8	56	3.6	1.0	0.4	46	40	40	1

4.3.4. Síntesis de nanocomposites magnéticos [SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C]

En una botella de vidrio de 30 mL se disolvió ferroceno en acetona de alta pureza, la solución se dejó durante 30 minutos bajo agitación magnética vigorosa a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se agregó peróxido de hidrógeno, manteniéndose en agitación durante 30 minutos. Posteriormente la solución se trasvasó a un recipiente de teflón de 40 mL, la cerámica mesoporosa (S15) fue incorporada en esta fase del proceso, una vez disperso el material en la solución preparada, se introdujo en una autoclave de acero inoxidable, la reacción se llevó a cabo a una temperatura de 210°C por un periodo de 96 h. Finalizada la síntesis, el reactor se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. El nanocomposite de color negro se separó del sobrenadante con ayuda de un imán, la muestra se lavó repetidas veces con acetona. Una vez realizados los lavados con acetona, el nanocomposite resultante se filtró a vacío y se secó a 60°C por un periodo de 24h, tabla 4.7.

Tabla 4.7. Cantidades de reactivos empleadas en la síntesis de nanocomposites magnéticos [SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C].

Muestra	Ferroceno (g)	Acetona (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	S15 (g)
MANC _H	0.24	20	1.2	0.50
MANC _{HP}	0.24	20	1.2	0.50
CSNC _H	0.24	20	1.2	0.25
CSNC _{HP}	0.24	20	1.2	0.25

4.3.5. Síntesis de cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15 en presencia de glicerol

Con la finalidad de modificar el tamaño de partícula y la morfología de las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice, se sintetizaron dos nuevas matrices. La síntesis se realizó basada en el apartado 4.2.1., modificando algunos parámetros. Tras la adición de la solución ácida al recipiente de vidrio que contenía el Pluronic, se incorporó glicerol¹²⁸ bajo agitación magnética vigorosa. Una vez completamente disuelto el surfactante, se añadió TEOS a la solución, la nueva mezcla se mantuvo en agitación durante 24h, posteriormente se suspendió y se dejó estática durante 24h, las cantidades se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Cantidades de reactivos empleadas para la síntesis de los materiales mesoporosos ordenados de sílice tipo SBA-15 modificados con glicerol.

Muestra	Temp. (°C)	P123 (g)	HCl (2.5M) (mL)	H ₃ PO ₄ (2.5M) (mL)	Glicerol (g)	TEOS (mL)
S15G _H	100	7.83	300	0	7.83	18
S15G _{HP}	100	7.83	200	100	7.83	18

4.3.6. Síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizados con NH₂)

La síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 4.3.3. Para la obtención de estas muestras se utilizaron los materiales mesoporosos sintetizados en presencia glicerol (**S15G**). La modificación consistió en sustituir el TEOS por los funcionalizantes amino N1, N2 o N3 (ver glosario). Las cantidades se exponen en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Cantidades de reactivos empleadas en la síntesis de nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂) funcionalizados con grupos aminos.

Muestra	MOA dil. 1:5 (mL)	CHX (mL)	Igepal (mL)	NH ₄ OH (mL)	N1/N2/N3 (mL)	IPA (mL)	EtOH _l (mL)	H ₂ O _l (mL)	S15G (g)
MNCN1 _H	2.4	28	1.8	0.5	0.315	50	50	50	0.5
MNCN1 _{HP}	2.4	28	1.8	0.5	0.315	50	50	50	0.5
MNCN2 _H	2.4	28	1.8	0.5	0.292	50	50	50	0.5
MNCN2 _{HP}	2.4	28	1.8	0.5	0.292	50	50	50	0.5
MNCN3 _H	2.4	28	1.8	0.5	0.283	50	50	50	0.5
MNCN3 _{HP}	2.4	28	1.8	0.5	0.283	50	50	50	0.5

4.4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES DE CARACTERIZACIÓN

Una vez obtenidos los materiales se procedió a su caracterización fisicoquímica y estructural utilizando diferentes técnicas: difracción de rayos-X (DRX), análisis químico elemental (AQE), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF), análisis termogravimétrico y su primera derivada (ATD/DTG), porosimetría de adsorción de N₂ (BET), microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET), resonancia magnética nuclear de ²⁹Si (RMN ²⁹Si), magnetometría de muestra vibrante (VSM).

4.4.1. Difracción de rayos-X (DRX)

4.4.1.1. Difracción de rayos X a bajo ángulo

La caracterización estructural mediante DRX de las matrices mesoporosas de sílice, así como de los nanocomposites se llevó a cabo en un difractómetro PANalytical X'Pert Powder Empyrean a 60 kV y 4 kW. Los difractogramas se obtuvieron a bajo ángulo, es decir, para 2θ entre $0.25 - 6^\circ$ y un paso de 0.01° (5 s/paso). Esto se debe a que los materiales mesoporosos presentan periodicidad de los poros en este rango y son amorfos a escala atómica. Además carecen de periodicidad longitudinal por lo que son fáciles de identificar gracias a la presencia de reflexiones ($hk\theta$).

El SBA-15 presenta una estructura hexagonal 2D. Por tanto, el espacio interplanar se define como:

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \cdot \left(\frac{h^2 + k^2 + hk}{a^2} \right) + \left(\frac{l^2}{c^2} \right)$$

Como se dijo anteriormente $l=\theta$ entonces se puede definir el parámetro de celda con un único valor, a_0 :

$$a_0 = \frac{2 \cdot d_{100}}{\sqrt{3}}$$

4.4.1.2. Difracción de rayos X de polvos

El estudio de las fases cristalinas de los nanocomposites magnéticos mesoporosos se realizaron en un difractómetro de polvos Philips equipado con una unidad de control Philips "PW1710", goniómetro vertical Philips "PW1820/00" y un generador de Enraf Nonius FR590. El instrumento estaba equipado con un monocromador de haz difractado de grafito y una fuente de radiación de cobre ($\lambda (K\alpha) = 1.54186 \text{ \AA}$), que funciona a 40 kV y 30 mA. El patrón de difracción de polvos de rayos X (XRPD) fue colectado midiendo la respuesta de centelleo a la radiación Cu $K\alpha$ en comparación con el valor de 2θ a lo largo de un intervalo de 2θ de $10 - 80^\circ$, con un paso de 0.02° y un conteo de 10 s por paso. Un factor importante en la calidad de los difractogramas de polvos, fue pulverizar las muestras hasta obtener un tamaño de partícula alrededor de $1-5 \mu\text{m}$ para asegurar que las partículas quedaran orientadas al azar, evitando una

orientación preferente. Al colocar una cantidad suficiente de material en el portamuestras, se garantizó una mayor exposición de orientaciones posibles a la radiación incidente.

Si la red cristalina está libre de deformación y los cristales predominan de manera general en la muestra entonces se puede estimar el tamaño promedio de cristal empleando la fórmula de Scherrer¹²⁹:

$$\beta(2\theta) = \frac{K\lambda}{FWHM(S) \cos \theta}$$

donde β es el tamaño promedio de cristal; K es el factor de forma del cristal y su valor es de 0.9-1.0; λ es la longitud de onda de la radiación utilizada (λ_{Cu}); θ es la posición del pico de difracción y FWHM (S) es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra.

Para calcular el ancho a la altura media del pico de difracción se usa la fórmula:

$$FWHM(S)_{MUESTRA}^D = FWHM(M)_{MEDIDO}^D - FWHM(I)_{INSTRUMENTAL}^D$$

donde FWHM(S) es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra. D es el parámetro de deconvolución, cambia de acuerdo al tipo de perfil del pico de difracción, para un perfil Gaussiano D = 2 y para un perfil Lorentziano D = 1; FWHM(M) es el ancho a la altura media del pico de difracción medido en el difractómetro. FWHM(I) es la contribución del ancho a la altura media originado por el instrumento y se calcula mediante la función instrumental del equipo de rayos-X.

Para calcular el tamaño de cristal se debe escoger un pico de difracción resuelto y hay que asegurarse de que el valor de FWHM (S) esté convertido a radianes para que el tamaño de cristal tome las unidades de la longitud de onda del ánodo utilizado. Nota: Si se escoge el área integral para estimar el tamaño de cristal se debe de colocar el valor de D cercano a 1.0.

4.4.2. Análisis químico elemental (AQE) y espectroscopia de absorción atómica con llama (FAAS)

Esta técnica permitió el análisis de forma rápida y simultánea del contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre, presentes en los compuestos orgánicos e inorgánicos, tanto en estado sólido como líquido. El microanálisis o AQE se basó en la oxidación total de la muestra mediante una combustión instantánea y completa. Esta técnica fue empleada para conocer la composición de las

muestras funcionalizadas con diversos grupos orgánicos y así calcular el porcentaje de funcionalización de cada una. El microanálisis elemental de C, H, N y S se realizó en un termo analizador elemental LECO CHNS-932 perteneciente al servicio del Centro de Apoyo Científico y Tecnológico de la Universidad de Santiago de Compostela.

En la espectroscopia de absorción con llama (FAAS), la muestra en solución fue nebulizada e introducida dentro de la llama, en donde fue desolvatada, vaporizada y atomizada, todo esto en rápida sucesión. Se hizo pasar un haz de luz con longitudes de onda que son absorbidas por los átomos en el estado fundamental y se midió la pérdida de intensidad de luz. Con el FAAS fue posible obtener el porcentaje de hierro (Fe) presente en los nanocomposites magnéticos. La caracterización se llevó a cabo en el equipo Perkin Elmer 3110.

4.4.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IR-TF)

La identificación de los grupos funcionales presentes en los materiales se realizó mediante IR-TF. Estas medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus en modo transmisión entre 400 y 4000 cm^{-1} . Se adaptó el sistema de reflectancia total atenuada (ATR) que dispone de un soporte con cristal de diamante, permitiendo realizar las mediciones de manera fácil y rápida.

4.4.4. Análisis Termogravimétrico (TGA/DTG)

Durante el proceso de análisis mediante TGA de las distintas muestras se produjeron pérdidas de peso que permitieron determinar la cantidad de materia orgánica presente en los materiales analizados. El análisis mediante TGA/DTG de las cerámicas mesoporosas de sílice sintetizadas a baja temperatura se realizó en una termobalanza SDT Q600-TA de Thermal Analysis Instruments entre 40 y 1000 °C con un flujo constante de argón de 100 mL/min, y una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Mientras que para los nanocomposites magnéticos y sus cerámicas precursoras, la caracterización se llevó a cabo en una balanza termogravimétrica Perkin Elmer TGA7 entre 40 y 850 °C con un flujo constante de N_2 o O_2 de 20 mL/min, y una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Para estos ensayos se utilizaron crisoles de platino y α -alúmina como referencia.

4.4.5. Porosimetría de Adsorción de N₂ (BET)

Para conocer las propiedades texturales de los materiales obtenidos (superficie específica, volumen de poro y diámetro de poro) se recurrió a la adsorción y desorción de gases inertes, en este caso N₂. Para realizar estas medidas se empleó un porosímetro de adsorción de N₂ Quantachrome Autosorb IQ2 operando desde 10 a 127 kPa a la temperatura de N₂ líquido, (-196 °C). Antes de realizar las medidas se desgasificaron a vacío a una temperatura de 60 °C durante un periodo de 10 h.

Uno de los parámetros que se obtuvieron con esta técnica fue el área superficial que se calcula con la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET)¹³⁰:

$$\frac{p/p^o}{n(1 - p/p^o)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{(C - 1)}{n_m C} (p/p^o)$$

donde n es la cantidad específica adsorbida a la presión relativa p/p^o y n_m es la capacidad específica de la monocapa adsorbido.

De acuerdo con la teoría BET, el parámetro C está exponencialmente relacionado a la energía de adsorción de la monocapa. En la actualidad se ha acordado que el valor de C provee una indicación útil de la forma de la isoterma en el rango BET.

A partir de las isotermas de adsorción y desorción se pudo conocer la distribución de tamaños de poro. Para ello se usa la ecuación de Barrett-Joyner-Halenda (BJH)¹³¹ en la rama de desorción. Para calcular el tamaño de mesoporo se empleó la siguiente relación:

$$w = c \cdot d \cdot \left[\frac{\rho \cdot V_p}{(1 + \rho \cdot V_p)} \right]^{1/2}$$

donde $c = \left(\frac{8}{3^{1/2} \cdot \pi} \right)^{1/2}$, ρ es la densidad de la pared, d es la distancia interplanar obtenida por DRX y V_p es el volumen de poro obtenido mediante adsorción de N₂ (t-Plot).

El tipo de isoterma de adsorción que se obtuvo para los materiales mesoporosos SBA-15 fue del tipo IV, según la IUPAC¹³² se distinguen cinco zonas (Figura 4.1):

- ☉ Zona I: Formación de una monocapa sobre la superficie.
- ☉ Zona II: Formación de multicapas sobre la monocapa inicial.
- ☉ Zona III: Condensación capilar en el interior de los canales. La presión relativa está relacionada con el diámetro de poros. El tamaño de poro es más homogéneo cuanto más estrecha y mayor pendiente tenga.
- ☉ Zona IV: Adsorción multicapa de la superficie externa.
- ☉ Zona V: Llenado del espacio entre partículas debido a la condensación. Esta zona aparecerá a menores presiones relativas cuanto menor sea el tamaño de partícula.

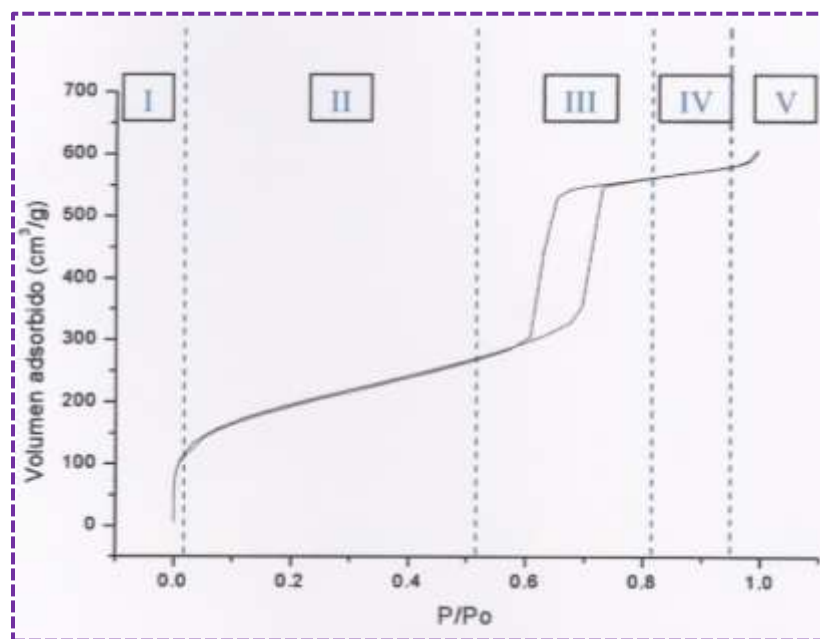


Figura 4.1. Zonas de una Isotherma de Adsorción de N₂.

También se empleó el método de Non-Local Density Functional Theory (NLDFT, por sus siglas en inglés). Este método se basa en la construcción de un potencial funcional $\Omega[\rho(r)]$ de la densidad del fluido $\rho(r)$:

$$\Omega[\rho_L(r)] = F[\rho_L(r)] + \int dr \rho_L(r) [V_{ext} - \mu]$$

donde $F[\rho(r)]$ es la energía libre de Helmholtz “intrínseca” del fluido, V_{ext} es el potencial externo provisto por el sólido, μ es el potencial químico y la integración es sobre todo el volumen. $F[\rho(r)]$ se

escribe como la suma de $F_{repulsiva} + F_{atractiva}$; la parte repulsiva se aproxima a la energía libre de un fluido de esferas duras, para obtener el perfil de densidad en equilibrio se minimiza el potencial funcional respecto de la densidad, es decir:

$$\frac{\delta\Omega[\rho_L(r)]}{\delta\rho_L(r)} = 0$$

Estos potenciales consisten en términos que describen las partes repulsivas y atractivas de las interacciones fluido-fluido y fluido-sólido. Así el método NLDFT provee una visión más realista y una descripción adecuada del comportamiento de un fluido confinado en poros de diversas geometrías, las distribuciones de tamaño de poro que de él se obtiene son correctas, pero su aplicación está limitada a estructuras porosas compuestas de poros independientes entre sí.

4.4.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La morfología y topografía de los materiales SBA-15, SBA-15/NaCl y de las muestras funcionalizadas sintetizadas a baja temperatura fueron caracterizadas con un microscopio JEOL JSM-6701F (operando a 15 kV), el resto de los materiales (las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice y los nanocomposites magnéticos) fueron caracterizados con un microscopio Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (operando a 5 kV) con el que se consiguieron imágenes de mayor resolución. Para obtener las micrografías de los materiales fue necesario preparar una dispersión de cada una de las muestras, por lo que se tomó una pequeña cantidad de la cerámica mesoporosa o del nanocomposite magnético con la punta de una espátula y se colocó en un tubo eppendorf, posteriormente se adicionaron 0.5 mL de etanol o acetona, la mezcla se sonicó durante 10 minutos hasta la completa dispersión del material en el medio, para ser depositados 20 μ L en un disco de aluminio dejándose secar bajo una lámpara, una vez seco el material, el proceso se repitió tres veces, finalmente las muestras fueron sombreadas con una fina capa de iridio (de aprox. 5-10 nm) antes de ser analizadas.

4.4.7. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La estructura porosa ordenada y desordenada, la disposición hexagonal y el sistema de canales de poros de los materiales fueron caracterizados con un microscopio JEOL JEM-1011 (100 kV) y un microscopio de alta resolución ZEISS Libra 200 FE OMEGA con EDX (operado a 200 kV) con una resolución de 0.073 nm medida a 200 kV. Para obtener las imágenes se requirió preparar las muestras con poco tiempo de

anticipación a ser analizadas. Se utilizó la dispersión anteriormente descrita en 4.4.6., de esta forma, se depositaron sobre una rejilla de cobre con película de carbono (Electron Microscopy Sciences CF400-Cu), 10 μ L de la solución (una gota) y se dejaron secar bajo una lámpara de luz blanca.

4.4.8. Resonancia Magnética Nuclear de ^{29}Si (RMN- ^{29}Si)

Esta técnica permite principalmente la elucidación de estructuras moleculares, debido a las propiedades de algunos núcleos atómicos (momentos magnéticos distintos de cero) al ser sometidos a un campo magnético externo, ya que son capaces de absorber radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. En el caso de los sólidos en particular las señales son muy anchas, llegando a ser de varios kHz ó incluso MHz, lo que impide la obtención de información de manera fácil. Este ensanchamiento implica, además, una pérdida de sensibilidad, especialmente cuando se estudian núcleos poco abundantes. Las unidades del silicio se determinaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN) usando la técnica de *rotación en el ángulo mágico* conocida como (MAS) de ^{29}Si en estado sólido. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Advance 400 con una anchura espectral de 32 kHz. Se utilizó un rotor de 4,0 mm. La velocidad del MAS fue de 5 kHz. Los espectros de RMN de ^{29}Si MAS fueron referenciados con respecto a tetrametilsilano (TMS) y medidos durante 8 horas.

4.4.9. Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM)

Las curvas de magnetización como una función del campo magnético aplicado de hasta 10 kOe, se realizaron a temperatura ambiente con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) DMS 1660 sobre las muestras secas en polvo. Los datos de magnetización se normalizaron con respecto a la cantidad en masa de magnetita presente en cada muestra, valor que fue estimado teniendo en cuenta que todo el hierro presente (determinado por FAAS) existe como Fe_3O_4 .

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

En este apartado se encuentran descritas las metodologías desarrolladas para algunas potenciales aplicaciones biomédicas de los materiales sintetizados en el capítulo 4. Se elaboraron *andamios 3D* a partir de una mezcla de polímeros naturales con los nanocomposites magnéticos anteriormente descritos; también se realizaron ensayos de carga y liberación controlada de simvastatina para comprobar su capacidad como sistemas de liberación controlada de fármacos. Se demostró el uso de nanoestructuras core-shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$) como marcadores celulares biocompatibles aptos para resonancia magnética de imagen (RMI). Se estudió tanto la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*, como la capacidad para actuar como marcadores celulares del material MNCN1_{HP} . Finalmente se estudió el comportamiento de estos sistemas mesoporosos magnéticos como nanodispositivos para hipertermia magnética.

5.1. ANDAMIOS 3D

5.1.1. Materiales

Para la preparación de los andamios se emplearon los siguientes materiales: k-Carragenato (Gelcarin GP 812NF) suministrado por IMCD (United Kingdom); Quitosano indio (Sinochem quingdao) Co.LTD (China); Hidroxiapatita Fluka suministrada por Aldrich (Alemania); 1,4- Butandiol-diglicidileter (BDDE) suministrado por Aldrich (Suiza); Simvastatina suministrada por Fagron (España). El resto de los reactivos y sustancias empleadas en los diferentes estudios fueron de calidad analítica.

5.1.2. Elaboración de *andamios 3D*

Para la elaboración de los andamios se realizaron dos preparaciones por separado A y B.

- A. Se preparó una dispersión de K-carragenato en agua desionizada a 70 °C bajo agitación magnética vigorosa.

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

- B. Por otra parte se realizó una dispersión de quitosano en agua desionizada acidificada con ácido acético glacial, dando como resultado la formación de un gel viscoso, al que posteriormente se incorporó bajo agitación magnética vigorosa hidroxiapatita y/o el nanocomposite mesoporoso sintetizado anteriormente.

Una vez obtenidas ambas preparaciones, se agregó A sobre B y se homogeneizaron con un Ultraturrax T25 a 24,000 rpm, hasta observar la misma consistencia en todo el material (aprox. 5 min.). Finalmente se adicionó el agente reticulante (BDDE).

Para darle forma cilíndrica al andamio, se depositó la mezcla homogénea en una jeringa de 10 mL, la cual se introdujo en un congelador a -20 °C. Una vez congelada se continuó el proceso de reticulación, por lo que el andamio se desmoldó y sumergió en una solución básica de cloruro de potasio al 1 % entre 50 y 60 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo el andamio se retiró y se lavó con agua destilada para ser congelado nuevamente a -20 °C, una vez congelado se liofilizó para obtener el producto final. Las cantidades de los reactivos se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Cantidades utilizadas para la elaboración de los *andamios*.

k-Carragenato (mg)	Quitosano (mg)	A: H ₂ O (mL)	B: H ₂ O (mL)	Ac. Acético glacial (mL)	HA/NC* (mg)	BDDE (mL)	KCl al 1% pH > 9 (mL)
100	300	5	5	0.05	335	0.4	40

*depende del nanocomposite mesoporoso utilizado

En la siguiente tabla se recaban las cantidades (mg) empleadas de cada material mesoporoso, tanto de las cerámicas, como de los nanocomposites magnéticos.

Tabla 5.2. Nanocomposites magnéticos y cantidades empleadas en la elaboración de los *andamios*.

	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7	Sc8
*	S15 _{HP} HA	LMNC _{HP} HA	MANC _{HP} HA	S15 _H	NCPEI _H	LMNC _H	HMNC _{HP}	NCHPAA _{HP}
NC	100	170	170	335	335	335	335	335
HA	235	165	165	0	0	0	0	0

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

5.1.3. Proceso de carga de simvastatina en los *andamios* 3D

Andamios de $\varnothing = 1$ cm x 1 cm de largo se sumergieron en 10 mL de una solución de simvastatina en agua/etanol (1:1) con una concentración de 3 mg/mL. La carga se llevó a cabo en un incubador a temperatura ambiente y 180 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras cargadas se retiraron, se secaron cuidadosamente y se congelaron a 20 °C durante 24 h, antes de ser liofilizadas las muestras se congelaron con nitrógeno líquido a (-195.8°C). La concentración inicial de simvastatina se determinó en el ensayo de liberación mediante espectrofotometría UV-Vis a 239 nm, sumándose la cantidad liberada en cada fracción recolectada a los tiempos estipulados, el ensayo se llevó a cabo hasta el 100% de liberación de simvastatina.

5.1.4. Liberación de simvastatina

Las pruebas de liberación se llevaron a cabo de forma semicontinua, el ensayo se realizó en una incubadora con agitación orbital IKA KS 4000ic a 37 °C y 80 rpm. Los *andamios* se cortaron para obtener piezas con un tamaño de 1 cm de diámetro x 0.7 - 0.6 cm de espesor con la finalidad de tener un peso aproximado de 100 ± 10 mg. Cada *andamio* se colocó en un vial de vidrio de 20 mL y se suspendió en 4 mL de una solución de PBS a pH 7.4, dejándose bajo agitación orbital durante un determinado periodo de tiempo. Cumplido el plazo se recolectaron los 4 mL (con una cantidad x de *simvastatina* liberada) en viales eppendorf y se adicionaron nuevamente 4 mL de la disolución de PBS para continuar con la liberación, de ésta forma se recolectaron las fracciones correspondientes a cada tiempo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 9, 25, 49, 75, 98, 125, 148, 172, 195, 217, 313, 362, 388, 480, 506, 552, 582, 648... hasta 1500 h). La cantidad de *simvastatina* liberada se midió mediante espectroscopia UV-Visible a 239 nm, siendo esta la longitud de onda promedio a la cual se tuvo la máxima absorbancia, para hacer el análisis cuantitativo.

Todas las medidas se hicieron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de Diodos Specord S600 de Analytik Jena. Para determinar la cantidad liberada se realizó previamente un calibrado utilizando estándares de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1, 0.12, 0.14 y 0.16 mg/mL de *simvastatina* en una disolución de PBS 1 X a pH = 7.04. Así se obtuvo una recta de calibrado de $Abs = 5.55 [simvastatina]$ con un factor de regresión de 0.98.

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

5.1.5. Técnicas experimentales de caracterización de los *andamios* 3D

5.1.5.1. Porosimetría de mercurio

La porosidad de los *andamios* se analizó usando un porosímetro de intrusión de mercurio Micromeritics 9305 (Norcross GA, USA) empleando un penetrómetro para polvo de 3 mL y presiones de trabajo en el intervalo 0.004–172.4 MPa. El peso utilizado de las muestras fue aproximadamente 0.25 gramos. La distribución de poros se empleó para modelizar la estructura porosa de las muestras mediante el software Pore-Cor™ 6.11 software (Environmental and Fluid Modelling Group, University of Plymouth, UK).

5.1.5.2. Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron muestras al azar de diversos tamaños de cada *andamio* liofilizado, las cuales se colocaron sobre discos de aluminio mediante una cinta de grafito, posteriormente fueron sombreadas con iridio para poder analizar la porosidad interna de los *andamios*. Tras preparar las muestras se realizaron micrografías utilizando el microscopio FE-SEM ULTRA Plus (trabajando a 5 kV).

5.1.5.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo tanto de los *andamios* sin cargar, como los cargados con simvastatina, el procedimiento fue el descrito en 4.4.3.

5.2. MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA RMI A PARTIR DE ESTRUCTURAS CORE-SHELL TIPO $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$

El paso clave en la obtención de los innovadores nanocomposites [SBA-15/ $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$] fue la síntesis previa de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$. Sin embargo, las estructuras core-shell por sí solas presentan un gran número de aplicaciones en el campo biomédico debido a sus propiedades, entre las que destacan su biocompatibilidad y sus características magnéticas, de allí su importancia en el proceso de elaboración de los NCs. En este punto se muestran las aplicaciones de los sistemas core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$ tanto para marcaje celular como para MRI.

5.2.1. Síntesis de las estructuras core-shell (Fe_3O_4) $_n$ @C

En una botella de vidrio de 30 mL se disolvieron 0.3 g de ferroceno en 25 mL de acetona de alta pureza, la solución se dejó durante 30 minutos bajo agitación magnética vigorosa a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se agregaron 1.5 mL de peróxido de hidrógeno, manteniéndose en agitación durante 30 minutos. Posteriormente la solución se trasvasó a un recipiente de teflón de 40 mL, el cual se introdujo en un autoclave de acero inoxidable (Parr Instruments, Acid digestion vessel 4744), la reacción se llevó a cabo a una temperatura de 210°C por un periodo de 96 h. Finalizada la síntesis, el reactor se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. El sólido negro obtenido se separó del sobrenadante con ayuda de un imán, la muestra se lavó repetidas veces con acetona. Finalmente la acetona fue reemplazada por agua desionizada.

5.2.2. Técnicas experimentales de caracterización de las estructuras core-shell (Fe_3O_4) $_n$ @C

El sistema core-shell (Fe_3O_4) $_n$ @C se caracterizó por diversas técnicas anteriormente descritas en el apartado 4.4. Con difracción de rayos X de polvos (4.4.1.2) fue posible calcular el tamaño de dominio cristalino de las nanopartículas de magnetita que conforman el core, analizando la información obtenida de las reflexiones 111, 220, 311, 400, 422, 511, 440 con el programa Philips APD - Fit profile y aplicándola a la fórmula de Scherrer. Así mismo usando las micrografías obtenidas de las microscopías electrónicas tanto de barrido como de transmisión (microscopio Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (trabajando a 5 kV) y microscopio JEOL JEM-1011 (100 kV), respectivamente), fue posible a través del software Image J y de MicroCal Origin realizar la estadística para obtener la distribución de tamaños del espesor de carbono y del sistema core-shell.

Las curvas de magnetización en función del campo magnético aplicado (hasta 25 kOe) se realizaron en un rango de temperaturas de interés (250, 275, 300, 320 K), utilizando un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID, por sus siglas en inglés) aplicado a la muestra en sólido. Los datos de magnetización se normalizaron con respecto a la cantidad en masa de magnetita en la muestra, la cual se cuantificó mediante análisis termogravimétrico (4.4.4).

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

5.2.3. Biocompatibilidad, marcaje celular y respuesta MRI de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por la Dra. Bárbara Arbigay

El experimento se llevó a cabo utilizando células troncales mesenquimales (MSCs) compradas a Cultrex, Trevigen, las cuales se cultivaron en IMDM (78%), suero bovino fetal (10%), suero de caballo (10%), penicilina-estreptomicina (1%), todos de Gibco Invitrogen, y anfotericina-B (1%) de Sigma-Aldrich.

Para estudiar la biocompatibilidad y las características de estos sistemas como marcadores celulares se incubaron durante 24h:

- ❖ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del ferrofluido $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ en el medio con células MSCs
- ❖ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del ferrofluido $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ + 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poli-L lisina (PLL)** en el medio con células MSCs.

Transcurridas las 24 h se realizaron tres lavados a las células con 1.5 mL de tampón fosfato salino (PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , Gibco Invitrogen) para retirar las NPs que no quedaron adheridas a ellas. Después de los lavados, se añadió 1 mL de medio fresco a las células y se incubaron durante la noche (12 h) para permitir la completa internalización de las NPs.

La tinción con azul de Prusia se llevó a cabo para demostrar la absorción de las NPs por las células. Tras las 12 h, las células se incubaron durante 20 minutos con una mezcla de partes iguales de una solución acuosa de HCl al 20 % en peso y una solución acuosa al 10 % en peso de ferrocianuro de potasio trihidratado ($\text{KFe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich). Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS.

En un segundo experimento se evaluó la necesidad de utilizar Poli-L-Lisina para el marcaje. Usando una concentración constante de PLL (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se estudió el efecto de la concentración de nanopartículas de $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ en H_2O para ser internalizadas por las células, como se muestra en la tabla 5.3. La internalización se evaluó por tinción con azul de Prusia.

Todas las fotografías realizadas para estos experimentos fueron tomadas usando un microscopio óptico invertido (Olympus IX51).

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tabla 5.3. Volumen estudiado del ferrofluido [(Fe₃O₄)_n@C/H₂O].

Muestra	V _{medio} (mL)	V _{MNP} (μL)
1	1	50
2	1	30
3	1	10
4	1	5
5	1	2
6	1	1

**Los poliaminoácidos como la poli-L-lisina facilitan la unión de las células y las proteínas a las superficies sólidas en aplicaciones biológicas. En cultivos de células, la unión, la proliferación, el crecimiento, la morfología, la diferenciación y la motilidad de muchos tipos de células depende de diversos factores y componentes de la matriz extracelular. Mientras que algunas células son capaces de sintetizar estos componentes, otras requieren una fuente exógena como los poliaminoácidos para poder realizar todas estas actividades.

5.2.3.1. Respuesta RMI de las estructuras core-shell core-shell (Fe₃O₄)_n@C

Los halos son útiles para calibrar equipos y para probar secuencias en RMI. Para ser eficaces, el material usado debería¹³³:

- ♣ Tener tiempos de relajación similares a los de los tejidos humanos
- ♣ Tener una relajación uniforme a lo largo de todo el halo
- ♣ Ser fácil de manejar
- ♣ Ser estable física y químicamente durante periodos de tiempo razonablemente largos

Los halos que tratan de reproducir el comportamiento de tejidos biológicos suelen ser disoluciones acuosas de alguna sal, sin embargo, una alternativa eficaz es el uso de geles, ya que evitan las corrientes de convección y se relajan de una forma más parecida a los tejidos que los halos líquidos. El agar y la agarosa han demostrado ser sustancias muy versátiles para preparar halos: son solubles en agua y sencillos de preparar. Estos geles pueden abarcar un rango amplio de T₁ y T₂, incluyendo los de los tejidos humanos. Para crear un halo con un T₂ similar a un tejido humano, es decir, entre 40 y 150 ms, las concentraciones de agar o agarosa deben estar entre un 0,5% y un 4% en peso¹³³.

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

La resonancia magnética de imagen T_2 y T_2^* de los sistemas core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, se realizó en un 9.4 T (BrukerBiospec). El experimento se llevó a cabo cargando diferentes concentraciones de Fe (de 0.0025 a 0.25 mg/mL) sobre un halo de agar.

5.3. ENSAYO *IN VIVO*, MARCAJE CELULAR, CITOTOXICIDAD Y RESPUESTA RMI DEL NANOCOMPOSITE MAGNÉTICO SBA-15@GLICEROL/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ FUNCIONALIZADO CON NH_2 Y CH_3 (MNCN1_{HP}), PARA SU APLICACIÓN EN ISQUEMIA CEREBRAL. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por el Dr. Andrés Alexander Da Silva Candal.

5.3.1. Estudio *in vivo*

Para realizar el estudio de biocompatibilidad *in vivo* para la aplicación del nanocomposite magnético MNCN1_{HP} en el tratamiento de isquemia cerebral; se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de un peso comprendido entre 325-350 gramos. Los animales se anestesiaron con sevoflurano vaporizado en una mezcla de $\text{N}_2:\text{O}_2$ 30 %:70 %, se utilizó un 6 % de anestesia para la inducción y un 3-4 % para el mantenimiento del animal. Los animales fueron monitorizados en todo momento con oxímetros para comprobar que los niveles de oxígeno eran estables durante la cirugía. Se mantuvo la temperatura de los animales estable a 37.0 ± 0.5 °C por medio de sondas rectales acopladas a mantas térmicas. Los animales fueron alimentados con comida y bebida *ad libitum*.

5.3.1.1. Administración en Yugular

Para acceder a la yugular, se hizo una pequeña incisión en la piel, realizándose una única inyección intravenosa de 1 mL de una dispersión del material MNCN1_{HP} en medio salino a una concentración de 0.4 mM de Fe. La inyección se hizo con una aguja de bajo calibre (Single-use hypodermic needle 100 Sterican \varnothing 0.30 x 12 mm, 30 G x 1/2", de Braun). Tras la administración se suturó la zona de la incisión y se desplazó al animal para realizar las imágenes por MRI.

Se adquirieron secuencias T_2 y T_2^* de MRI (9.4 T, BrukerBiospec) de la rata macho, a distintos tiempos:

- ➔ Una vez suturado y colocado en la resonancia (15-20 minutos tras la administración)
- ➔ 24 horas tras la administración.

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

5.3.1.2. Administración Intraarterial

Se llevó a cabo una incisión en el cuello del animal, exponiendo la tráquea y la musculatura del cuello del lado derecho. Cuidadosamente se apartaron los músculos hasta exponer la arteria carótida común derecha. Por medio de una sutura se cortó provisionalmente el flujo de sangre en la arteria carótida común derecha y en la arteria carótida interna derecha, y de manera permanente en la arteria carótida externa derecha (arteria Pterigopalatina derecha). Una vez cortado el flujo sanguíneo se hizo una incisión en la arteria carótida externa y se introdujo una cánula (Portex Fine Bore Polythene Tubing 30 m, 0.58 mm ID, 0.96 m OD, de Smiths) previamente rellena con suero salino heparinizado para evitar las burbujas durante la inyección; fijada la cánula a la carótida externa, se restauró el flujo en la carótida común y en la carótida interna permitiendo el flujo ascendente y el flujo de las nanopartículas hacia la vasculatura cerebral.

Restaurado el flujo se inyectaron 350 μ l del material mesoporoso magnético (MNCN1_{HP}) de concentración 0.4 mM de Fe, en un plazo de 10 minutos (35 μ L/min). Tras la administración se extrae la cánula de la arteria carótida externa y se cierra de forma permanente anudando una sutura el extremo seccionado. Se sutura la incisión del cuello del animal y se desplaza a la resonancia.

Se adquirieron secuencias T₂ y T₂* de MRI (9.4 T, BrukerBiospec) de la rata macho, a distintos tiempos:

- ➔ Una vez suturado y colocado en la resonancia (15-20 minutos tras la administración)
- ➔ 24 horas tras la administración

5.3.1.3. Administración intraparenquimal

Para la inyección intraparenquimal, se fijó al animal en un aparato esterotáxico, posteriormente se realizó una incisión en la línea media de la piel del cráneo aproximadamente de 1 cm, hasta exponer el hueso. Utilizando el punto craneométrico Bregma como coordenadas de referencia, se realizó una craneotomía en la zona superficial correspondiente al territorio del estriado y ganglios basales del hemisferio derecho hasta alcanzar la superficie cerebral. Se introdujo cuidadosamente una aguja Hamilton (SYR 705 N, 50 μ l, de Hamilton) acoplada al aparato esterotáxico y a un microinyector automático en el parénquima hasta alcanzar la profundidad de la zona de estriado y ganglios basales, una vez alcanzada, se inyectó la cantidad de 10 μ L de la dispersión del NC (MNCN1_{HP}, 0.4 mM_{Fe}) a una

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

tasa de 1 μL por minuto. Se realizó el mismo procedimiento en el hemisferio izquierdo, pero en este caso se inyectaron 10 μL de suero salino como control. Una vez concluida la administración tanto de salino como de las nanopartículas, se suturó al animal y se tomaron imágenes por MRI tanto de T_2 como de T_2^* (9.4 T, BrukerBiospec).

5.3.2. Estudio *in vitro*, para conocer la efectividad del material en el marcaje celular (x cuadruplicado)

Para los experimentos se utilizaron células endoteliales de la microvasculatura cerebral Bend.3 de la casa comercial ATCC (CRL-2299), así como, medio DMEM 88 % con suero bobino fetal 10 %, Penicilina-estreptomicina 1 %, todos de Gibco Invitrogen, y Anfotericina B de Sigma-Aldrich. Se incubaron las células con el medio y las NPs mesoporosas magnéticas (MNCN1_{HP}) a distintas concentraciones: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Transcurridas 24 h, se realizaron tres lavados a las células con 1 mL de tampón fosfato salino (PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , Gibco Invitrogen) para retirar las NPs que no se hayan adherido a ellas. Después de los lavados, se añadió 1 mL de medio fresco a las células y se incubaron durante la noche (12 h) para permitir la completa internalización de las NPs.

La tinción con azul de Prusia se llevó a cabo para evaluar la presencia de las NPs en el cultivo. Tras las 12 h, las células se incubaron durante 20 minutos con una mezcla de partes iguales de una solución acuosa de HCl al 20 % en peso y una solución acuosa de 10 % en peso de ferrocianuro de potasio trihidratado ($\text{KFe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich). Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS.

5.3.3. Ensayo de citotoxicidad por análisis de Lactato Deshidrogenasa (LDH) (x cuadruplicado)

Se realizó un ensayo de citotoxicidad para evaluar el efecto del nanocomposite MNCN1_{HP} a distintas concentraciones, sobre las células endoteliales. Se utilizó el “LDH Cytotoxicity Assay Kit” de Thermo Scientific. La lactato deshidrogenasa (LDH), es una enzima citoplasmática que tras producirse un daño en la membrana plasmática o la lisis total de las células es liberada al medio de cultivo, esta enzima en contacto con los reactivos del KIT, produce un producto coloreado que permite cuantificarla a 490 nm. La cantidad del producto coloreado es proporcional a la cantidad de LDH liberado.

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

La LDH de las células presente en los cultivos a distintas concentraciones del NC MNCN1_{HP} (ver apartado 5.3.2), se cuantificó tras 36 h (24 h de incubación de las NPs en el cultivo con células + lavados de las células + 12 h de incubación). También se evaluó un grupo control (en ausencia del NC MNCN1_{HP}) y un grupo de muerte, en el cual las células se trataron con un tampón de lisis celular para evaluar el máximo de LDH liberado.

5.3.4. Respuesta RMI el NC MNCN1_{HP}

La resonancia magnética de imagen T₂ y T₂* del NC MNCN1_{HP}, se realizó sobre halos de agar en un 9.4 T (BrukerBiospec) a las siguientes concentraciones (mM) de Fe: 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 y 0.005.

5.4. HIPERTERMIA DE LOS NANOCOMPOSITES (SBA-15/Fe₃O₄)

Los mecanismos físicos capaces de generar calentamiento al emplear campos electromagnéticos alternos y NPMs, pueden ser clasificados en tres tipos, según el caso de estudio; dichos mecanismos son: generación de corrientes Foucault, éste se da cuando las partículas insertadas en el sistema son de material conductor y de tamaño grande que permite establecer un camino de conducción, (micrómetros), por lo que es despreciable a niveles nanométricos. El segundo es cuando hay pérdidas en el ciclo de histéresis, en éste las NPMs tienen características ferromagnéticas, y por lo tanto multidominios magnéticos. El tercer mecanismo, con mayor relevancia cuando se usan partículas en estado SPM, es el conocido como pérdidas por relajación; y a su vez se subdivide en dos fenómenos físicos distintos conocidos como relajación de Brown (τ_B) y de Néel (τ_N). El primero se da cuando la partícula magnética experimenta una rotación física sobre el fluido en el cual se encuentra inmersa; el segundo se define como la rotación del momento magnético atómico de cada partícula. τ_B y τ_N se expresan de la siguiente manera^{75, 105}.

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}; \quad \tau_N = \frac{\exp\left(\frac{K_{an} V}{k_B T}\right)}{\sqrt{\frac{K_{an} V}{k_B T}}}$$

Donde η es el coeficiente de viscosidad del fluido, k_B la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/K), V_H el volumen hidrodinámico de la partícula que se expresa como $V_H = [\pi(D + 2\delta)^3/6]$, δ el grosor del revestimiento de la NP, V el volumen magnético del material ($V = D^3/6$) para partículas con diámetro D , T

5. METODOLOGÍA. APLICACIONES BIOMÉDICAS

la temperatura (T ambiente = 298 K), K_{an} constante de anisotropía. El tiempo de relajación total se expresa como^{105, 107}:

$$\tau = \tau_N^{-1} + \tau_B^{-1}$$

Al obtener el tiempo de relajación total es posible conocer la energía de disipación en función del campo magnético alterno aplicado, el cual está dado por la ecuación de Rosensweig¹³⁴:

$$P = \Delta U f = \frac{H_0^2 \mu_0^2 V M_s^2}{3k_B T \tau} \frac{(2\pi f \tau)^2}{1 + (2\pi f \tau)^2}$$

Donde H_0 y f es la amplitud y la frecuencia del campo magnético alterno aplicado, respectivamente; χ_0 es la susceptibilidad magnética inicial y μ_0 la permeabilidad en el espacio libre.

De estos parámetros físicos depende la respuesta de los sistemas de NPMs en diferentes medios. Por ello el estudio de su influencia en los diferentes materiales utilizados permite diseñar aplicaciones con una respuesta controlada^{75, 107}.

La ecuación de Rosensweig calcula la potencia disipada en función de los parámetros de la muestra. Por su parte la tasa de absorción o calentamiento específica (SAR, por sus siglas en inglés), es una medida de la potencia máxima con que un campo electromagnético de radiofrecuencia es absorbido por el tejido vivo. El SAR se define como la potencia absorbida por la masa de los tejidos, se calcula en función de P y sus unidades son Wattios/gramo, como se muestra a continuación:

$$SAR = \frac{P \cdot V_1}{m_1} = \frac{P}{\rho} = \frac{(m \cdot C + m_1 \cdot C_1) \cdot \Delta T}{m_1 \cdot \Delta t}$$

Para el cálculo de los valores de SAR de los distintos NC magnéticos, no fue necesario calcular P de la ec. de Rosensweig, sino se aplicó el último término de la ecuación del SAR, a los datos de calentamiento obtenidos a partir del equipo, dado que este calentamiento respecto al tiempo, es una medida experimental y directa de la muestra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo, se discute la caracterización fisicoquímica y estructural tanto de las matrices mesoporosas de sílice sintetizadas a baja temperatura, como de los nanocomposites magnéticos obtenidos a partir de cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice tipo SBA-15 y nanopartículas de magnetita sintetizadas por distintos métodos. Finalmente se estudian las características de los nanocomposites magnéticos funcionalizados con diversos grupos amino provenientes de las matrices mesoporosas ordenadas SBA-15@glicerol.

6.1. CARACTERIZACIÓN POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X

6.1.1. Difracción de rayos X a bajo ángulo

En la Tabla 6.1, se muestran los resultados obtenidos de los difractogramas de las matrices mesoporosas tipo SBA-15 sintetizadas a baja temperatura que presentan un sistema poroso ordenado total o parcial.

Tabla 6.1. Parámetros estructurales de las matrices mesoporosas tipo SBA-15 sintetizadas a baja temperatura.

Muestra	2θ (°)	d_{100} (nm)	a_0 (nm)
SBA-15	0.800	11.034	12.741
SBA-S1	1.020	8.654	9.993
SBA-S2	0.975	9.053	10.454
SBA-N1	0.769	11.479	13.255
SBA-N2	0.778	11.346	13.101
SBA-15Na	0.860	10.264	11.852

Los difractogramas a ángulo bajo del SBA-15 y de las muestras de SBA-15 funcionalizadas (con y sin NaCl) se muestran en las figuras 6.1 (a) y 6.1 (b). Para el material SBA-15 se observa la presencia de las tres reflexiones características de estos sistemas (100), (110) y (200) asociadas a una estructura altamente ordenada que posee una simetría hexagonal bidimensional plana ($P6mm$)^{128, 135}.

Para las cerámicas SBA-S1 y SBA-S2 funcionalizadas con tetrasulfuro se observa un pico de difracción bien definido para la reflexión (100), sin embargo, la ausencia de los picos (110) y (200) corresponde con una

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

pérdida parcial de la disposición hexagonal. Una mayor presencia de grupos tetrasulfuro en la muestra SBA-S3 coincide con el colapso del sistema poroso.

En contraste, las muestras funcionalizadas SBA-N1 y SBA-N2 mostraron una enorme pérdida en el orden estructural, aunque la presencia de un pequeño pico asociado a la reflexión (100) demuestra la existencia de estructuras con porosidad ordenada. El material SBA-N3 que presenta el mayor porcentaje de funcionalización con el grupo etilendiamino mostró una estructura con porosidad desordenada^{136, 137, 138}. Para las muestras sintetizadas con NaCl, es claro que sólo el material SBA-15Na presenta una ligera porosidad ordenada, para el resto de las cerámicas la porosidad es completamente desordenada.

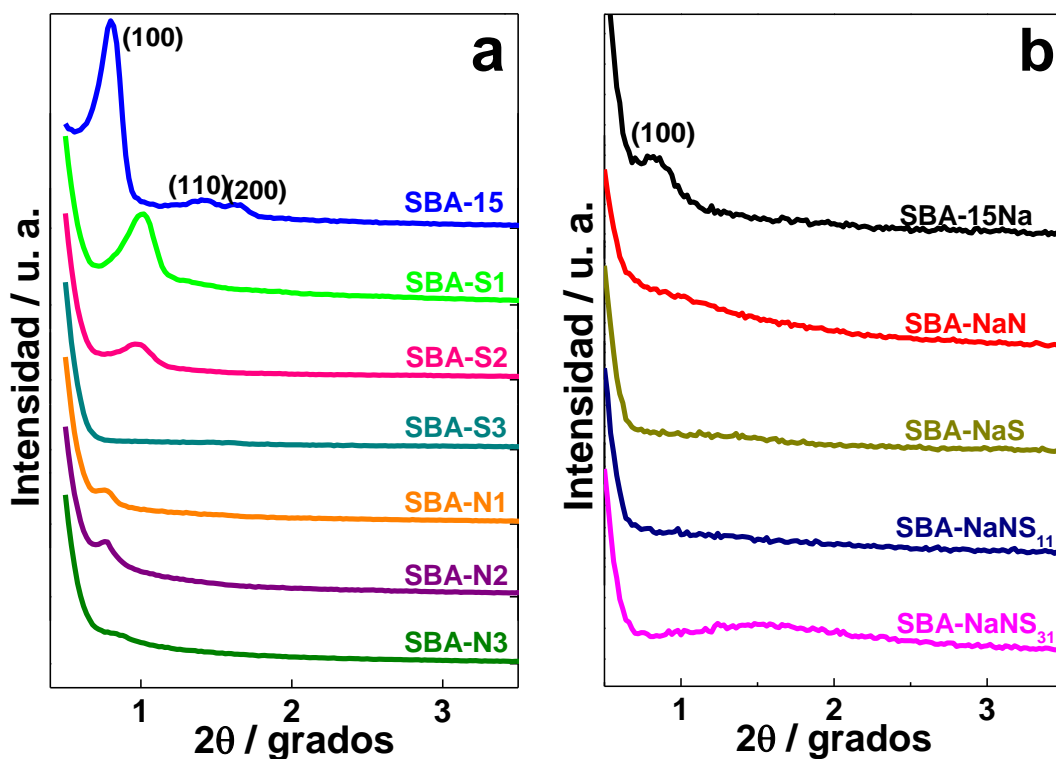


Figura 6.1. Diagramas de DRX a ángulo bajo de las muestras (a) SBA-15 y SBA-15 funcionalizadas, (b) SBA-15/NaCl y SBA-15/NaCl funcionalizadas.

En la tabla 6.2 se resume toda la información obtenida del análisis de los difractogramas de los nanocomposites magnéticos sintetizados a partir de las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice S15_H, S15_{HP}, S15G_H y S15G_{HP}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 6.2. Parámetros estructurales de las matrices mesoporosas tipo SBA-15 y de los NC magnéticos SBA-15/Fe₃O₄.

Muestra	2θ (°)	d ₁₀ (nm)	a ₀ (nm)	Muestra	2θ (°)	d ₁₀ (nm)	a ₀ (nm)
S15 _H	0.82	10.765	12.430	NCPEI _H	0.811	10.884	12.568
S15 _{HP}	0.82	10.765	12.430	NCPAA _{HP}	0.82	10.765	12.430
LMNC _H	0.84	10.508	12.134	NCHPAA _{HP}	0.799	11.048	12.757
HMNC _H	0.855	10.324	11.921	NCPEI _{HP}	0.821	10.752	12.415
MANC _H	0.83	10.635	12.280	S15G _H	0.899	9.818	11.337
CSNC _H	0.841	10.496	12.120	S15G _{HP}	0.839	10.521	12.149
LMNC _{HP}	0.84	10.508	12.134	MNCN1 _H	0.9	9.81	11.328
HMNC _{HP}	0.84	10.508	12.134	MNCN2 _H	0.9	9.81	11.328
MANC _{HP}	0.831	10.622	12.265	MNCN3 _H	0.918	9.616	11.104
CSNC _{HP}	0.831	10.622	12.265	MNCN1 _{HP}	0.84	10.508	12.134
NCPAA _H	0.82	10.765	12.430	MNCN2 _{HP}	0.841	10.496	12.120
NCHPAA _H	0.798	11.062	12.773	MNCN3 _{HP}	0.839	10.521	12.149

Se observa claramente en los patrones de difracción de ángulo bajo mostrados en la figuras 6.2 (a), (b) y (c); y 6.4 (a) y (b), la presencia de los máximos de difracción característicos de una simetría $P6mm$ ^{111, 112, 139}, correspondientes a las reflexiones (100), (110) y (200) que indican orden de largo alcance y una estructura con disposición hexagonal 2D, aún después del anclaje covalente de las nanopartículas magnéticas en sus diferentes arreglos, así como de aquellos nanocomposites que adicionalmente poseen un alto porcentaje de funcionalización con diversos grupos amino.

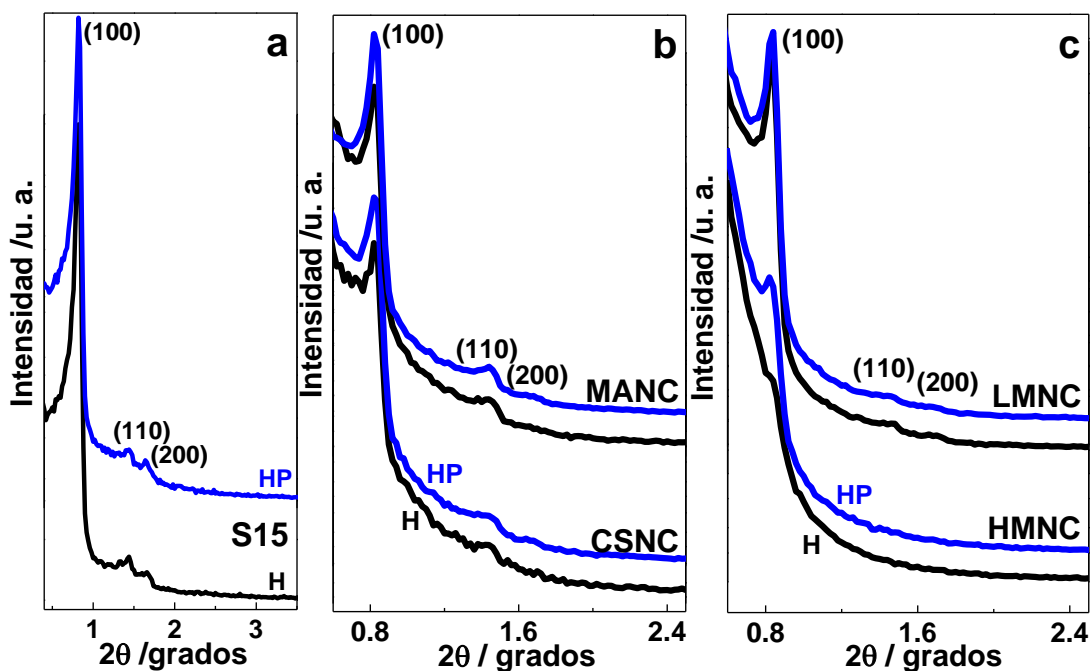


Figura 6.2. Diagramas de DRX a ángulo bajo de las muestras (a) SBA-15/HCl y SBA-15/H₃PO₄, (b) SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ y (c) SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el caso de los nanocomposites SBA-15/Fe₃O₄ funcionalizados con PEI o PAA, figura 6.3 (a) y (b), respectivamente, no se observan claramente las reflexiones (110) y (200)¹⁴⁰, debido a que en el proceso de obtención de las nanopartículas, gran parte de la síntesis se lleva a cabo en el interior del sistema poroso de las cerámicas, el resto de las NPs queda formando cúmulos, que se alojan aleatoriamente en la parte externa quedando anclados o no a la superficie del SBA-15, lo que implica cierto grado de desorden.

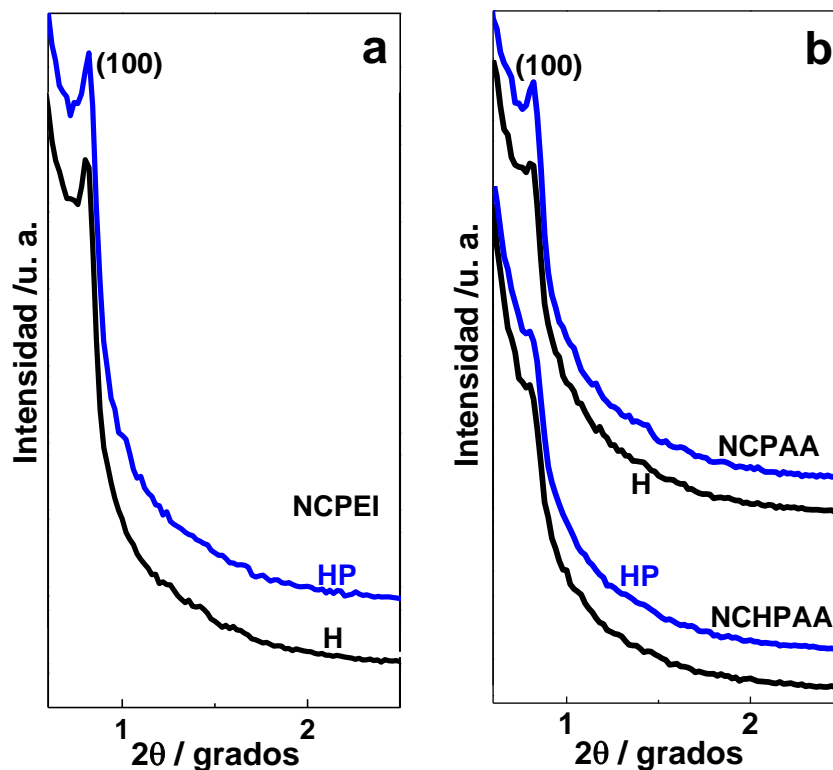


Figura 6.3. Diagramas de DRX a ángulo bajo de las muestras (a) SBA-15/Fe₃O₄@PEI y (b) SBA-15/Fe₃O₄@PAA

Es importante mencionar que la matriz mesoporosa ordenada de sílice S15G_{HP} sintetizada con una mezcla de HCl/H₃PO₄ y glicerol, figura 6.4 (a), presenta picos más anchos indicando la presencia de una estructura del orden de los nanómetros mucho más pequeña que el resto de las cerámicas mesoporosas estudiadas, además es claro que los nanocomposites elaborados a partir de este material muestran el mismo comportamiento que la matriz predecesora. Por lo que, en general los nanocomposites magnéticos conservan gran parte de las propiedades de sus cerámicas precursoras.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

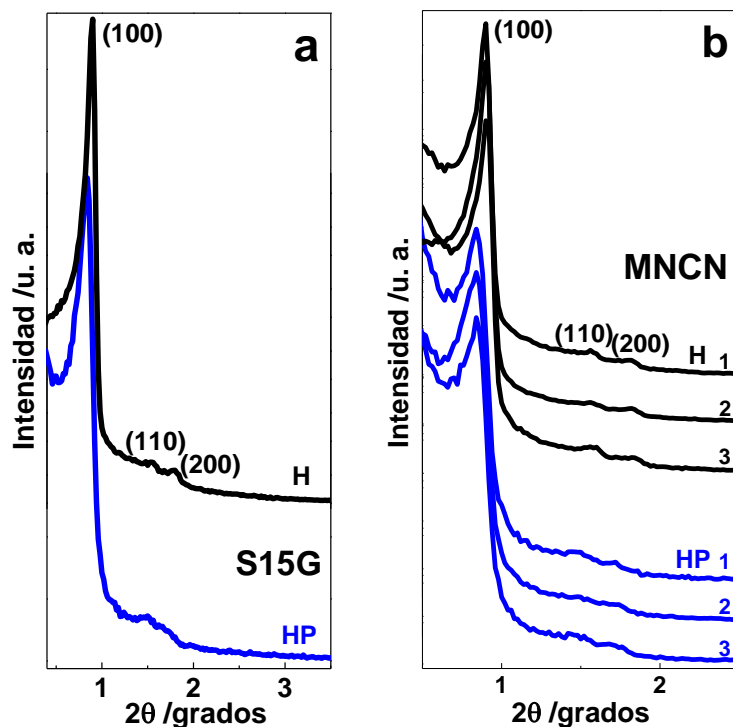


Figura 6.4. Diagramas de DRX a ángulo bajo de las muestras (a) SBA-15/HCl y SBA-15/H₃PO₄ con glicerol y (b) S15G/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizadas con diferentes grupos amino.

6.1.2. Difracción de rayos X por el método de polvos

En la tabla 6.3 se resume toda la información obtenida a partir del análisis de los difractogramas de polvos los nanocomposites magnéticos, se observa que los parámetros de red obtenidos experimentalmente son similares al parámetro de red reportado de la magnetita de 8.396 Å.

Tabla 6.3. Parámetros estructurales de los NC magnéticos SBA-15/Fe₃O₄

Muestra	2θ (°)	d ₃₁₁ (Å)	a ₀ (Å)	Muestra	2θ (°)	d ₃₁₁ (Å)	a ₀ (Å)
LMNC _H	35.682	2.516	8.346	NCPEI _H	35.627	2.518	8.350
HMNC _H	35.682	2.516	8.346	NCPAA _{HP}	35.627	2.518	8.350
MANC _H	35.568	2.524	8.371	NCHPAA _{HP}	35.559	2.5248	8.374
CSNC _H	35.568	2.524	8.371	NCPEI _{HP}	35.559	2.5248	8.374
LMNC _{HP}	35.682	2.516	8.346	MNCN1 _H	35.675	2.517	8.347
HMNC _{HP}	35.599	2.522	8.364	MNCN2 _H	35.675	2.517	8.347
MANC _{HP}	35.568	2.524	8.371	MNCN3 _H	35.675	2.517	8.347
CSNC _{HP}	35.568	2.524	8.371	MNCN1 _{HP}	35.675	2.517	8.347
NCPAA _H	35.648	2.519	8.353	MNCN2 _{HP}	35.675	2.517	8.347
NCHPAA _H	35.711	2.514	8.339	MNCN3 _{HP}	35.675	2.517	8.347

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

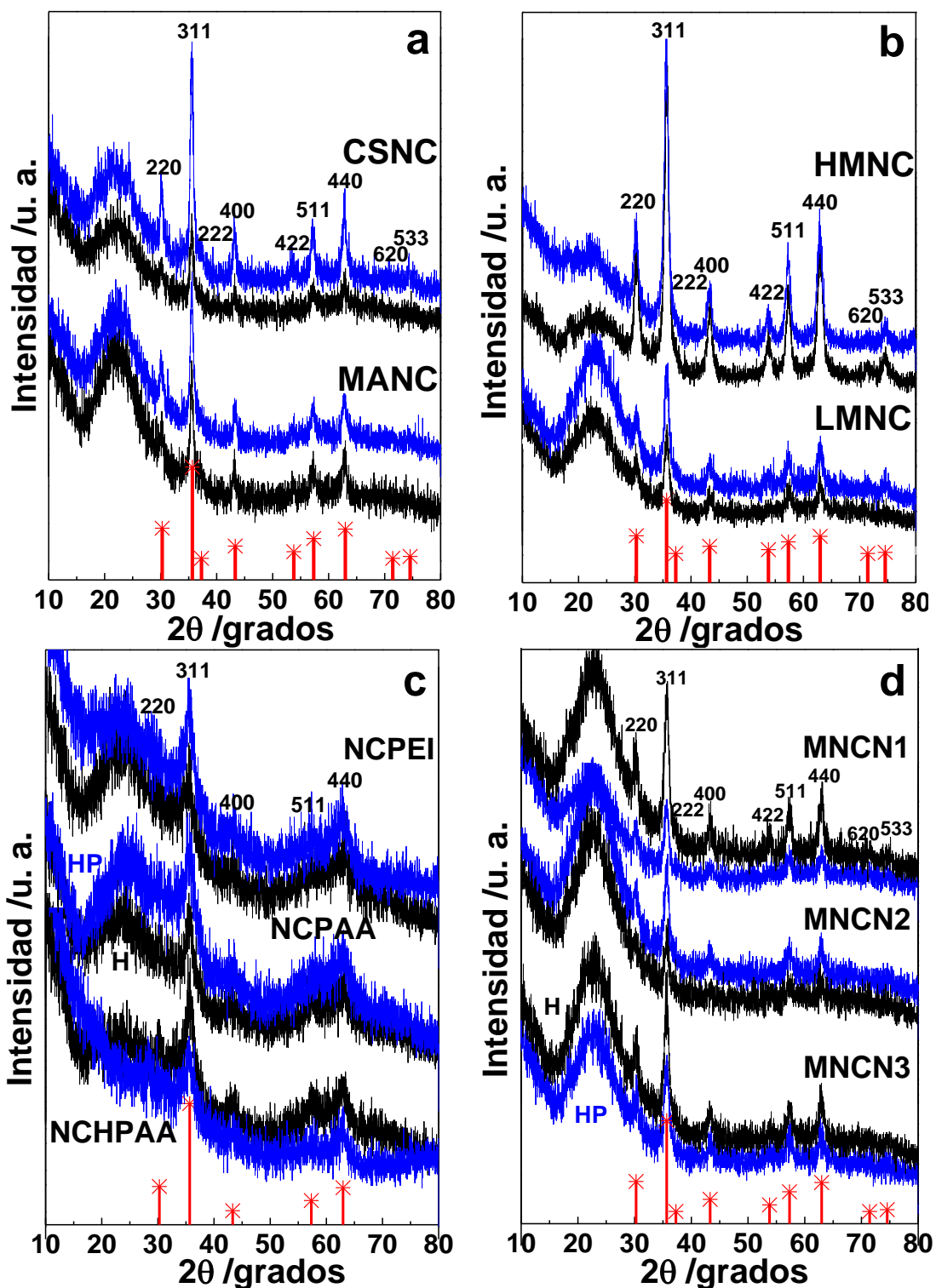


Figura 6.5. Diagramas de DRX de las muestras (a) SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C, (b) SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂, (c) SBA-15/Fe₃O₄@PAA y SBA-15/Fe₃O₄@PEI, y (d) S15G/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizadas con grupos amino diferentes. Las líneas verticales corresponden con las reflexiones principales de la magnetita (Fe₃O₄, base de datos ICDD PDF-2 ficha nº 19-0629).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los patrones de difracción de los nanocomposites magnéticos pulverizados se muestran en las figuras 6.5 (a), (b), (c) y (d), exhibiendo la presencia de una fase cristalina en todos los materiales sintetizados. Para corroborar la existencia de la magnetita cada patrón fue comparado con el difractograma teórico de la magnetita, teniendo en cuenta, la posición y las intensidades relativas de los picos principales de las reflexiones que la conforman. Indicando que la fase magnética principal presente en todas las muestras corresponde a una fase de magnetita^{111, 139, 141} con estructura de espinela inversa (JCPDS 19-0629). Sin embargo es importante mencionar que el comportamiento de los materiales SBA-15/Fe₃O₄@PAA y SBA-15/Fe₃O₄@PEI concuerda con lo descrito anteriormente, al encontrarse la magnetita en el interior de los poros las bandas correspondientes a esta fase cristalina se traslapan con las bandas de la sílice, por lo que las reflexiones no se observan claramente, razón por la cual fue necesario analizar la información de los picos con el software Philips APD - Fit profile para eliminar la contribución de la fase de sílice y aplicar la ecuación de Scherrer a las reflexiones (311), (400), (511) y (440), con el fin de determinar el tamaño de dominio cristalino, dando un resultado de 5-6 nm.

6.2. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Se confirma mediante el análisis IR-TF la presencia de los grupos funcionales que conforman las cerámicas mesoporosas de sílice^{142, 143, 144}. En la figura 6.6 se muestran los espectros de IR antes (A) y después (B) de ser extraído el surfactante con disolventes orgánicos. En ambos casos se observan las bandas características de los compuestos de sílice, en 1037 cm⁻¹ y 790 cm⁻¹, se encuentran las bandas de tensión asimétricas y simétricas de los enlaces Si-O-Si respectivamente; mientras que en 951 cm⁻¹, se halla la banda de deformación correspondiente a los grupos silanol (Si-OH). Una banda ancha entre 3400-3200 cm⁻¹ y un pico en 1630 cm⁻¹, son asignados a la vibración de tensión y flexión de los OH de los grupos silanol. Para la cerámica mesoporosa sin extraer se observa la presencia de bandas debidas a los enlaces C-H pertenecientes a las cadenas hidrocarbonadas del surfactante, entre 2970-2850 cm⁻¹, se encuentran las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica; entretanto en 1450 cm⁻¹ y 1380-1345 cm⁻¹, están las atribuidas a las bandas de deformación asimétrica y simétrica, respectivamente. Finalmente se observa un pico ancho de intensidad media en 1732 cm⁻¹, típico de bandas de tensión de compuestos carbonílicos relacionadas al doble enlace C=O proveniente de la mezcla agua/acetona con la que se filtró inicialmente el material, el cual desaparece tras el proceso de extracción, así mismo se observa en el espectro B que aún se conservan pequeñas bandas debidas a los enlaces C-H, lo que indica una remanencia del surfactante en los canales de poros.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

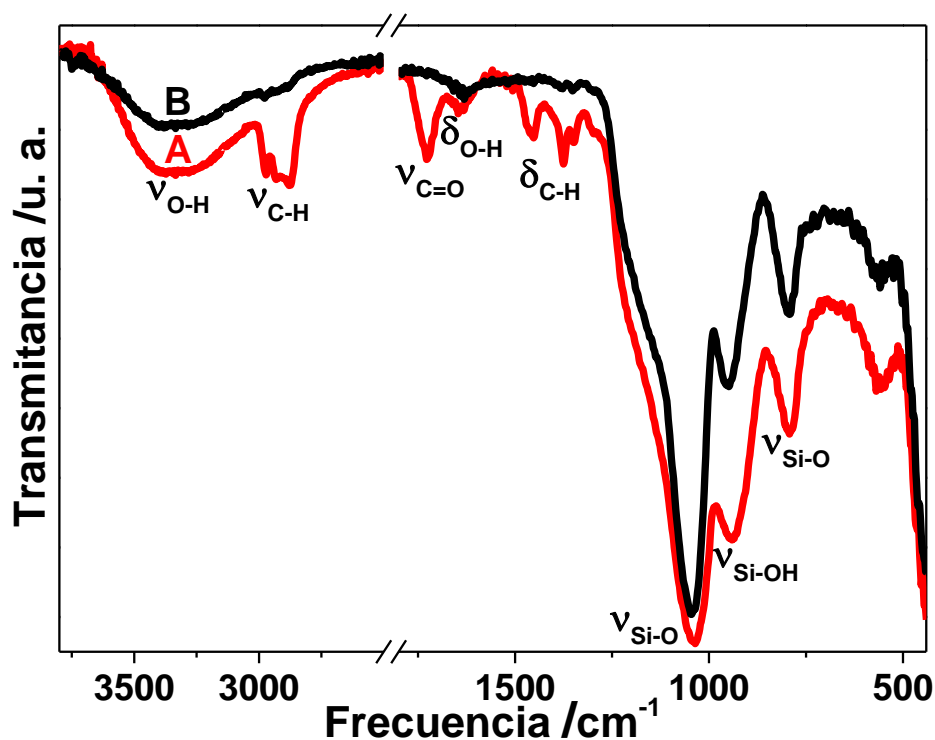


Figura 6.6. Espectro de IR-TF típico de las cerámicas mesoporosas de sílice antes (A) y después (B) de extraerse con disolventes orgánicos

En la figura 6.7 (a) y (b) se presentan los espectros de infrarrojo de los nanocomposites magnéticos SBA-15/ Fe_3O_4 @PEI y SBA-15/ Fe_3O_4 @HPAA, se observan claramente las bandas características de la estructura mesoporosa de sílice, sin embargo la correspondiente al grupo silanol (Si-OH) se encuentra traslapada con la banda en 1040 cm^{-1} , lo que indica que las nanopartículas se anclan mediante los OH expuestos en la superficie. Se detectaron las siguientes absorciones importantes: para NCP EI se observa una banda en 1626 cm^{-1} correspondiente al modo de deformación del enlace N-H de la cadena de polietilenimino. Para el compuesto NCHPAA alrededor de 1430 cm^{-1} se manifestó la deformación del enlace C-H; a 1714 cm^{-1} , se presentó la tensión del enlace C=O; a 2970 cm^{-1} , se apreció una pequeña contribución de la banda correspondiente al estiramiento C-H, aunque se traslapa con la banda de estiramiento del enlace O-H a 3220 cm^{-1} .

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

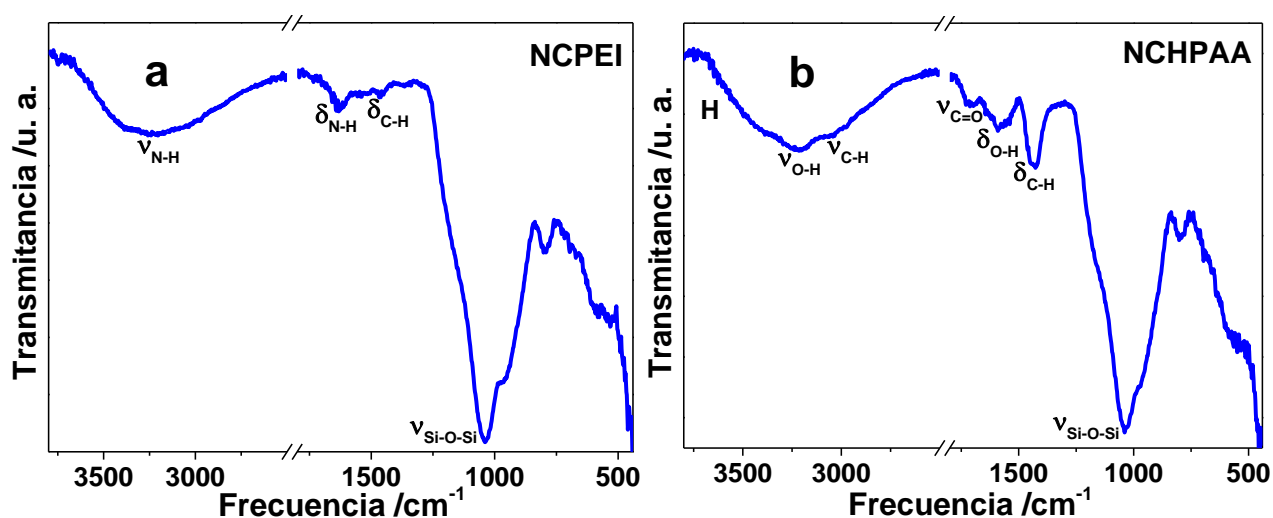


Figura 6.7. Espectro de IR-TF de los nanocomposites magnéticos (a) SBA-15/Fe₃O₄@PEI y (b) SBA-15/Fe₃O₄@HPAA.

En el caso de las síntesis novedosas de los nanocomposites magnéticos, tenemos que para los materiales SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ se aprecia un espectro de IR-TF [figura 6.8 (a)] casi idéntico al mostrado en la figura 6.6 B, sin embargo las nanopartículas de magnetita se han anclado a la superficie externa de la cerámica mediante la interacción de los grupos silanol de la matriz con el TEOS adicionado durante el proceso de síntesis de los nanocomposites, dando como resultado la formación de un recubrimiento nanométrico de sílice amorfo (SiO₂), lo que provoca que la banda de deformación del enlace Si-OH se conserve, sustituyéndose los silanoles de la cerámica por los del recubrimiento de SiO₂, como se observa en la figura 6.9 (a) y (b). Por su parte la figura 6.8 (b) muestra el espectro IR-TF característico de los nanocomposites SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C, donde se observan las bandas analizadas anteriormente, sin embargo, es evidente la desaparición de la banda del Si-OH en 951 cm⁻¹, lo que reafirma que los grupos silanol son los responsables del anclaje covalente de las nanopartículas de magnetita a la superficie, razón por la que queda descartada la eliminación del surfactante por el método de calcinación. Así mismo las bandas localizadas en 1702 cm⁻¹, y 1440-1360 cm⁻¹ son atribuidas a la funcionalización de los agregados con grupos carboxilo como se muestra en la figura 6.10.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

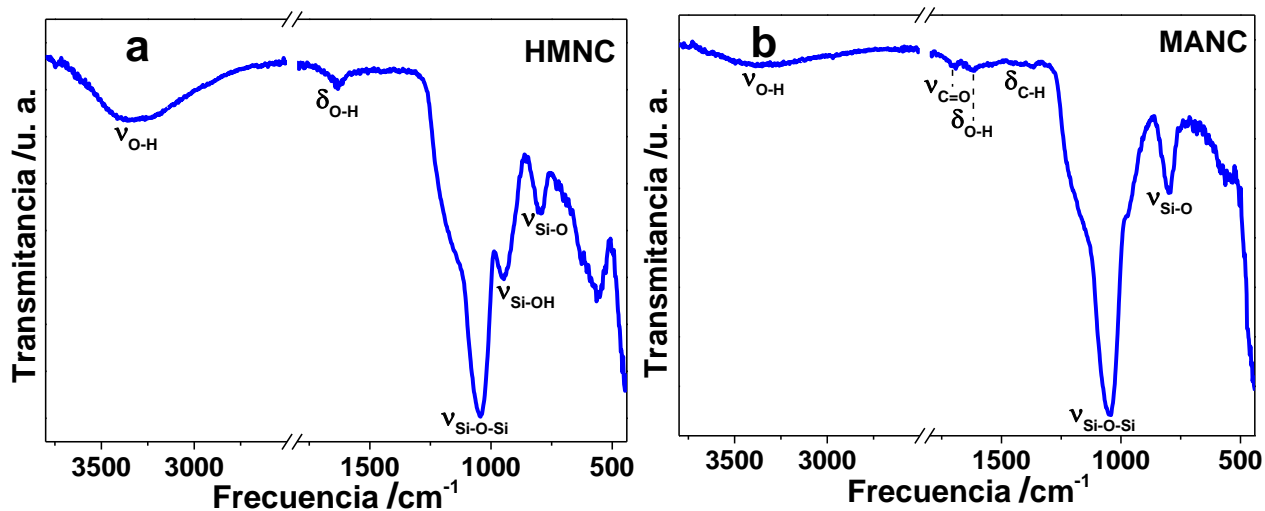


Figura 6.8. Espectro de IR-TF de los nanocomposites magnéticos (a) SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 y (b) SBA-15/ $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n$ @C.

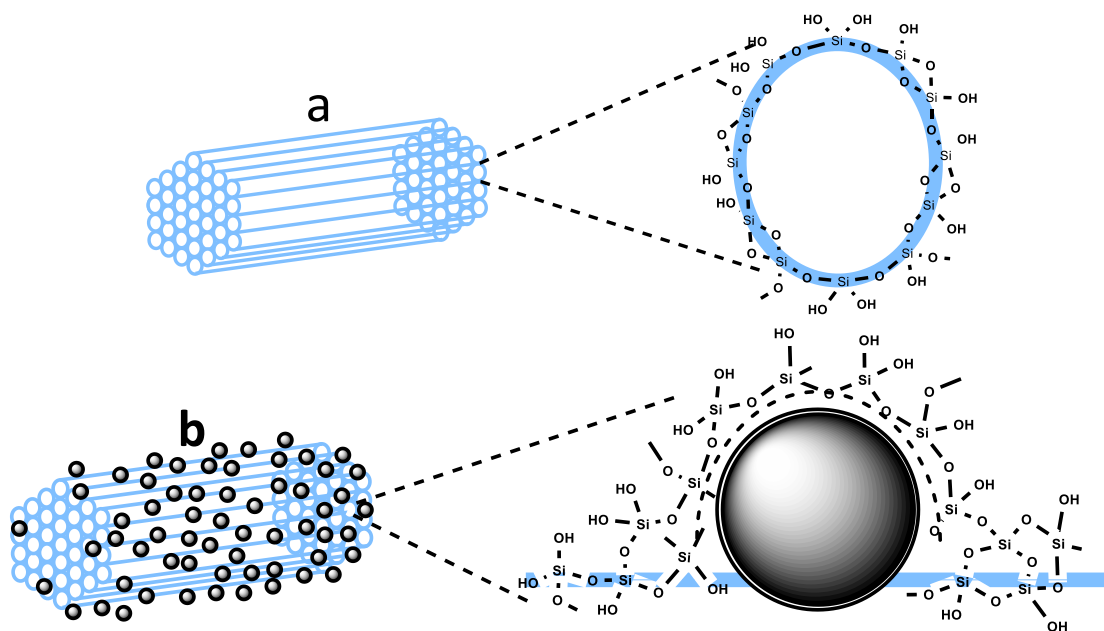


Figura 6.9. Esquemas (a) de las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice, los grupos Si-OH expuestos en la superficie y (b) de los nanocomposites SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 donde los Si-OH de la matriz mesoporosa son reemplazados por los Si-OH del recubrimiento de sílice amorfo.

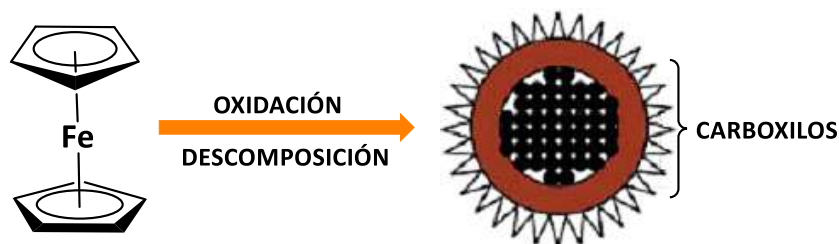


Figura 6.10. Esquema de síntesis de las nanopartículas core-shell (multi- Fe_3O_4 @C funcionalizadas con carboxilos)¹²⁵.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por último los nanocomposites SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizados con diferentes grupos amino se analizaron por IR-TF (figura 6.11), a diferencia de los materiales estudiados en la figura 6.8 (a) que fueron sintetizados por el mismo método, se observa en este caso, un traslape de las bandas en 1037 cm⁻¹ (Si-O-Si) y 951 cm⁻¹ (Si-OH), indicando una gran disminución en la cantidad de silanoles presentes en la muestra, mostrando que los silanoles presentes en la superficie de la cerámicas se han condensado con los grupos trialcoxisilano para recubrir las nanopartículas anclándolas a la superficie y al mismo tiempo funcionalizándolas con diversos grupos amino, como el ejemplo exhibido en la figura 6.12. De esta manera en el espectro aparecen las bandas correspondientes a los grupos amino alrededor de 1630 cm⁻¹, así como las debidas a los enlaces C-H entre 2970-2850 cm⁻¹ y 1450-1385 cm⁻¹ correspondientes a las bandas de tensión y deformación, respectivamente.

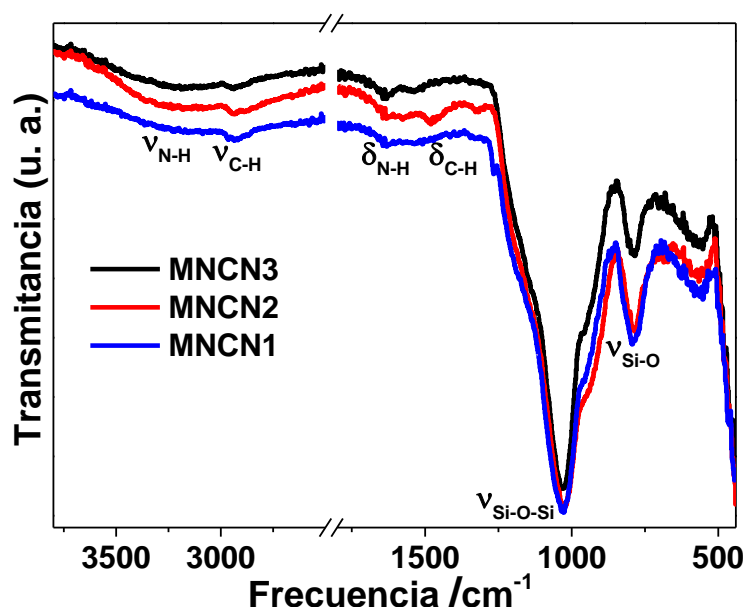


Figura 6.11. Espectro de IR-TF de los nanocomposites magnéticos SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizados con diferentes grupos amino.

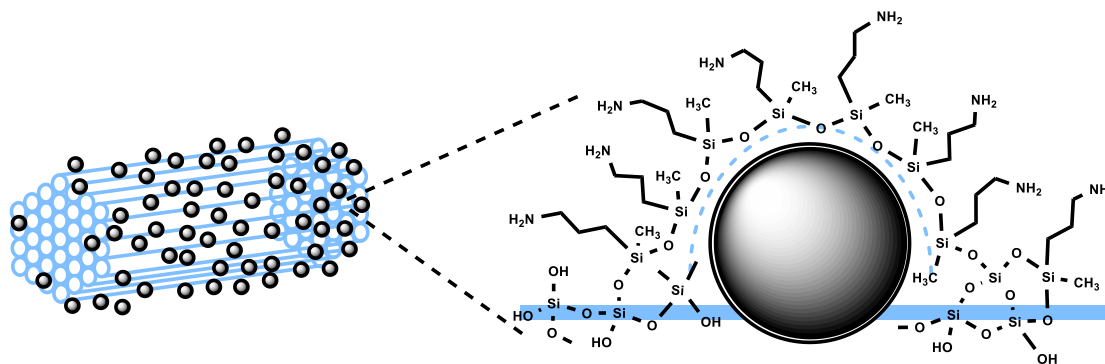


Figura 6.12. Esquema del NC SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizado con N1, donde la mayoría de los Si-OH de la matriz mesoporosa son reemplazados por los grupos NH₂ y CH₃ del recubrimiento de las NPs.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el caso de los materiales modificados orgánicamente con grupos etilendiamino y tetrasulfuro sintetizados a baja temperatura, el porcentaje de funcionalización tan bajo que se obtuvo no permite observar una diferencia considerable con respecto al espectro presentado en la figura 6.6 B que describe a las cerámicas mesoporosas de sílice.

6.3. CARACTERIZACIÓN POR ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL

Los materiales funcionalizados fueron analizados por análisis químico elemental para determinar el contenido de nitrógeno y de azufre presente en los materiales mesoporosos sintetizados a baja temperatura¹³⁵. El cálculo del porcentaje de funcionalización se basa en la suposición de que todo el nitrógeno hallado en los materiales proviene de las moléculas de etilendiamina ancladas covalentemente a la superficie de la sílice mesoporosa; de igual forma todo el azufre se asoció al grupo tetrasulfuro. Para realizar el cálculo fue necesario suponer que todos los grupos etoxi y metoxi presentes en el TEOS, y los trialcóxidosilanos con los grupos orgánicos anteriormente mencionados, se han hidrolizado durante la primera fase del proceso de síntesis (reacciones de hidrólisis), para dar origen a la sílice mesoporosa mediante las subsecuentes reacciones de condensación. De esta forma es posible calcular el porcentaje en peso teórico y experimental de cada material, como se muestra a continuación:

$$masa\ total = \eta_{TEOS} * M_{TEOS\ HIDROLIZADO} + \eta_{FUNCIONALIZANTE} * M_{FUNCIONALIZANTE\ HIDROLIZADO}$$

$$\% \text{ Peso teórico} = \frac{\eta_{FUNCIONALIZANTE} * M_{FUNCIONALIZANTE\ HIDROLIZADO}}{masa\ total} * 100\%$$

$$\% \text{ Peso experimental} = \frac{\% \text{ Peso}_{ELEMENTO} * M_{FUNCIONALIZANTE\ HIDROLIZADO}}{M_{ELEMENTO}}$$

Donde η son los moles de TEOS o funcionalizante correspondientes a la relación molar determinada para cada material; M es la masa molar en g/mol de los alcóxidosilanos hidrolizados; $M_{ELEMENTO}$ es la masa molar del elemento a analizar presente en la molécula del grupo funcional (nitrógeno/azufre) y el $\% \text{ Peso}_{ELEMENTO}$ es el porcentaje en peso del elemento obtenido mediante AQE. Los resultados mostrados en las tablas 6.4. y 6.5 permiten comparar los valores experimentales con los teóricos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 6.4. Comparación de los porcentajes en peso entre los datos teóricos y los resultados obtenidos por análisis químico elemental de los materiales SBA-Nn y SBA-Sn.

Muestra	% Funcionalización	% Peso teórico	% Peso experimental	% Funcionalización
	Teórica	N / S	N / S	Experimental
SBA-N1	2.5	4.6	2.4	1.33
SBA-N2	5.0	9.0	3.2	1.77
SBA-N3	7.5	13.2	6.7	3.79
SBA-S1	2.5	9.0	8.9	2.49
SBA-S2	5.0	16.9	18.5	5.47
SBA-S3	7.5	23.8	26.3	8.28

Tabla 6.5. Comparación de los porcentajes en peso entre los datos teóricos y los resultados obtenidos por análisis químico elemental de los materiales SBA-15/NaCl.

Muestra	% Funcionalización	% Peso teórico	% Peso experimental	% Funcionalización
	Teórica	N / S	N / S	Experimental
SBA-NaN	10.0	17.2	6.0	3.5
SBA-NaS	10.0	30.0	31.6	10.5
SBA-NaNS ₁₁	5.0 / 5.0	7.9 / 16.3	2.1 / 21.5	1.3 / 6.6
SBA-NaNS ₃₁	7.5 / 2.5	12.4 / 8.5	2.8 / 12.4	1.7 / 3.7

En el caso de los materiales modificados con grupos etilendiamino (SBA-Nn), los porcentajes de funcionalización teóricos son mayores a los obtenidos experimentalmente, mientras que para las muestras que contienen las moléculas de tetrasulfuro (SBA-Sn), los porcentajes son ligeramente superiores a los teóricos. Ambos grupos funcionales son bases de Lewis, por lo que poseen un par de electrones libres capaces de poder compartirse para formar un enlace, razón por la cual se protona el grupo etilendiamina en medio ácido, esto significa que la interacción entre el anión cloruro derivado de la disociación total del HCl en agua tiene más afinidad con la amina protonada que con el grupo silanol protonado (precursor de la red de sílice), figura 6.13 (b), lo cual afecta directamente la formación del sistema de canales ordenados, de tal forma que modifica la disposición de los átomos y por lo tanto la morfología final de las partículas de sílice mesoporosa. Uno de los dos mecanismos propuestos y el más aceptado por la comunidad científica para la formación de los materiales de sílice mesoporosa, es el relacionado con las interacciones orgánico-inorgánico de tipo electrostático entre la fase inorgánica de la sílice y la fase micelar en medio acuoso, de esta forma, una correcta elección del surfactante y de las

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

condiciones de síntesis ayudará a controlar las interacciones entre la pared inorgánica y la parte polar o no polar del surfactante para lograr la ionización del precursor inorgánico⁴², figura 6.13 (a).

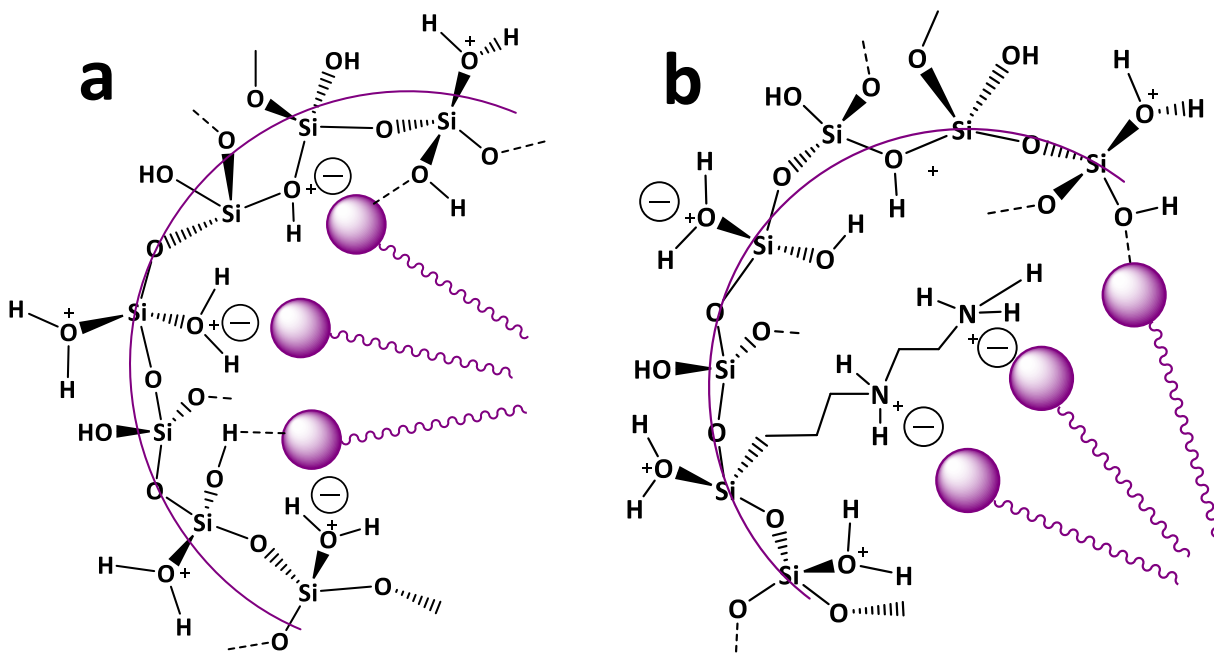


Figura 6.13. Las interacciones entre las especies inorgánicas y el grupo polar del surfactante, (a) el anión cloruro actúa como mediador para catalizar la hidrólisis de los alcoxilanos, (b) en presencia del grupo de etilendiamina, las interacciones entre el agente surfactante y los precursores de sílice son alterados, lo que resulta en un cambio en la disposición hexagonal esperada.

Aunado a eso, el grupo etilendiamina tiene la propiedad de interactuar con el agua desionizada y otras moléculas presentes en la reacción a través de enlaces de hidrógeno, lo que cambia las condiciones del medio, alterando la formación de la fase micelar para dar lugar al arreglo supramicelar cilíndrico, y por lo tanto a la disposición hexagonal final. En el caso del grupo tetrasulfuro, al ser una base más débil que la etilendiamina y no interactuar a través de enlaces de hidrógeno, resulta más favorable la funcionalización de la superficie con este grupo. Sin embargo presenta dos limitaciones: la primera asociada al volumen, y la segunda al anclaje por ambos lados, lo que causa un efecto de impedimento estérico y de rigidez durante la formación de la matriz mesoporosa, como se esquematiza en la figura 6.14. Por encima de un 7 % de funcionalización la estructura se pierde. El mismo caso se presenta para las muestras sintetizadas en presencia de NaCl, se ve un mayor porcentaje de funcionalización experimental que el teórico en los materiales modificados con el grupo tetrasulfuro, caso contrario de los que contienen etilendiamino, lo cual se explicó anteriormente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

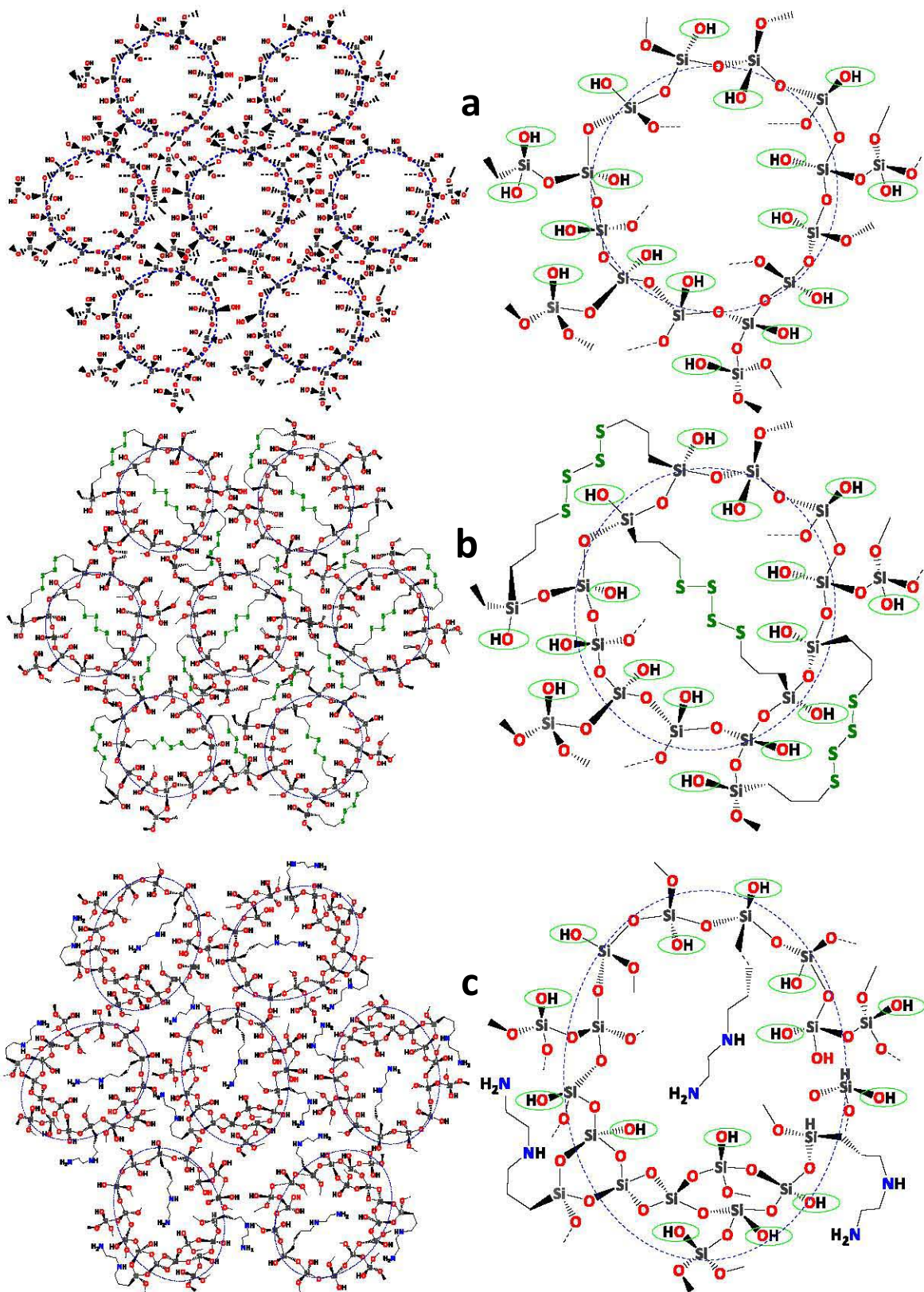


Figura 6.14. Efecto de los grupos funcionales en la formación de la disposición hexagonal de la cerámicas mesoporosas sintetizadas a baja temperatura, (a) silanol, (b) trisulfuro y (c) etilendiamino.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 6.6 se muestra el porcentaje de funcionalización de los nanocomposites magnéticos SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂@NH₂. Se observa que el método desarrollado permitió la exitosa modificación covalente de la superficie con moléculas orgánicas de difícil incorporación como es el caso de las aminas. En comparación con los resultados anteriormente presentados de las matrices mesoporosas funcionalizadas por el método de co-condensación, la funcionalización experimental por esta nueva ruta sintética permite la incorporación de una gran cantidad de moléculas de funcionalizante, obteniéndose un valor experimental superior al teórico. Resultando ser un proceso muy eficiente, reproducible e innovador, ya que en el mismo procedimiento de anclaje de las nanopartículas se funcionaliza la superficie.

Tabla 6.6. Comparación de los porcentajes en peso entre los datos teóricos y los resultados obtenidos por análisis químico elemental de los materiales SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizados.

Muestra	% Funcionalización Teórica	% Peso teórico	% Peso experimental	% Funcionalización Experimental
		N1 / N2 / N3	N1 / N2 / N3	
MNCN1 _H	14.65	18.13	24.95	20.16
MNCN2 _H	16.63	25.79	30.37	19.82
MNCN3 _H	13.26	16.92	25.41	19.92
MNCN1 _{HP}	14.65	18.13	22.48	18.17
MNCN2 _{HP}	16.63	25.79	27.21	17.55
MNCN3 _{HP}	13.26	16.92	25.11	19.70

6.4. CARACTERIZACIÓN POR ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y SU PRIMERA DERIVADA

La caracterización mediante TGA/DTG muestra la cantidad de materia orgánica presente en las matrices de sílice mesoporosas¹⁴⁵ antes y después de la eliminación del surfactante por el método de disolventes orgánicos. En la figuras 6.15 (a), (b), (c) y (d) se observan cuatro termogramas correspondientes a los materiales SBA-15Na, SBA-NaN, SBA-NaS y SBA-NaNS₃₁, respectivamente, que describen el comportamiento de todas las cerámicas mesoporosas sintetizadas a baja temperatura. De las curvas de termogravimetría de polvos, se atribuye una primera pérdida de masa, por debajo de 100-120 °C, a humedad absorbida por el material y/o a la mezcla de disolventes orgánicos ocluida en los poros de todas las matrices extraídas. Analizando los picos obtenidos de la primer derivada de la curva termogravimétrica (DTG) del material SBA-15Na (caso similar para el SBA-15 sin NaCl), figura 6.15 (a), se obtiene el rango de temperaturas en las cuales se inicia y finaliza la eliminación del surfactante antes (**A**) y después (**B**) del proceso de extracción, comenzando en 230 °C (T_i) para A y 280 °C (T_i) para B y concluyendo ambos en 650

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

°C (T_f). Para la cerámica SBA-NaN (describe el comportamiento de las cerámicas funcionalizadas con moléculas etilendiamino), se observa claramente un pico entre 140-335 °C que demuestra la pérdida de los grupos amino anclados covalentemente a la superficie de las cerámicas, la descomposición del surfactante en estos casos inicia en 335 °C (T_i) y termina en 700 °C(T_f); mientras que para el material SBA-NaS (describe las matrices funcionalizadas con grupos tetrasulfuro) el pico asignado a la pérdida del grupo tetrasulfuro se traslapa parcialmente con el pico asociado al surfactante, ya que ocurre a una mayor temperatura que la del grupo etilendiamino, por lo que no se puede saber exactamente el rango de temperaturas entre las que ocurre un proceso de descomposición y otro; sin embargo, se puede suponer que se origina alrededor de 270-290 °C (T_i). Asociado únicamente a SBA-NaS, se encuentra entre 650-970 °C un pico debido al residuo de NaCl, que fue eliminado durante el proceso de extracción. Finalmente para SBA-NaN_{S31} (describe a ambos materiales bifuncionalizados), figura 6.15 (d), se observan con mayor claridad dos picos atribuidos: el primero a los grupos funcionales (entre 140-290 °C) y el segundo a la pérdida de surfactante (entre 290-700 °C, T_i - T_f).

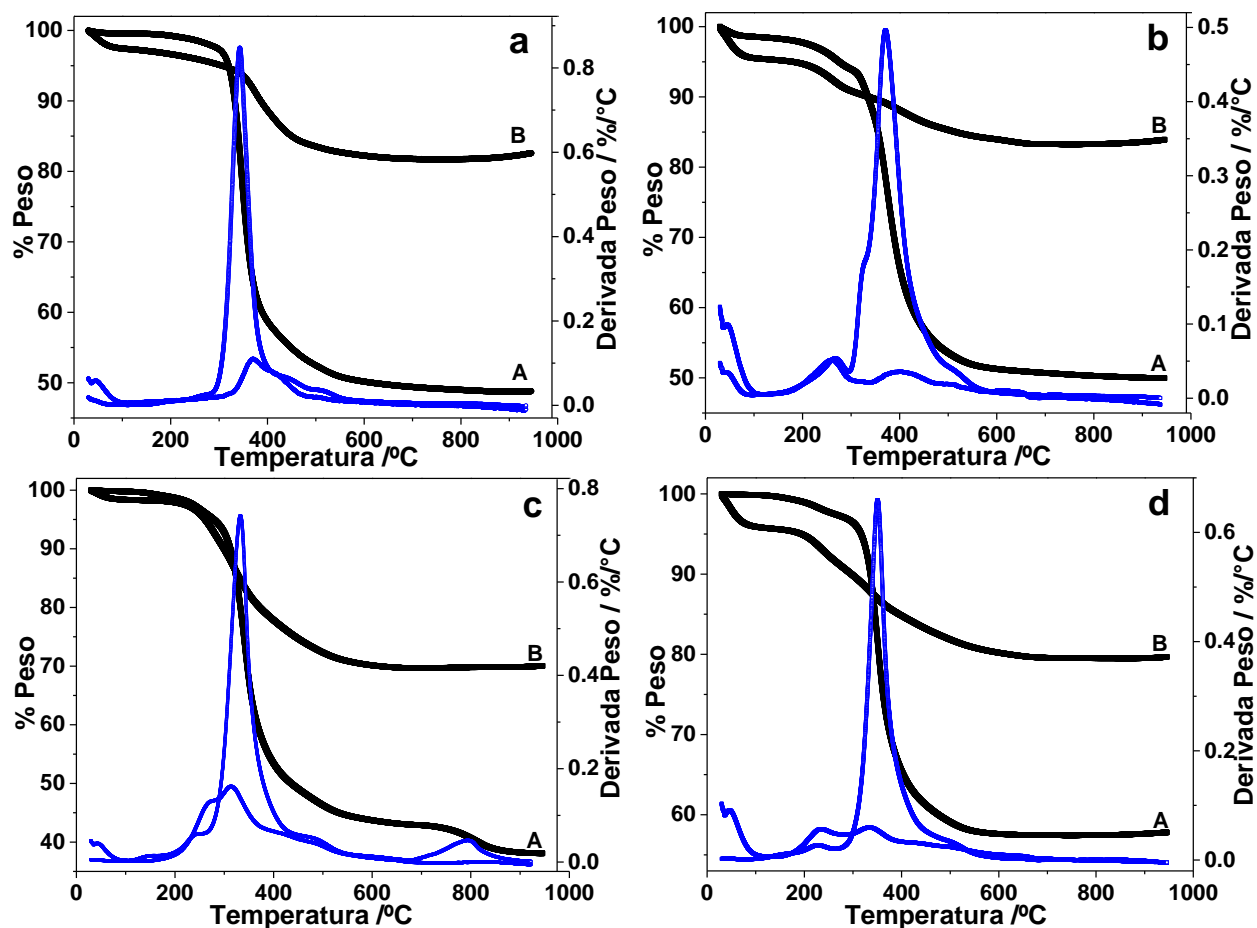


Figura 6.15. Termogramas (TGA/DTG) de los materiales mesoporosos SBA-15/NaCl sintetizados a baja temperatura; (a) SBA-15Na; (b) SBA-NaN; (c) SBA-NaS y (d) SBA-NaN_{S31}

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En las tablas 6.7 y 6.8 se resume la información recabada de las curvas de termogravimetría de las cerámicas mesoporosas sintetizadas a baja temperatura.

Tabla 6.7. Porcentaje en peso de surfactante eliminado por extracción a partir de las cerámicas mesoporosas SBA-15 sintetizadas a baja temperatura

Muestra		% Peso (T _i)	% Peso (T _f)	% Peso (T _i -T _f)	% Surfactante eliminado
A	SBA-15	98.99	60.94	38.05	69.07
B	SBA-15	87.26	75.49	11.77	
A	SBA-N1	95.34	37.83	57.51	90.31
B	SBA-N1	84.50	78.93	5.57	
A	SBA-N2	94.22	38.77	55.45	91.38
B	SBA-N2	83.56	78.78	4.78	
A	SBA-N3	93.99	46.07	47.92	85.10
B	SBA-N3	84.22	77.08	7.14	
A	SBA-S1	94.88	43.67	51.21	67.35
B	SBA-S1	87.61	70.89	16.72	
A	SBA-S2	96.58	38.79	57.79	62.00
B	SBA-S2	85.38	63.42	21.96	
A	SBA-S3	95.80	41.03	54.77	55.05
B	SBA-S3	90.71	66.09	24.62	

Tabla 6.8. Porcentaje en peso de surfactante eliminado por extracción a partir de las cerámicas mesoporosas SBA-15 sintetizadas a baja temperatura modificadas con NaCl.

Muestra		% Peso T _i	% Peso T _f	% Peso (T _i -T _f)	% Surfactante eliminado
A	SBA-15Na	99.01	49.54	49.47	72.79
B	SBA-15Na	95.48	82.02	13.46	
A	SBA-NaN	94.06	50.64	43.42	84.71
B	SBA-NaN	89.96	83.32	6.64	
A	SBA-NaS	96.4	42.85	53.55	59.72
B	SBA-NaS	91.33	69.76	21.57	
A	SBA-NaNS ₁₁	96.04	46.18	49.86	69.82
B	SBA-NaNS ₁₁	90.72	75.67	15.05	
A	SBA-NaNS ₃₁	97.47	57.43	40.04	73.55
B	SBA-NaNS ₃₁	90.21	79.62	10.59	

El comportamiento entre cada cerámica mesoporosa con el mismo grupo funcional es similar; en promedio para los materiales modificados con etilendiamino (N), el porcentaje en peso de surfactante restante es alrededor de 12 %, mientras que para los materiales sintetizados con el grupo tetrasulfuro (S) es de aproximadamente 39 %, sin embargo para este último hay que considerar el porcentaje en peso experimental del grupo tetrasulfuro, obtenido por análisis químico elemental (AQE), ya que en el

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

termograma las curvas se traslapan y no se puede hacer una correcta interpretación entre los porcentajes del surfactante y el funcionalizante que se pierden en el proceso. Considerando lo anteriormente mencionado el porcentaje en peso de surfactante residual en presencia de los grupos tetrasulfuro es alrededor de 19 %, mientras que para los materiales bifuncionalizados es en promedio de 15 %. La presencia de las moléculas etilendiamino en la superficie de las matrices, hace más hidrófilo el medio, permitiendo una mayor penetración del disolvente al interior de los poros, mientras que en el caso de las cerámicas con tetrasulfuro, al ser un grupo muy voluminoso ocasiona que una gran parte del surfactante y de los precursores no interaccionen directamente durante el proceso de co-condensación de los trialcoxisilanos, lo que implica una mayor cantidad de surfactante presente en el medio que no reaccionó.

En la figura 6.16 se muestra el termograma de la cerámica mesoporosa ordenada S15_H, ejemplificando al resto de las matrices precursoras de los nanocomposites magnéticos (S15_{HP}, S15G_H y S15G_{HP}). Se observa al igual que en los casos anteriores una pérdida por debajo de 100 °C relacionada con la humedad y el disolvente atrapado en los poros de los materiales, así mismo la descomposición del surfactante ocurre a distintas temperaturas, entre el material antes (A) y después (B) de ser sometido al proceso de extracción, llevándose a cabo entre 110-400 °C y 170-400 °C (T_i-T_f), respectivamente. Así mismo en la tabla 6.9 se muestra el porcentaje en peso de surfactante eliminado a partir de las cerámicas precursoras.

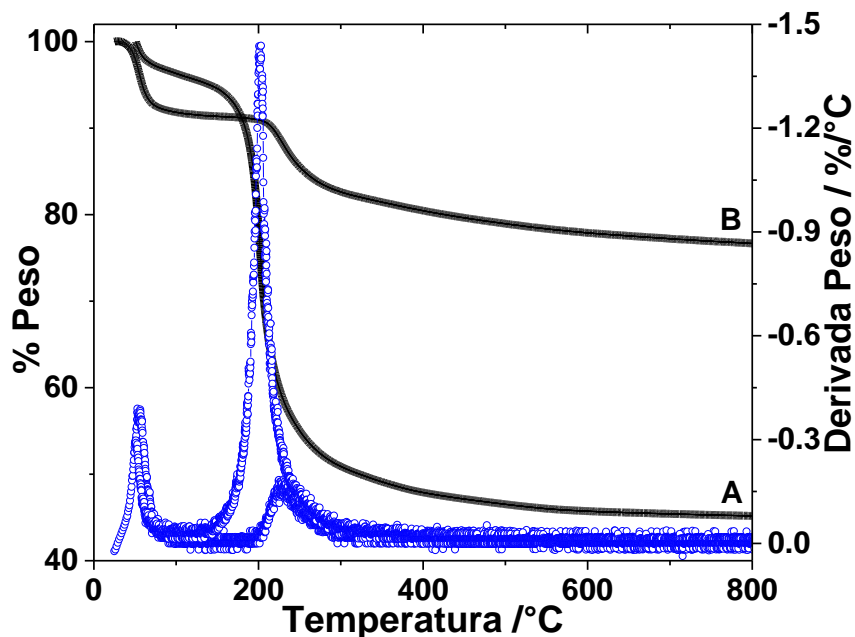


Figura 6.16. Termograma (TGA/DTG) de la cerámica mesoporosa ordenada S15_H

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 6.9. Porcentaje en peso de surfactante eliminado por extracción a partir de las cerámicas mesoporosas SBA-15 precursoras de los NCs magnéticos.

Muestra		% Peso T_i	% Peso T_f	% Peso ($T_i - T_f$)	% Surfactante eliminado
A	S15 _H	95.92	46.40	49.52	75.53
B	S15 _H	91.22	79.10	12.12	
A	S15 _{HP}	91.97	46.16	45.81	71.05
B	S15 _{HP}	92.67	79.41	13.26	
A	S15 _{G_H}	95.84	55.44	40.4	63.99
B	S15 _{G_H}	95.07	80.52	14.55	
A	S15 _{G_{HP}}	95.23	63.64	31.59	65.05
B	S15 _{G_{HP}}	93.97	82.93	11.04	

Tras los lavados con diversas mezclas de disolventes orgánicos se ve una reducción sustancial en el porcentaje de materia orgánica (surfactante) presente en los materiales, confirmando que el proceso de extracción es eficaz. Sin embargo, debido al método elegido, es común observar una remanencia de surfactante embebida en el interior de los poros, en comparación con el proceso de calcinación donde todo el surfactante se elimina. A pesar de eso, este procedimiento desarrollado, resulta ser tan eficiente como otros métodos de disolventes orgánicos ya publicados, con las ventajas de llevarse a cabo a temperatura ambiente, necesitarse menor cantidad de disolvente y realizarse fácilmente^{146, 147}.

6.5. CARACTERIZACIÓN POR POROSIMETRÍA DE ADSORCIÓN DE N₂

La figura 6.17 muestra las isothermas de adsorción de N₂ de tipo IV de los materiales mesoporosos sintetizados a baja temperatura. Según la geometría del poro puede ocurrir que la condensación capilar se produzca a una presión diferente a la que se produce la evaporación del poro, ocasionándose un ciclo de histéresis en la isoterma de adsorción-desorción^{41, 127, 148} como los que se observan en los materiales sintetizados a baja temperatura. Sin embargo, estos ciclos son relativamente diferentes entre las muestras. El material SBA-15 presenta ramas de adsorción y desorción que indican la existencia de mesoporos de geometría cilíndrica con distribuciones de tamaño de poro estrechas atribuido a un ciclo de histéresis tipo H1^{50, 127}, mientras que para la mayoría de las cerámicas (SBA-S1, SBA-S2, SBA-N1, SBA-N2, SBA-N3, SBA-Na, SBA-NaN, SBA-NaN_{S11} Y SBA-NaN_{S31}) los mecanismos de adsorción y desorción representan un arreglo de poros irregulares¹⁴³, asociados al tipo H2¹⁴⁹, con una distribución de tamaño de poro más amplia que la presentada en el H1, algunas veces sin definir. Resultados que concuerdan con el análisis de DRX realizado anteriormente, donde se observó estructuras que van de una pérdida parcial de

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

la disposición hexagonal hasta una porosidad desordenada. Los únicos materiales representados por el tipo H3 es el SBA-S3 y SBA-NaS; este tipo de ciclo, a diferencia de los tipos H1 y H2 no presenta una plataforma límite de adsorción a condiciones de presión relativamente altas cerca de la presión de saturación, obteniéndose una estructura por aglomerados de poros en forma de placas paralelas similar a las arcillas pilareadas¹⁵⁰ con distribución de tamaños de poros en el rango de los microporos.

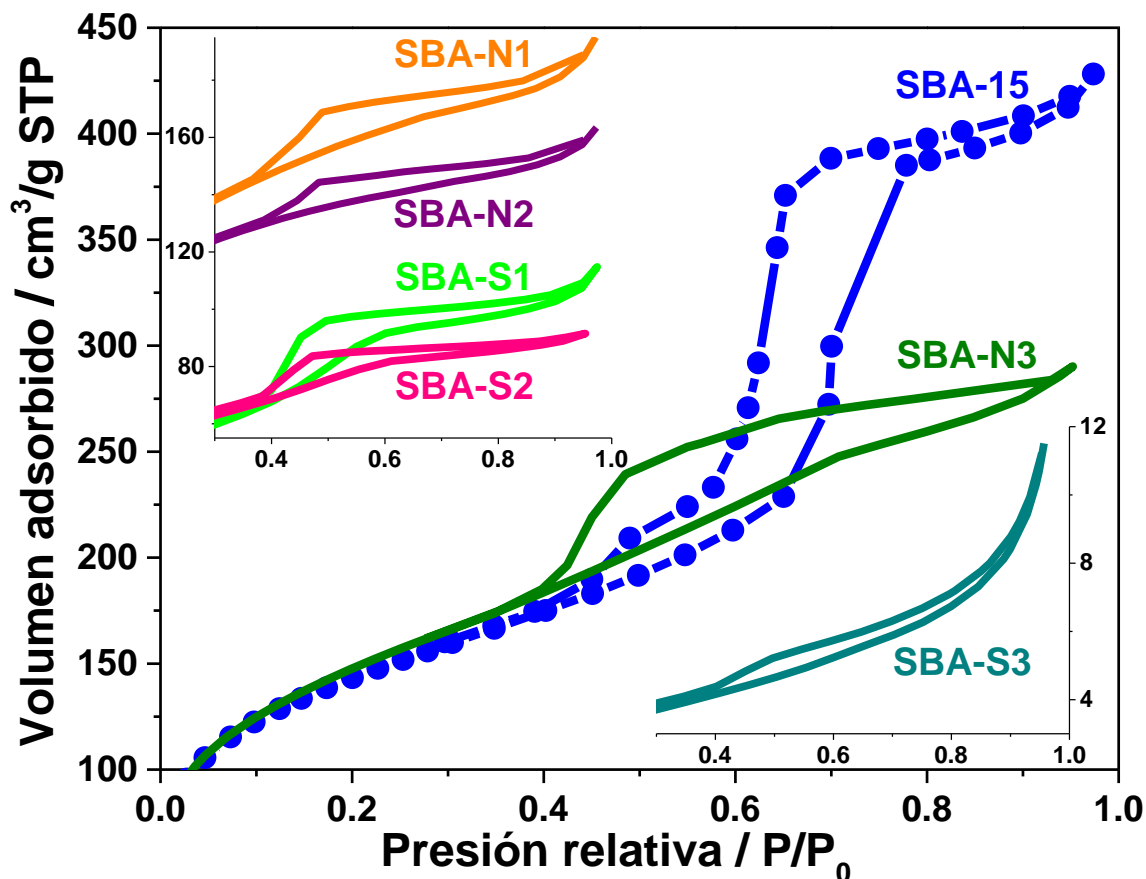


Figura 6.17. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las matrices mesoporosas SBA-15, SBA-S1, SBA-S2, SBA-S3, SBA-N1, SBA-N2 y SBA-N3.

La evaluación de las ramas de adsorción-desorción de las isotermas y los ciclos de histéresis originados a partir de ellas¹³¹, revela información acerca de los materiales mesoporosos tipo SBA-15 como es el diámetro de poro (D_{BJH}), volumen del mesoporo (V_p) y área superficial específica (S_{BET}). Los resultados se muestran en la tabla 6.10. La distribución del diámetro de poro de las matrices mesoporosas SBA-15, SBA-15Na y SBA-S1 se presenta en la figura 6.18.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

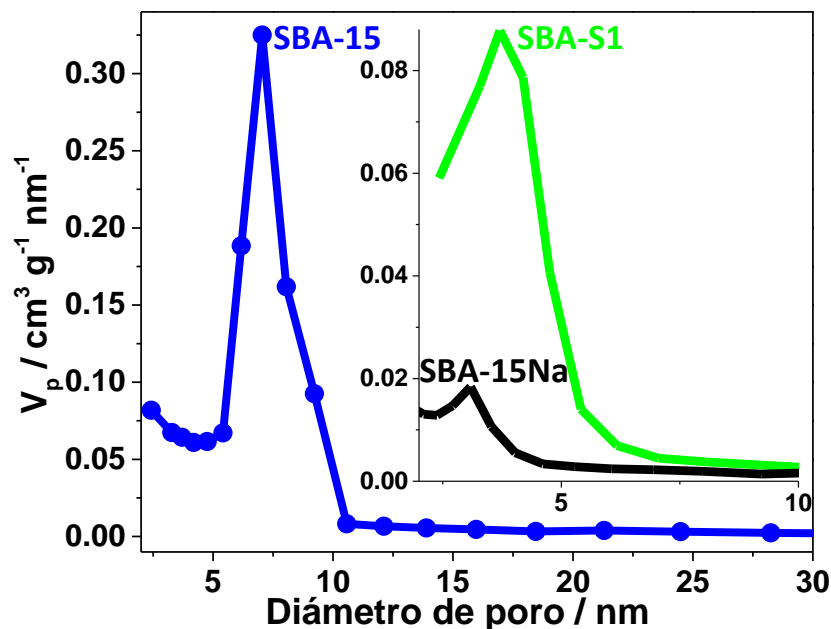


Figura 6.18. Distribución de tamaño de poro de las matrices mesoporosas sintetizadas a baja temperatura SBA-15 y SBA-S1.

Tabla 6.10. Valores texturales de las cerámicas mesoporosas tipo SBA-15 sintetizadas a baja temperatura.

Muestra	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3/g)	D_{BJH} (nm)
SBA-15	426.95	0.6619	7.082
SBA-N1	405.80	0.3015	< 2.5
SBA-S1	183.34	0.1774	3.705
SBA-N2	370.28	0.2527	< 2.5
SBA-S2	195.61	0.1415	< 2.5
SBA-N3	501.31	0.4485	< 2.5
SBA-S3	11.580	0.0178	< 2.5
SBA-15Na	83.26	0.0994	3.094
SBA-NaN	216.13	0.2038	< 2.5
SBA-NaS	12.57	0.0171	< 2.5
SBA-NaNS ₁₁	190.68	0.1553	>2.5
SBA-NaNS ₃₁	250.04	0.1917	>2.5

Cuando el diámetro de poro es más pequeño de 2.0 nm y cuando se tiene un sistema poroso desordenado, el método BJH no suele ser preciso, ya que se aproxima al valor real sólo cuando tiene un arreglo ordenado de mesoporos. La mayoría de los materiales sintetizados al tener poros irregulares de diversas morfologías y tamaños, no poseen una distribución de tamaño de poro. Así mismo las propiedades texturales del SBA-S3 son muy pobres en comparación con las demás cerámicas y similar al de algunas cerámicas como las hidroxiapatitas HA ($<10 \text{ m}^2/\text{g}$)¹⁵¹, demostrando una estructura colapsada, lo cual reafirma lo analizado en DRX.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis de los nanocomposites magnéticos y de sus cerámicas precursoras se discute a continuación. Se infiere a partir de las ramas de adsorción-desorción de las isothermas de la figura 6.19 (a) y (b) correspondiente a las cerámicas mesoporosas S15 y S15G, respectivamente, que poseen una estructura mesoporosa completamente ordenada con una disposición de poros cilíndricos abiertos por ambos extremos y con una distribución de tamaño de poro muy estrecha, describiendo un ciclo de histéresis tipo H1 perteneciente a una isoterma tipo IV. Los procesos de adsorción-desorción paralelos con poca anchura de las cerámicas, indican que el diámetro de poro es grande, ya que cuanto más pequeño sea el radio interno del poro, menor será la presión a la que evaporará el nitrógeno y, por lo tanto, el ciclo de histéresis será más ancho (ensayo de adsorción en sólidos mesoporosos).

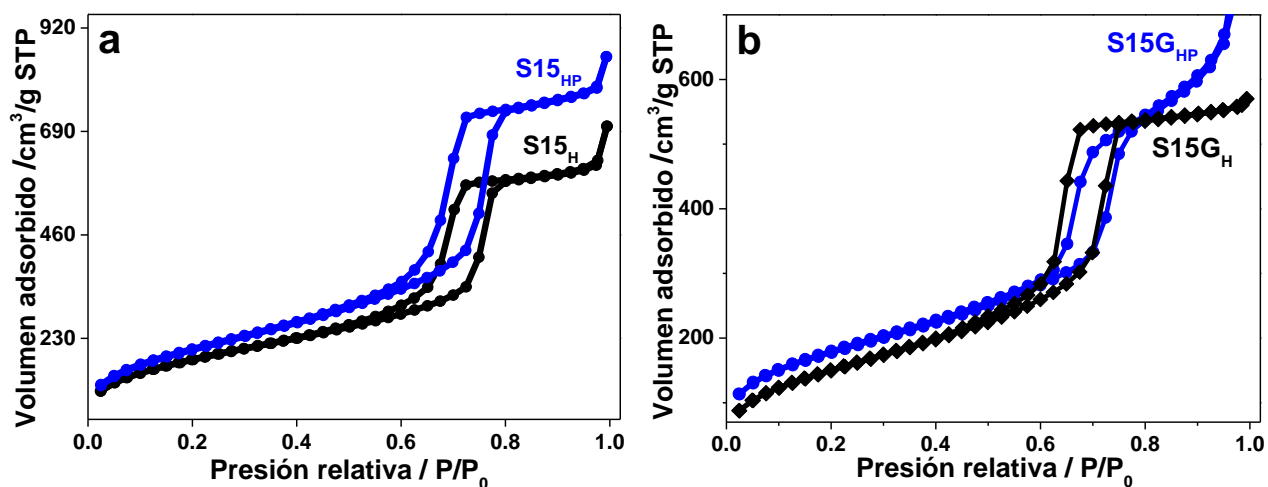


Figura 6.19. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de las cerámicas mesoporosas ordenadas (a) S15 y (b) S15G

En las figuras 6.20 (a), (b), (c) y (d) se muestran las isothermas de los materiales SBA-15/ Fe_3O_4 @PAA (NCPAA), SBA-15/ Fe_3O_4 @PEI (NCPEI), SBA-15/ $(Fe_3O_4)_n$ @C (MANC) y SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 (LMNC), respectivamente. Los nanocomposites magnéticos NCPAA y NCPEI presentan un ciclo de histéresis combinado entre los tipos H1 y H2, mostrando una leve alteración de la estructura porosa ordenada, debida a la presencia de una gran cantidad de nanopartículas de magnetita en la superficie externa de las matrices, así como en el interior de los canales, confirmado anteriormente por DRX. Las isothermas de los materiales LMNC y MANC presentan ramas de adsorción-desorción paralelas, casi verticales y muy cercanas una de otra, lo que indica que el diámetro de poro es mayor con respecto a sus matrices precursoras, y que poseen un ciclo de histéresis tipo H1; sin embargo, las muestras LMNC son las que presentan el ciclo más angosto.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

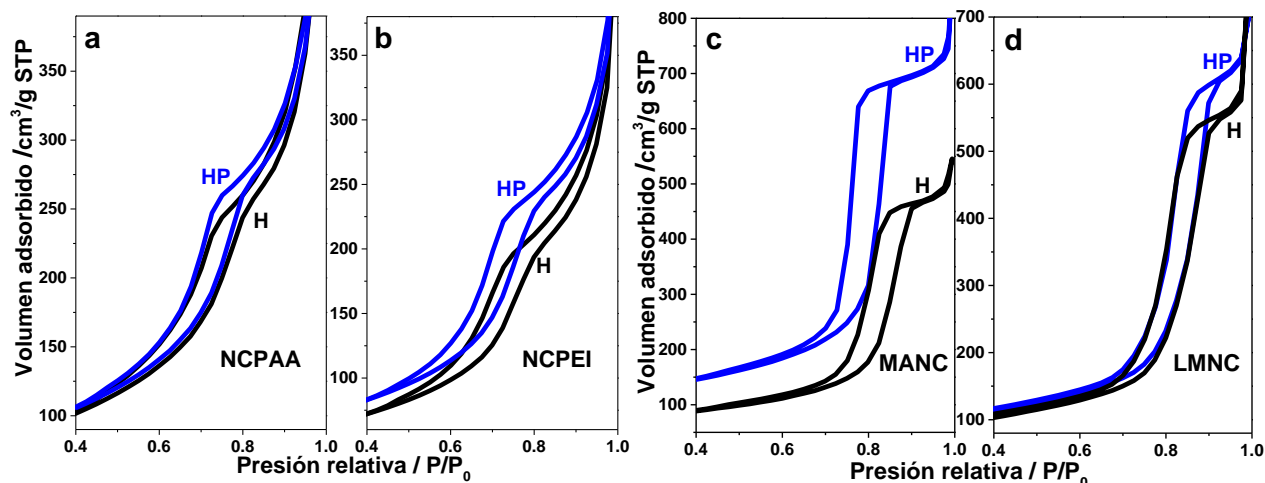


Figura 6.20. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de los nanocomposites magnéticos sintetizados a partir de las cerámicas precursoras S15; **(a)** SBA-15/ Fe_3O_4 @PAA; **(b)** SBA-15/ Fe_3O_4 @PEI; **(c)** SBA-15/ $(Fe_3O_4)_n$ @C y **(d)** SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2

Los materiales SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 funcionalizados con grupos amino presentan isothermas y ciclos de histéresis muy similares a sus cerámicas precursoras. La figura 6.21 (a) corresponde a los nanocomposites funcionalizados con los grupos NH_2 que ejemplifican a todos los materiales funcionalizados.

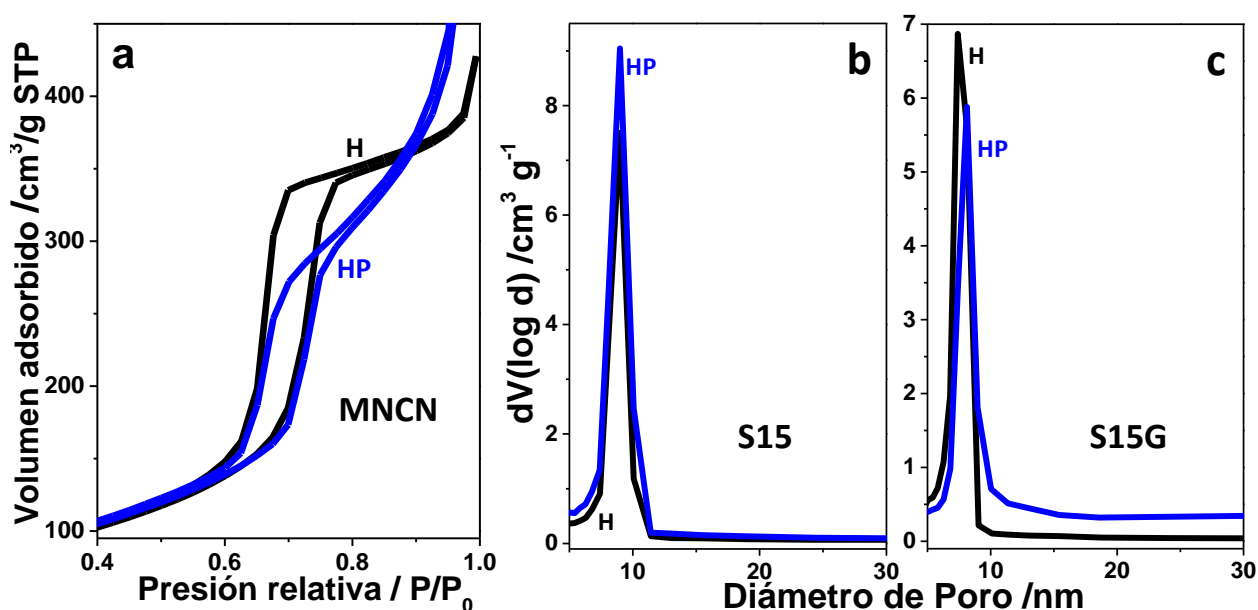


Figura 6.21. **(a)** Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de los NCs SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 @ NH_2 ; **(b)** Tamaño de poro de las cerámicas precursoras S15 y **(c)** Tamaño de poro de las cerámicas precursoras S15G.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En las figuras 6.21 (b) y (c) se ilustran los diámetros de poro de las cerámicas mesoporosas ordenadas SBA-15 (S15) y SBA-15@glicerol (S15G), respectivamente. Se observa en ambos casos distribuciones de tamaño de poro muy estrechas, lo que implica que las estructuras son altamente ordenadas. En las figuras 6.22 (a), (b), (c) y (d) se muestran ejemplos de los diámetros de poro de los materiales SBA-15/Fe₃O₄@PAA (NCPAA), SBA-15/Fe₃O₄@PEI (NCPEI), SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C (MANC) y SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ (LMNC), respectivamente. A comparación con los casos anteriores las distribuciones de poros son más anchas, aún así, continúan siendo estrechas. Sin embargo, cabe resaltar que los métodos de síntesis de los nanocomposites SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ y SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C, provocó que el diámetro de poro resultante fuera entre 1.5 y 2 veces el diámetro de poro de sus cerámicas precursoras, confiriéndoles enormes propiedades como sistemas de liberación controlada, matrices catalíticas, entre otras. Mientras que en el caso de los materiales SBA-15/Fe₃O₄@PAA y SBA-15/Fe₃O₄@PEI mantienen un tamaño de poro aproximado a las muestras S15. En la figura 6.23 (a), (b) y (c) se presentan los diámetros de poro de los nanocomposites funcionalizados con NH₂ y CH₃ (MNCN1), NH₂(CH₂)₂NH₂ (MNCN2) y NH₂ (MNCN3). A pesar de la modificación orgánica de las superficies, que en la mayoría de los casos resulta en una reducción considerable del diámetro de poro, el método innovador desarrollado permite mantener valores de diámetro de poro similares al de sus cerámicas precursoras, sin embargo, los nanocomposites aunque sacrifican área superficial, poseen una mayor reactividad. En el caso particular de la muestra MNCN1_{HP} el volumen de poro es mayor al S15_{HP}.

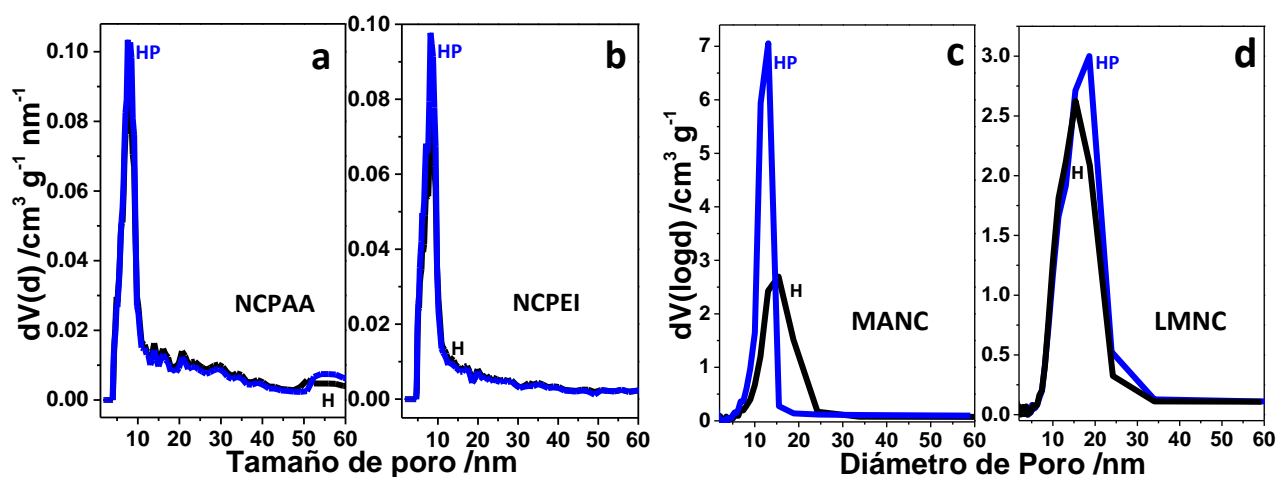


Figura 6.22. Tamaño de poro de los nanocomposites magnéticos sintetizados a partir de las cerámicas precursoras S15; (a) SBA-15/Fe₃O₄@PAA; (b) SBA-15/Fe₃O₄@PEI; (c) SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C y (d) SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

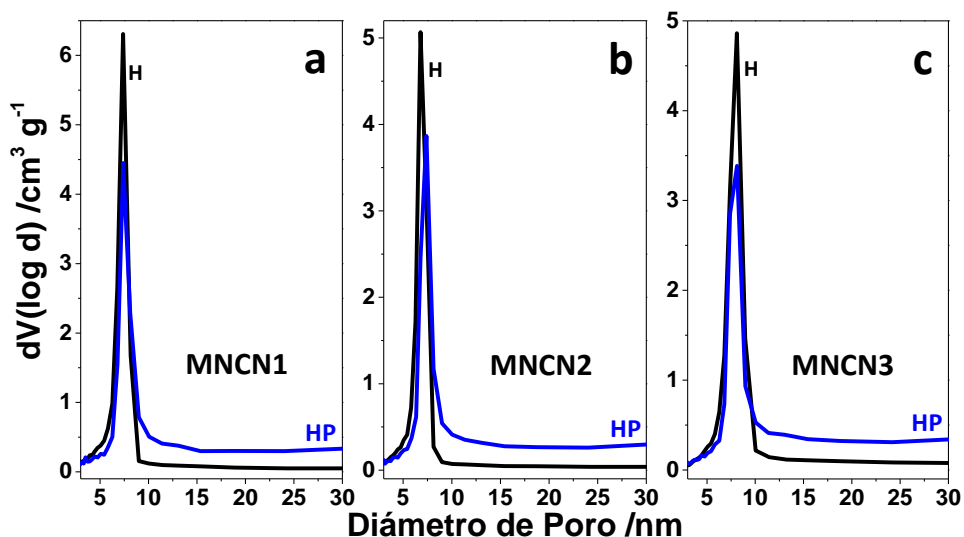


Figura 6.23. Diámetro de poro de los nanocomposites magnéticos sintetizados a partir de las cerámicas precursoras S15G; (a) NH_2 y CH_3 ; (b) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ y (c) NH_2 .

En las tablas 6.11 y 6.12 se resumen las propiedades superficiales de los nanocomposites magnéticos SBA-15/ Fe_3O_4 y SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 @ NH_2 , respectivamente. Donde W_{mag} representa el porcentaje en peso de magnetita (sin recubrir) presente en cada material, calculado a partir de la cantidad (mg) de Fe obtenida mediante FAAS.

Tabla 6.11. Valores texturales de los nanocomposites magnéticos SBA-15/ Fe_3O_4 @PAA, SBA-15/ Fe_3O_4 @PEI, SBA-15/ Fe_3O_4 @C y SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 ; y de sus cerámicas mesoporosas precursoras tipo SBA-15.

Muestra	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3/g)	D_{BJH} (nm)	W_{mag} (%)
S15 _H	639.29	0.954	8.978	0
S15 _{HP}	727.07	1.219	8.986	0
LMNC _H	283.25	0.893	15.394	7.85
HMNC _H	185.55	0.664	18.712	32.06
MANC _H	244.61	0.774	13.036	11.50
CSNC _H	233.57	0.848	15.462	16.03
LMNC _{HP}	315.13	1.098	15.344	7.71
HMNC _{HP}	261.96	0.914	18.534	21.70
MANC _{HP}	405.64	1.127	13.078	10.99
CSNC _{HP}	297.18	1.025	13.066	16.86
			PS_{DFT} (nm)	
NCPAA _H	276.86	0.672	7.588	27.64
NCHPAA _H	220.29	0.652	9.098	32.89
NCPEI _H	196.70	0.504	8.145	25.43
NCPAA _{HP}	288.49	0.980	7.588	29.57
NCHPAA _{HP}	277.91	0.829	7.588	30.68
NCPEI _{HP}	226.23	0.546	8.462	25.84

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 6.12. Valores texturales de los nanocomposites magnéticos funcionalizados SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂; y de sus cerámicas mesoporosas precursoras tipo SBA-15@glicerol.

Muestra	S _{BET} (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)	D _{BJH} (nm)	W _{mag} (%)
S15G _H	542.37	0.884	7.392	0
S15G _{HP}	617.10	1.773	8.117	0
MNCN1 _H	305.01	0.639	7.376	7.01
MNCN2 _H	266.46	0.543	6.787	3.08
MNCN3 _H	282.46	0.663	8.102	7.63
MNCN1 _{HP}	318.97	1.819	7.398	7.60
MNCN2 _{HP}	285.14	1.386	7.391	5.24
MNCN3 _{HP}	289.44	1.515	8.115	7.64

6.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las micrografías de MEB y MET de las matrices mesoporosas de sílice tipo SBA-15 sintetizadas a baja temperatura y funcionalizadas por co-condensación con grupos etilendiamino y tetrasulfuro se muestran a continuación. Por microscopía electrónica de barrido se pudo comparar la morfología entre los distintos materiales, utilizando electrones secundarios. Las figuras 6.24 (SBA-15) y 6.25 (SBA-S1) muestran filamentos largos que representan los capilares con forma hexagonal abierta en ambos extremos, característica de la matriz mesoporosa tipo SBA-15 con un arreglo ordenado de poros. Sin embargo, la configuración del sistema poroso de estos materiales se observó convenientemente utilizando microscopía electrónica de transmisión. Evidentemente, los materiales SBA-15 y SBA-S1 tienen una disposición hexagonal, cuya dirección longitudinal es perpendicular al plano de la imagen^{50, 127, 152}.

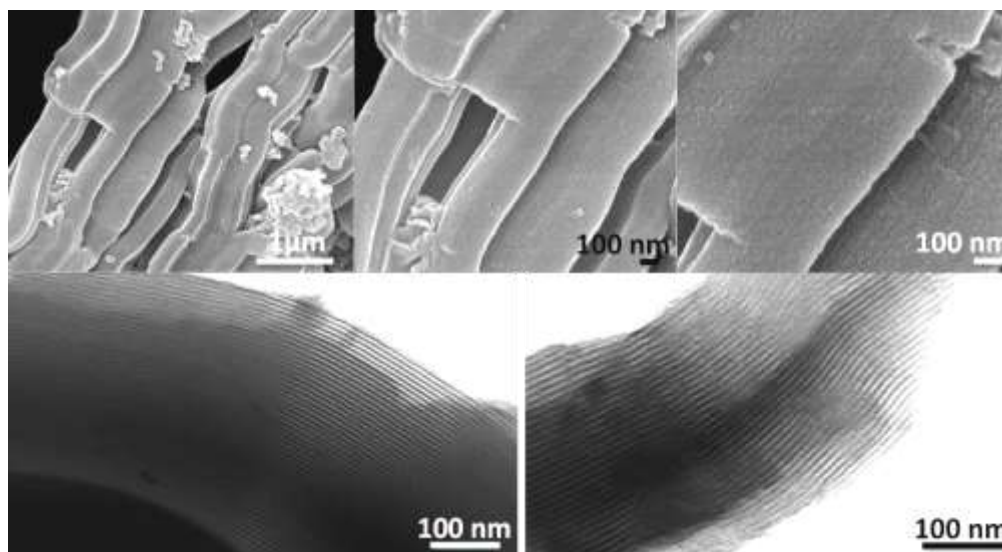


Figura 6.24. Micrografías de MEB y MET del material SBA-15 sintetizado a baja temperatura.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

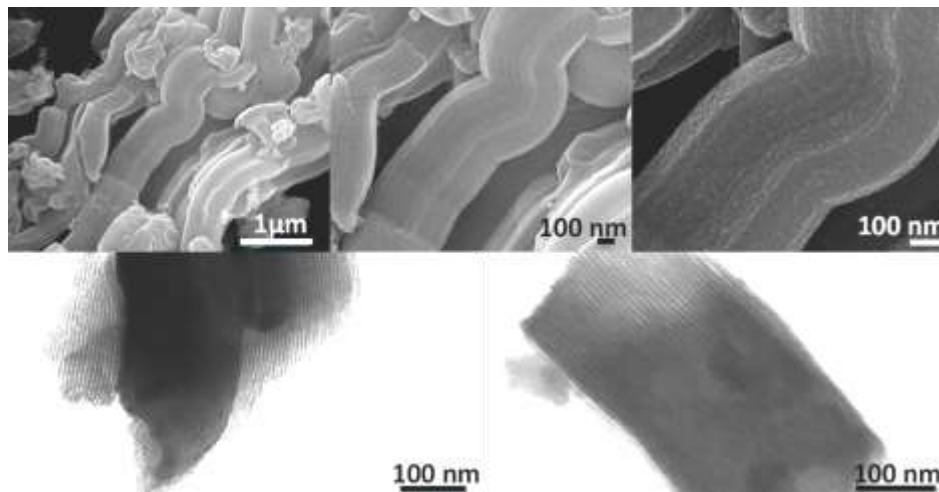


Figura 6.25. Micrografías de MEB y MET del material SBA-S1 sintetizado a baja temperatura.

La modificación orgánica de las superficies con grupos funcionales nucleófilos y en condiciones hidrotermales por debajo de los 100 °C, originó un cambio microestructural en los materiales, cuanto más aumentó el porcentaje de funcionalización, la distorsión en el tamaño, la morfología y la topografía de los materiales se hace evidente, como es el caso de SBA-S2 y SBA-N1, en la figura 6.26 (SBA-S2) se observa la presencia de filamentos con una apariencia de estarse derritiendo, fusionándose uno con otro para formar una placa; mientras tanto en la figura 6.27 (SBA-N1) muestra dos morfologías, una similar a una hoja de papel corrugado y otra en forma de nanotubos. Ambas estructuras poseen un sistema de canales longitudinales en el orden de los mesoporos, sin embargo es más evidente en el material SBA-S2, zonas con una disposición hexagonal ordenada, lo cual coincide con la reflexión (100) observada en DRX que indica una pérdida parcial de orden estructural.

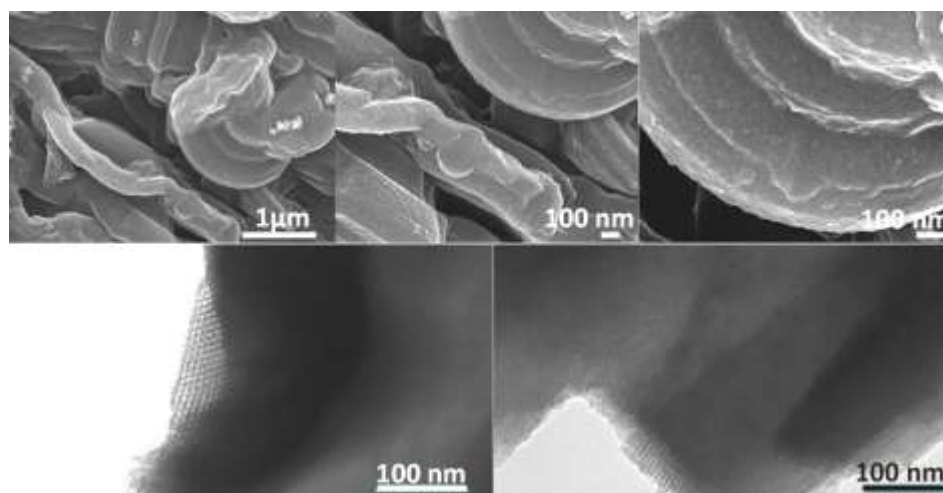


Figura 6.26. Micrografías de MEB y MET del material SBA-S2 sintetizado a baja temperatura.

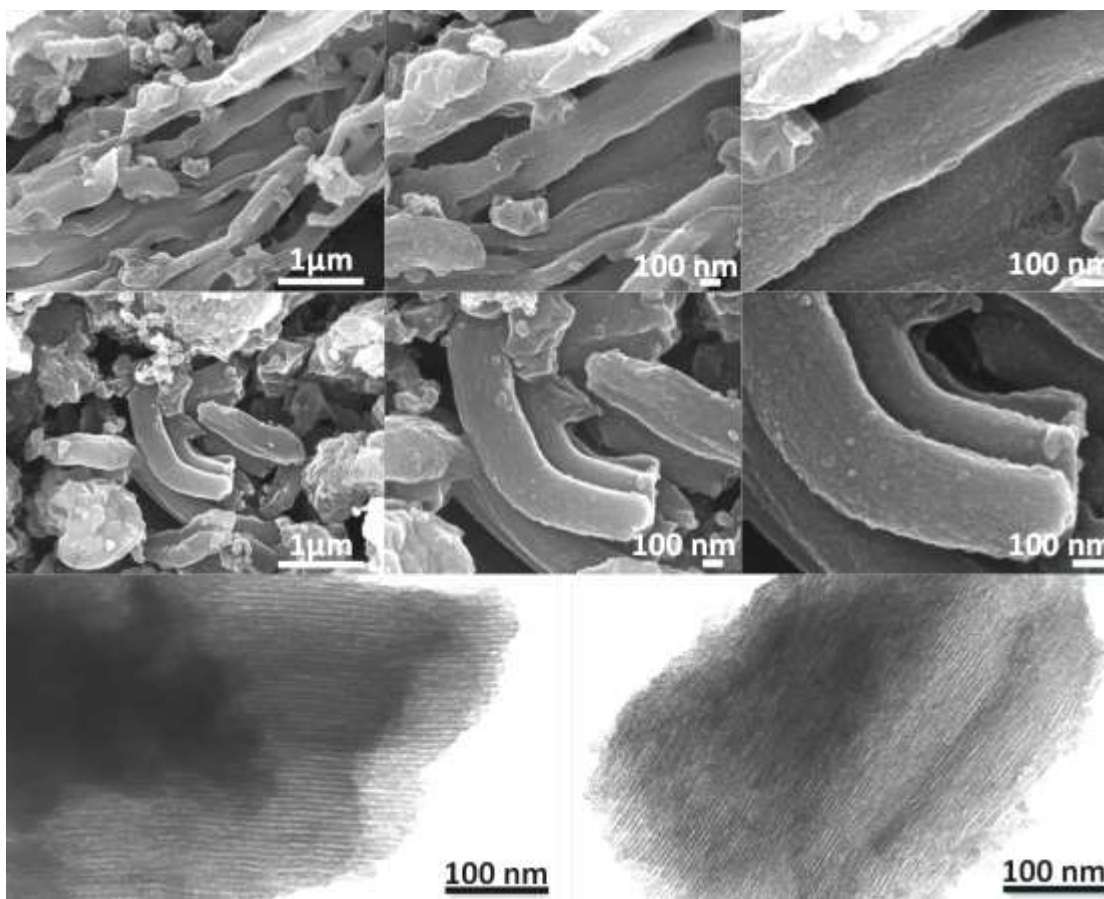


Figura 6.27. Micrografías de MEB y MET del material SBA-N1 sintetizado a baja temperatura.

La matriz SBA-N2 exhibe dos tipos de morfología: racimos de nanopartículas y microesferas^{137, 153-155}, figura 6.28, entretanto la cerámica SBA-N3 (figura 6.29) muestra una acumulación de nanopartículas de sílice porosa similar. La morfología de ambos materiales es comparable con la de los biovidrios^{20, 156}, presentando una estructura amorfa, pero con la ventaja de poseer un sistema mesoporoso. Por último, el SBA-S3, figura 6.30, forma láminas de agregados de partículas¹³⁸, pero a diferencia de los otros materiales, no se observa una estructura porosa, concordando con los resultados obtenidos mediante adsorción de N₂ (baja área superficial y un ciclo de histéresis tipo H3), que describe a las arcillas pilareadas^{136, 157}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

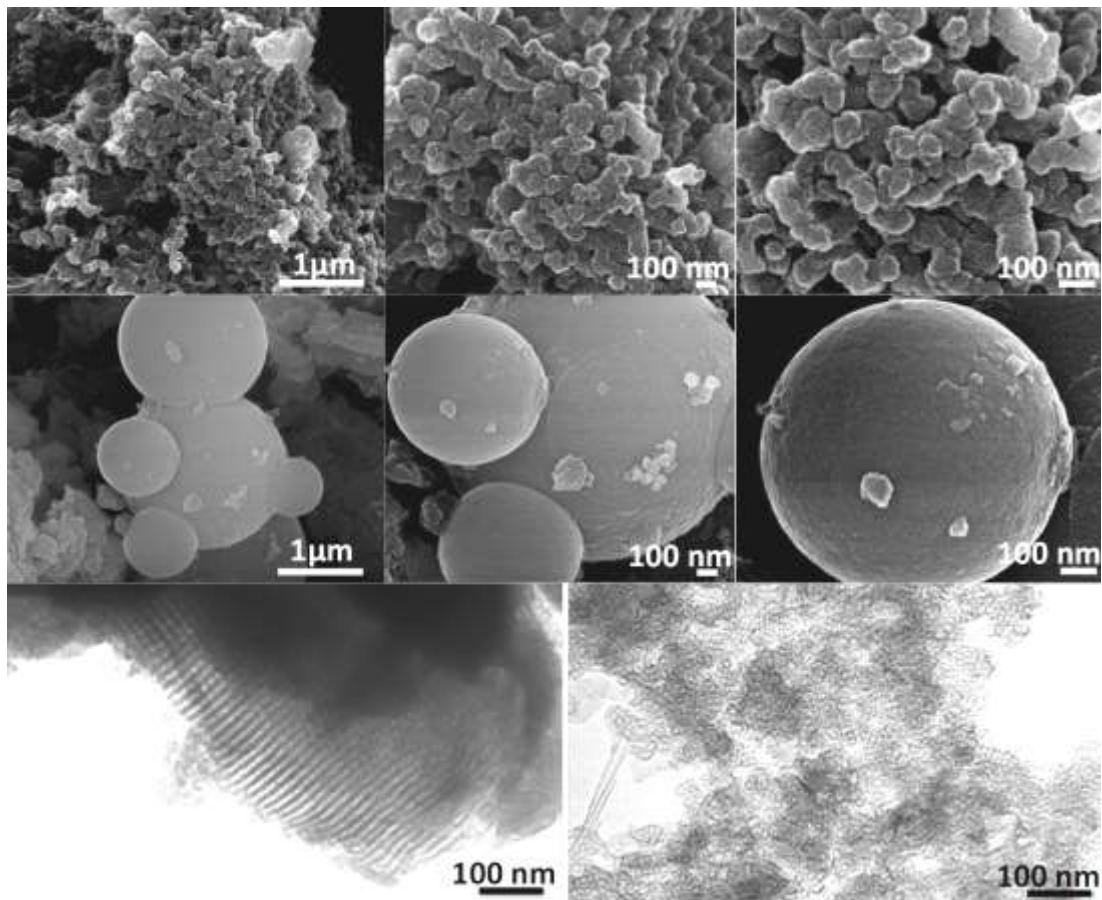


Figura 6.28. Micrografías de MEB y MET del material SBA-N2 sintetizado a baja temperatura.

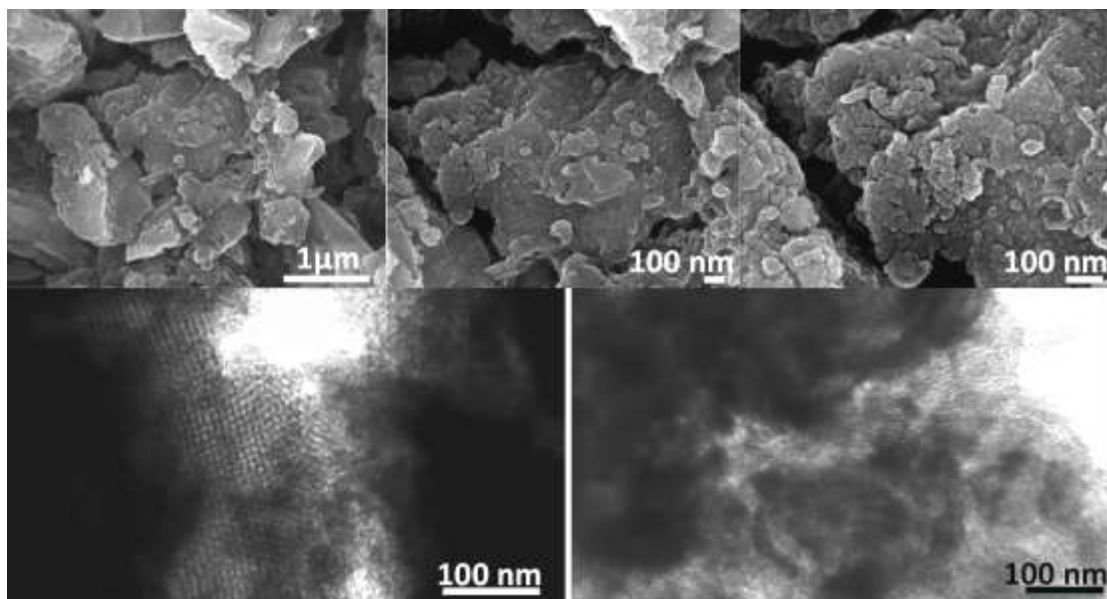


Figura 6.29. Micrografías de MEB y MET del material SBA-N3 sintetizado a baja temperatura.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

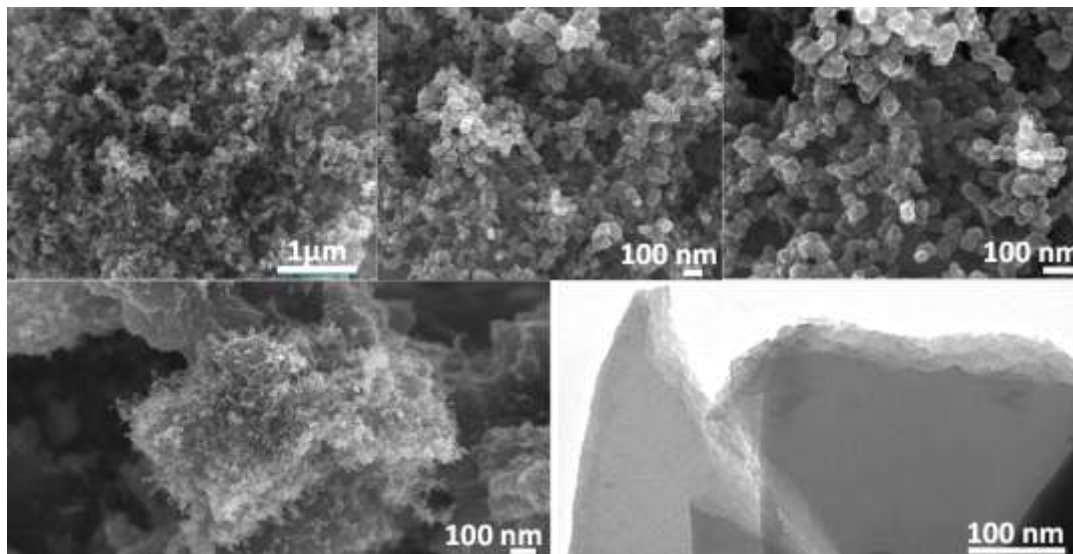


Figura 6.30. Micrografías de MEB y MET del material SBA-S3 sintetizado a baja temperatura.

Los materiales sintetizados a baja temperatura que contienen NaCl, presentan morfologías muy similares a las muestras SBA-N2, SBA-N3 y SBA-S3, también están formados por acumulaciones de nanopartículas de sílice con estructuras similares a los biovidrios.

La caracterización mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión de las cerámicas precursoras S15, S15G y de los nanocomposites magnéticos, se discute a continuación, en el caso de MEB se utilizaron electrones secundarios para la obtención de las micrografías. Cabe mencionar que las micrografías de los materiales asociados a la matriz mesoporosa S15_H no se presentan debido al gran parecido con los materiales S15_{HP}. La cerámica precursora S15_{HP} exhibe una morfología distinta al material SBA-15 sintetizado a baja temperatura, a pesar de que ambas muestran las tres reflexiones características (100), (110) y (200) de las matrices mesoporosas SBA-15 obtenidas por DRX a bajo ángulo, de esta forma se corroboró que las pequeñas variaciones en las condiciones de síntesis, juegan un papel primordial en la obtención de una serie de materiales con distintas propiedades.

En la figura 6.31 se observan nanofilamentos bien definidos que presentan una ligera curvatura, en general poseen un tamaño promedio entre 1-2 μm de largo y un diámetro de 300 a 700 nm. En las micrografías de MET queda claramente evidenciada la presencia de una disposición hexagonal, así como un sistema de canales de poros ordenados, conformados por un arreglo periódico de cilindros que atraviesan de un extremo a otro. Esta geometría también se puede apreciar en los nanofilamentos mostrados por MEB.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

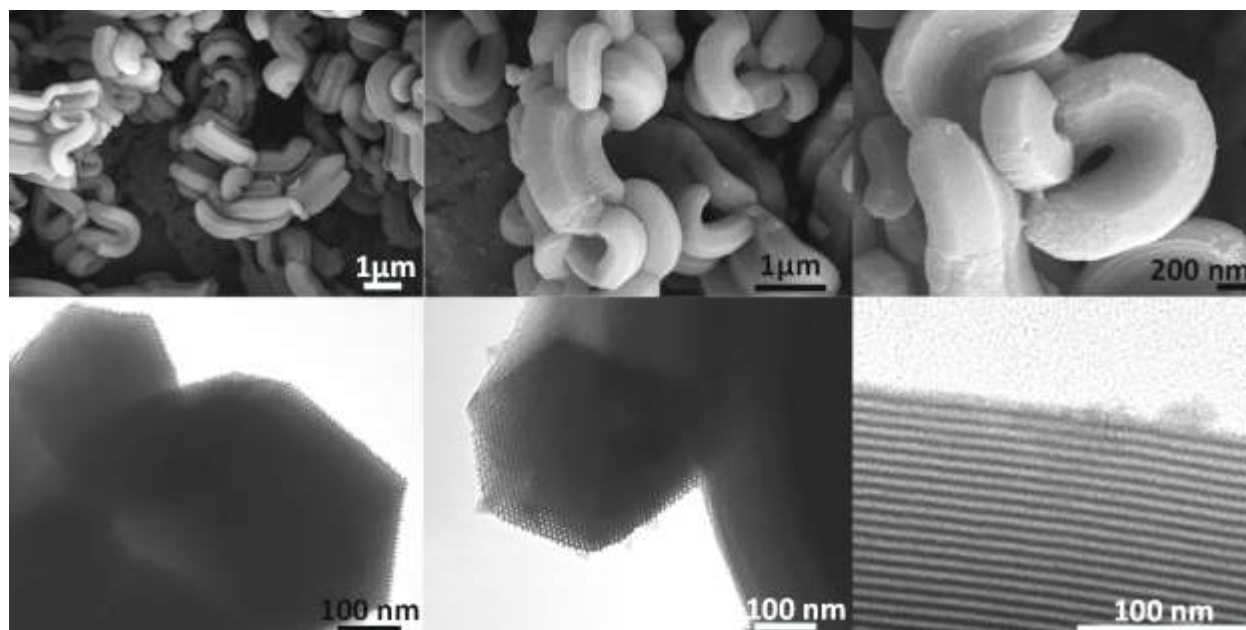


Figura 6.31. Micrografías de MEB y MET del material S15_{HP}.

De la micrografía de MET de alta resolución de la figura 6.31, se pudo calcular el diámetro de poro del material S15_{HP} utilizando el software ImageJ, se obtuvo un valor de 10.26 nm, similar al valor de diámetro de poro de 8.986 nm, estimado mediante el método BJH a partir de las isothermas de adsorción.

Los nanocomposites magnéticos elaborados a partir de S15_{HP} conservan su morfología. Para los materiales NCPEI_{HP}, NCPAA_{HP} y NCHPAA_{HP} el proceso de reacción implicó que la síntesis de las nanopartículas de magnetita se llevó a cabo en el interior de los mesoporos, tanto cuando las NPs son recubiertas con ácido poliacrílico o polietilenimino. Sin embargo, en las micrografías se logra ver una gran cantidad de cúmulos de nanopartículas en el exterior de las matrices, aún más evidente para el material NCHPAA_{HP} con un mayor aporte de precursores de Fe. En la figura 6.32 se observa la disposición hexagonal de poros ordenados, a pesar de que el difractograma a ángulo bajo sólo presentó el pico (100), esto se atribuye a la presencia de cúmulos de nanopartículas en el exterior, que sólo permiten apreciar de manera parcial una secuencia periódica de la porosidad. Así mismo se muestra una segunda morfología derivada del recubrimiento que contiene NPs de magnetita en forma de nanohilos o nanocadenas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

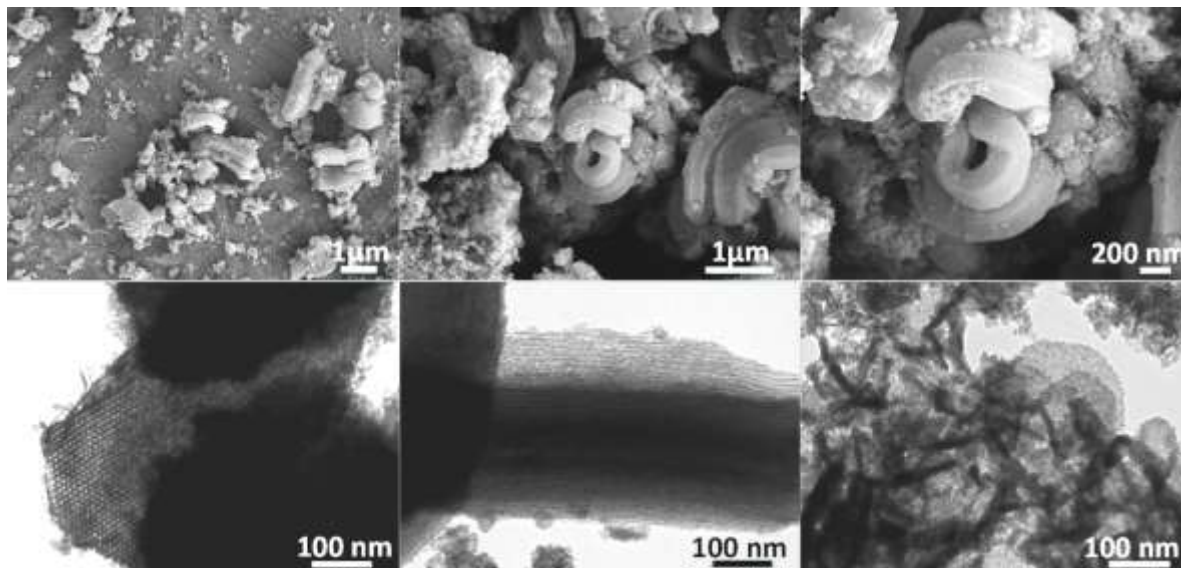


Figura 6.32. Micrografías de MEB y MET del material NCPEI_{HP}.

Al igual que el nanocomposite NCPEI_{HP}, los materiales recubiertos con PAA conservan una estructura ordenada de poros, aunque no es tan clara como en el caso anterior. En las micrografías de TEM del material NCPAA_{HP}, figura 6.33, la magnetita se observa distribuida por segmentos que se extienden a lo largo del interior de los canales de poros, dejando canales disponibles para almacenar otras moléculas. Sin embargo, en la muestra NCHPAA_{HP} (figura 6.34), la morfología del S15_{HP} queda opacada por la cantidad de NPs acumuladas en el exterior, dificultando el acceso al interior de los poros^{111, 112}.

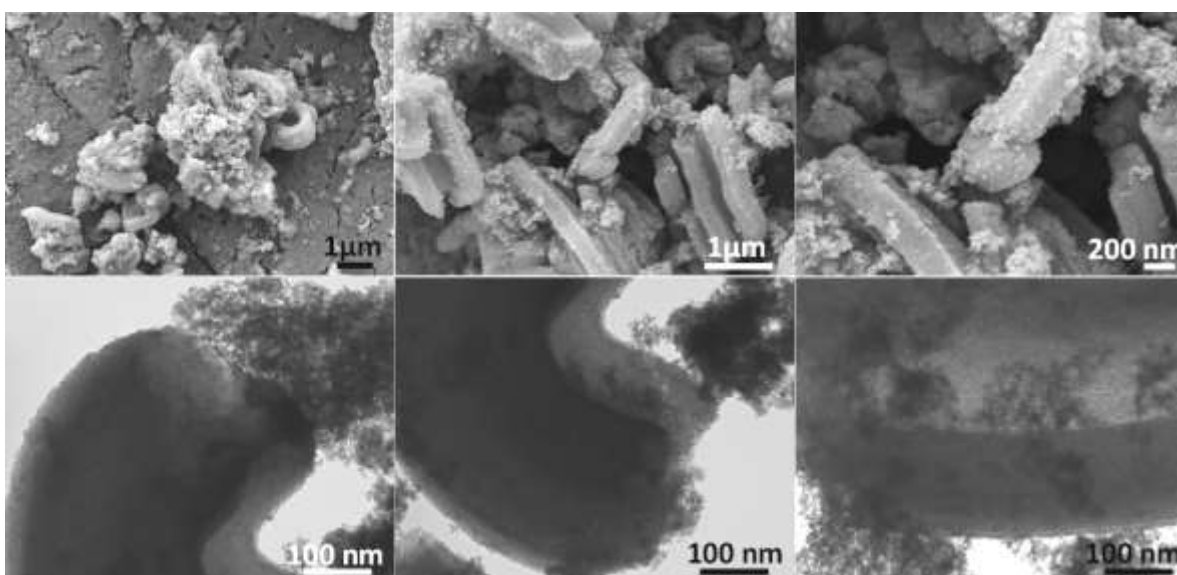


Figura 6.33. Micrografías de MEB y MET del material NCPAA_{HP}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

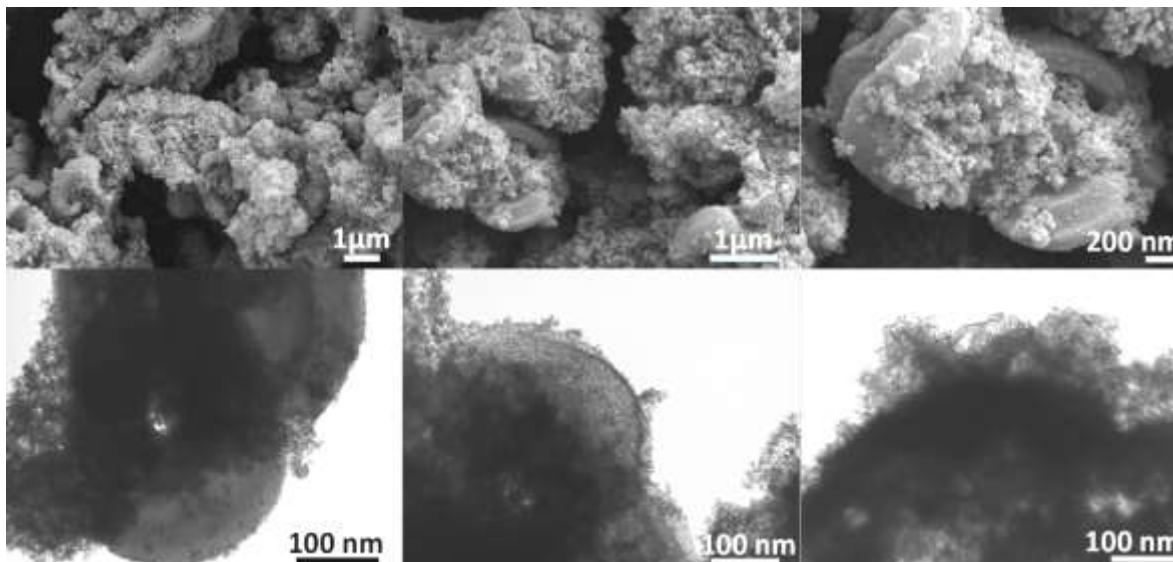


Figura 6.34. Micrografías de MEB y MET del material NCHPAA_{HP}.

Para la elaboración de los NC SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ se requiere de la síntesis previa de NPs de magnetita recubiertas con ácido oleico (MOA) estabilizadas en CHX. Las micrografías de MET de las NPs Fe₃O₄@OA⁹⁴, figura 6.35 (a), muestran una morfología esférica irregular con una amplia distribución de tamaños, figura 6.35 (b). El recubrimiento y el medio orgánico permiten una separación adecuada entre NPs, facilitando el anclaje a la superficie de la cerámica.

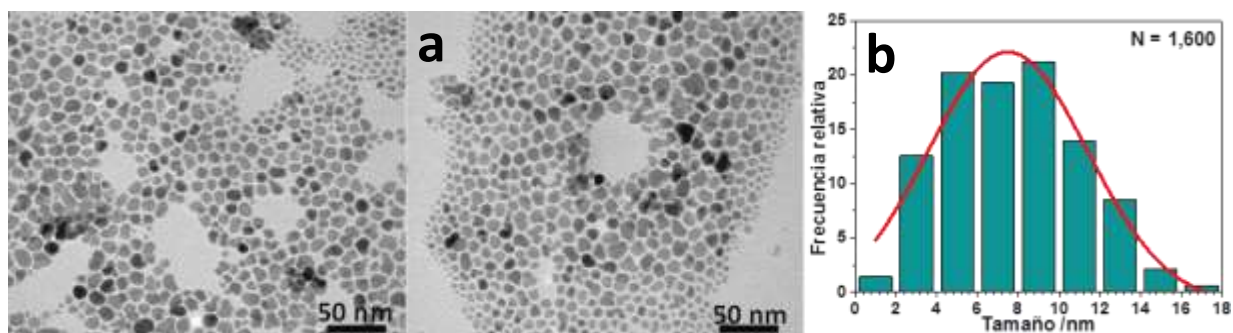


Figura 6.35. (a) Micrografías de MET y (b) distribución de tamaño de las nanopartículas Fe₃O₄@OA.

En la figura 6.36, se observa la formación de una monocapa de NPs de magnetita ancladas a los nanofilamentos del S15_{HP} mediante un recubrimiento de SiO₂ amorfa prácticamente imperceptible tanto por MEB como por MET. Sin embargo, las imágenes de MET muestran el arreglo periódico de los poros y la presencia de las NPs de magnetita a lo largo del material, las cuales se aprecian con mayor detalle en la orilla del nanorod. Este método innovador muestra un material con una morfología muy similar al material precursor, pero con las propiedades adicionales de las NPs magnéticas. El diámetro de poro

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

calculado a partir de la micrografía de MET de alta resolución fue 10.32 nm, muy parecido al obtenido para S15HP, sin embargo menor al estimado por BJH de 15.344 nm.

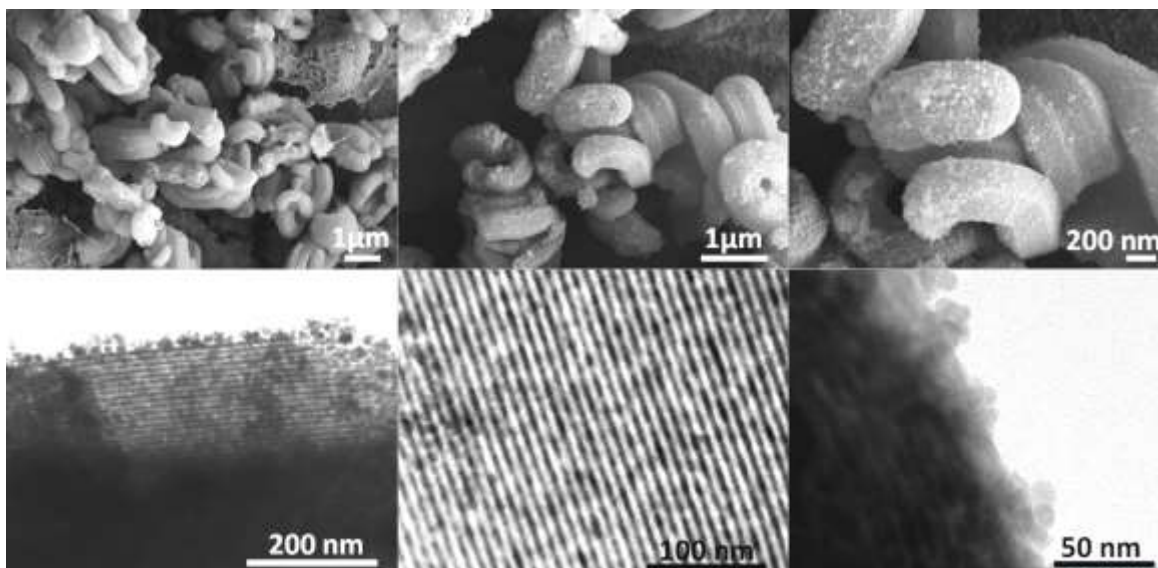


Figura 6.36. Micrografías de MEB y MET del material LMNC_{HP}.

Un mayor contenido de nanopartículas en la superficie del material HMNC_{HP} (figura 6.37), hace que la apariencia de los nanofilamentos sea acolchada, aún así, la estructura ordenada y el sistema de poros de la matriz S15_{HP} se conserva. Este nuevo método de síntesis de nanocomposites mesoporosos mantiene en gran medida las propiedades de los materiales de partida, confiriéndoles propiedades adicionales.

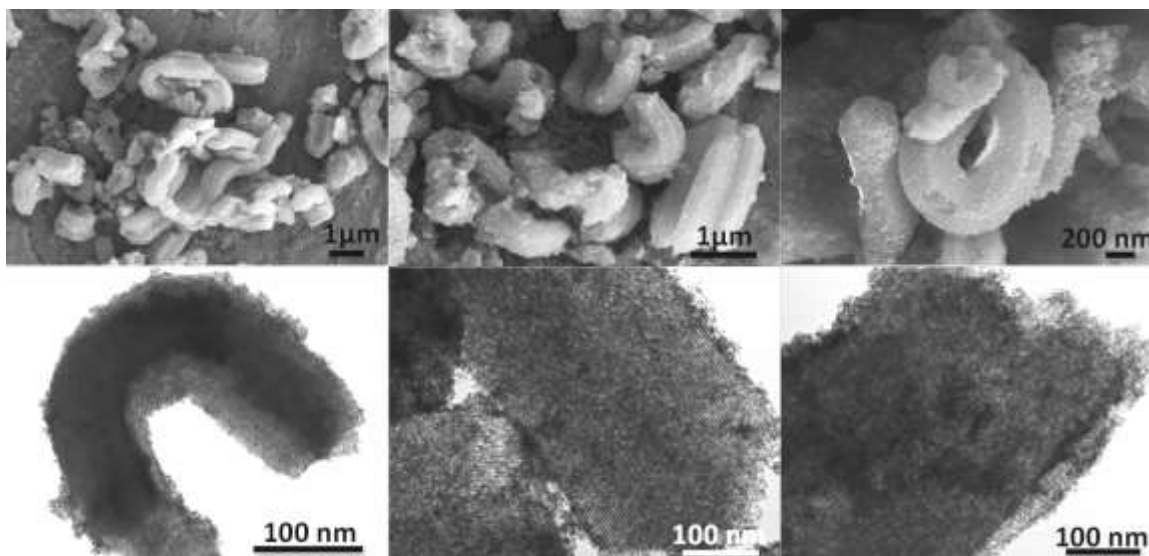


Figura 6.37. Micrografías de MEB y MET del material HMNC_{HP}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los nanocomposites SBA-15/(Fe₃O₄)_n@C preparados por el proceso solvotermal presentan características interesantes y únicas. Por su parte en el material MANC_{HP}, figura 6.38, las NPs de magnetita se anclan a la superficie externa de la cerámica en forma de agregados esféricos con un tamaño promedio entre 50-150 nm, haciéndolos notablemente visibles. Este arreglo deja libre tanto el interior de los poros, como un alto porcentaje del área superficial externa del S15_{HP}, razón por la cual se observan fácilmente por DRX, las tres reflexiones características del material SBA-15.

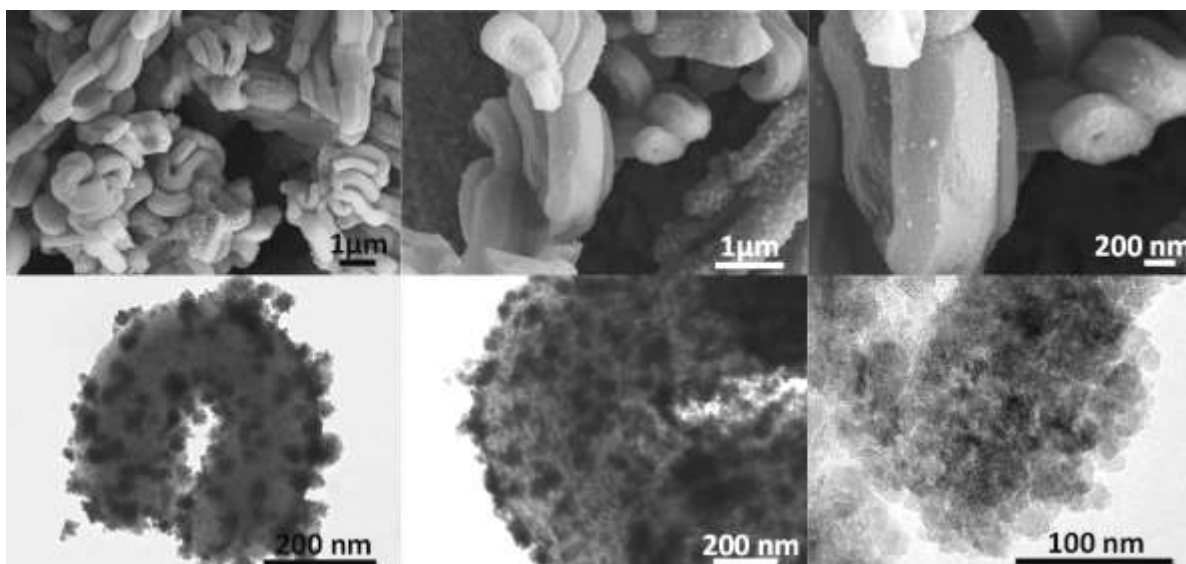


Figura 6.38. Micrografías de MEB y MET del material MANC_{HP}.

Mientras que en el caso de la muestra CSNC_{HP}, figura 6.39, las condiciones de reacción permiten la formación de estructuras core-shell (Fe₃O₄)_n@C perfectamente definidas con un tamaño mayor a los 100 nm, las cuales se anclan mediante interacciones con los grupos carboxílicos del recubrimiento y los grupos silanol de la superficie de la cerámica, el core se compone principalmente de NPs de magnetita entre 8 y 16 nm de diámetro.

El análisis por MET y MEB de las cerámicas S15, no mostró una diferencia importante entre ellas, razón por la cual sólo se expusieron los materiales elaborados a partir del material S15_{HP}, ya que presentó las mejores propiedades fisicoquímicas y texturales. Sin embargo, las cerámicas precursoras sintetizadas en presencia de glicerol (S15G) exhibieron una morfología muy distinta entre sí, razón por la cual se presentan ambas a continuación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

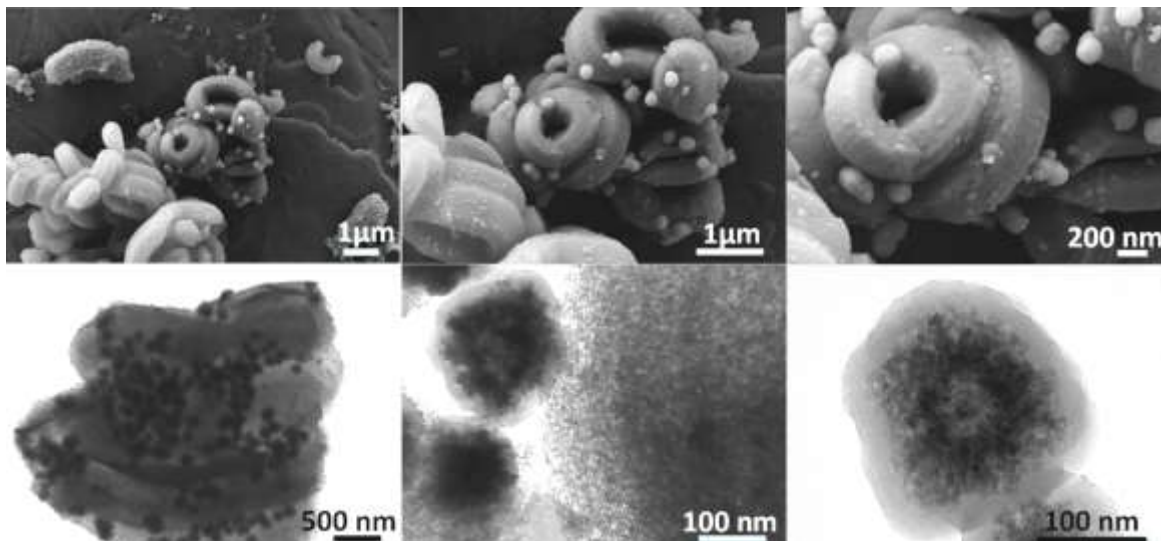


Figura 6.39. Micrografías de MEB y MET del material CSNC_{HP}.

En la figura 6.40 se observan dos morfologías correspondientes a la matriz mesoporosa S15_{G_H}, una principal en forma de partículas alargadas¹²⁸ (elipsoides) con geometría hexagonal y una secundaria en forma de espiral, las partículas tienen un largo semejante a los materiales S15 (entre 1-3 μm); sin embargo, poseen el doble de ancho (>1 μm). Presentan una estructura hexagonal con porosidad ordenada. La adición de H₃PO₄ durante la síntesis del material S15_{G_{HP}} conllevó a la reducción drástica del tamaño de partícula en forma de nanorod con una longitud promedio de 300 a 500 nm y un diámetro de 50-100 nm similar a los encontrados por Johansson¹⁵², figura 6.41. El diámetro de poro obtenido por alta resolución fue 8.533 nm, muy parecido al estimado por BJH de 8.117 nm.

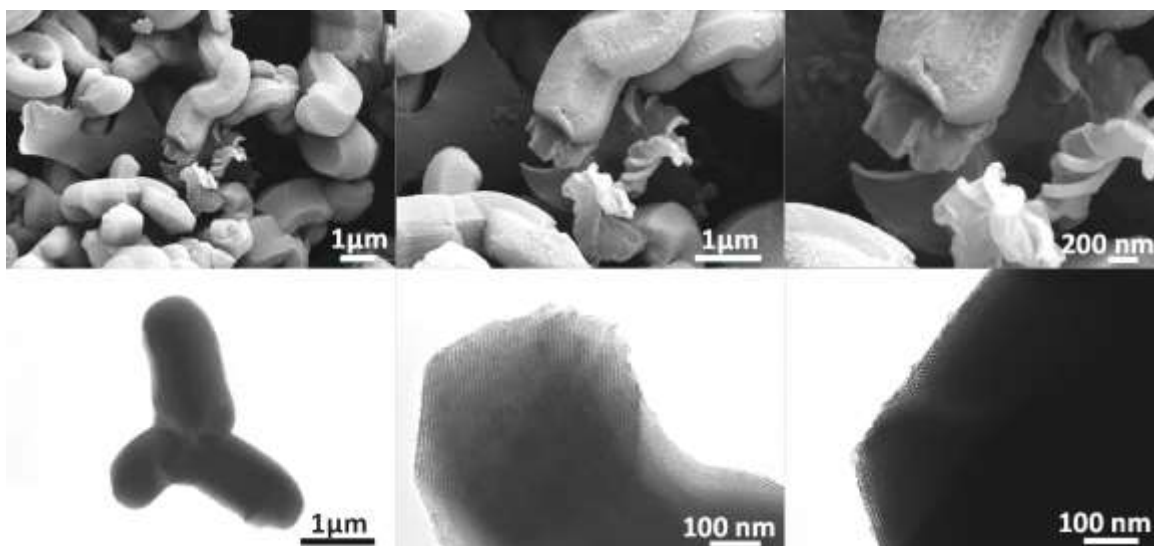


Figura 6.40. Micrografías de MEB y MET del material S15_H.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

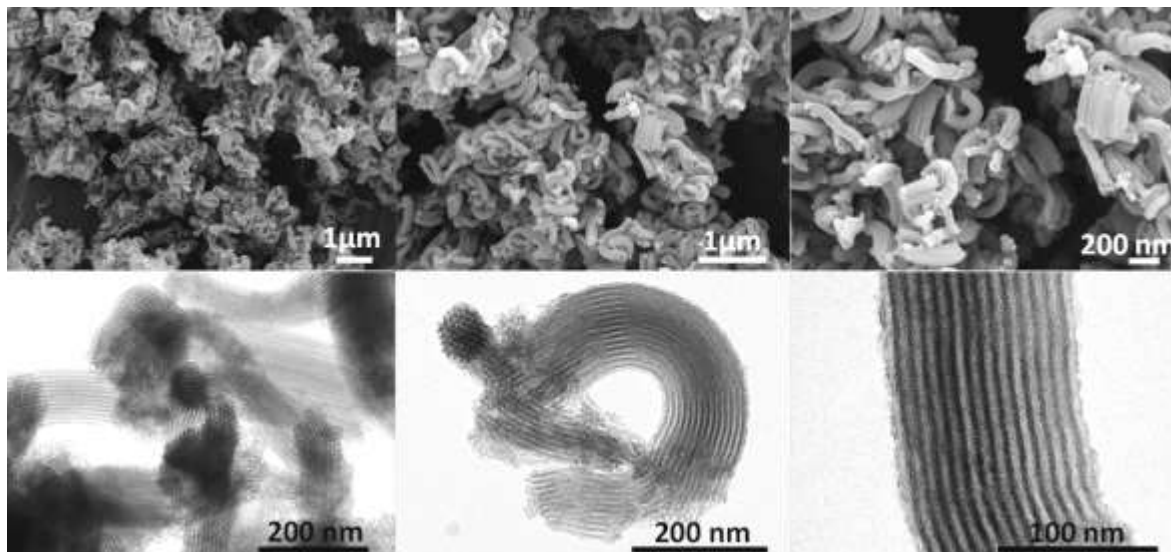


Figura 6.41. Micrografías de MEB y MET del material S15G_{HP}.

Los NCs magnéticos SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizados con N1, N2 y N3 son prácticamente idénticos. Razón por la cual, en las figuras 6.42 y 6.43, sólo se muestran los materiales MNCN_{3H} y MNCN_{3HP}, respectivamente. Presentan características similares a los materiales SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂, ya que se obtuvieron por el mismo proceso de síntesis. Sin embargo, la presencia de NPs de magnetita ancladas a la superficie, se hizo más evidente en el material MNCN_{3HP} debido al tamaño de la matriz mesoporosa S15G_{HP} (figura 6.43). Presentó un diámetro de poro de 8.327 nm, similar al BJH de 8.115 nm, indicando que no hubo una reducción del mismo tras el anclaje y la funcionalización de las NPs.

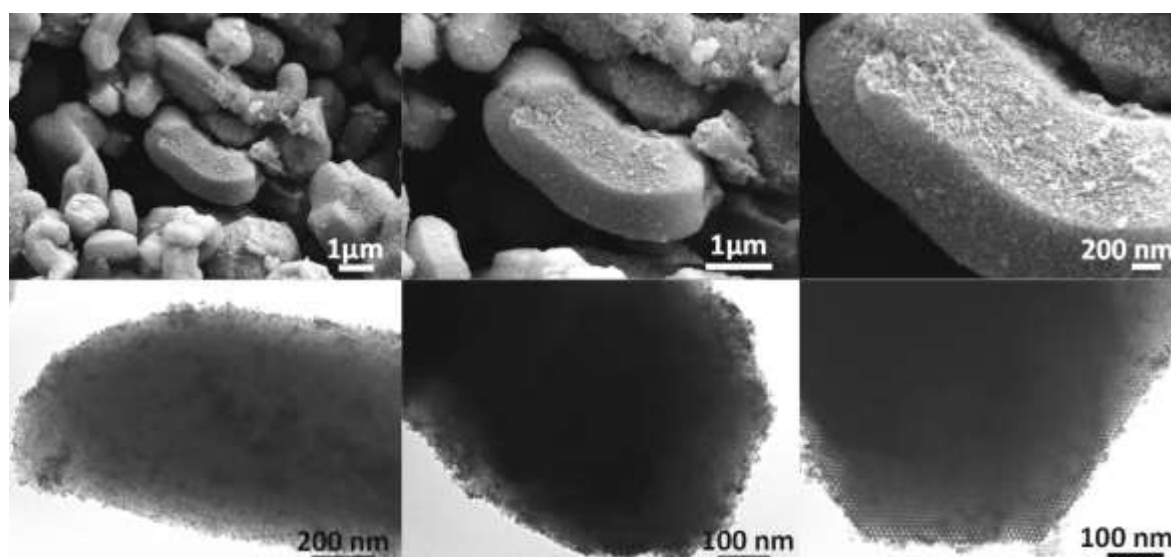


Figura 6.42. Micrografías de MEB y MET del material MNCN_H.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

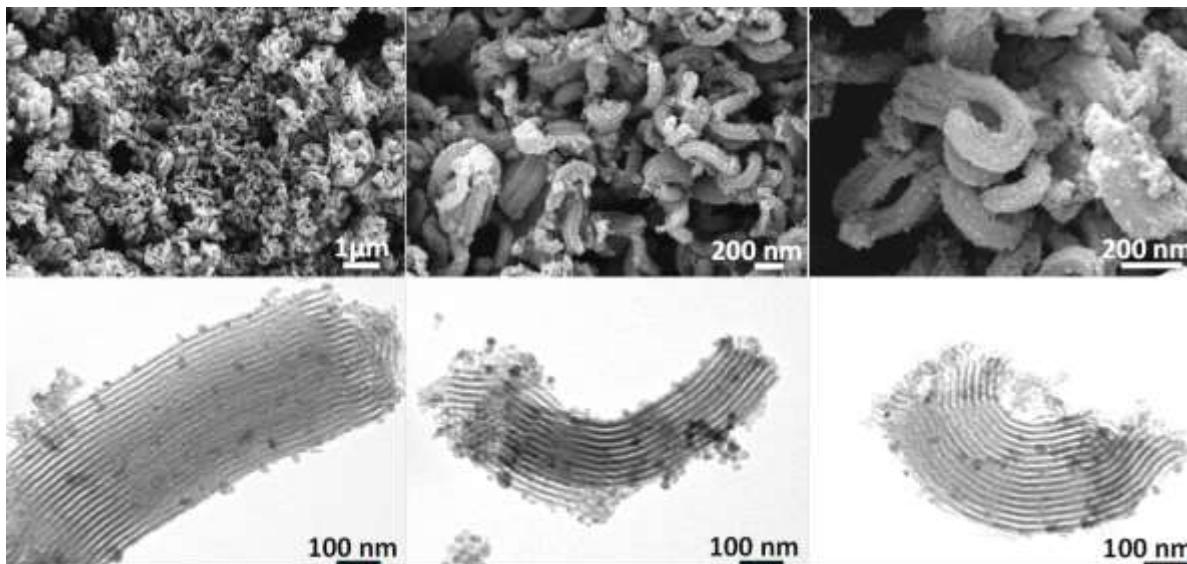


Figura 6.43. Micrografías de MEB y MET del material MNCN_{HP}.

6.7. CARACTERIZACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ²⁹Si

La aplicación de la RMN a los compuestos de silicio ha supuesto un gran avance a la hora de determinar la estructura de estos, los más abundantes y variados de la corteza terrestre. El principal problema es la baja abundancia natural del núcleo magnéticamente activo, ²⁹Si con un 4.7 %. Una señal individual de ²⁹Si en un espectro de MAS -NMR queda perfectamente caracterizada por tres parámetros: posición, anchura e intensidad. El **desplazamiento químico** viene determinado por la posición de la señal en el espectro de dominio de frecuencia. Este parámetro es el que proporciona mayor información porque refleja sensiblemente el entorno inmediato del núcleo de silicio¹⁵⁸. Así la resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido de ²⁹Si, es una herramienta poderosa en la determinación de grupos mono-, di-, tri-, y tetrafuncionales¹⁵⁹ (figura 6.44) de varios entornos moleculares de diversos materiales que contienen silicio, tales como geles de sílice, polímeros orgánicos y resinas de silicio, materiales mesoporosos, materiales inorgánicos-orgánicos híbridos, entre otros.

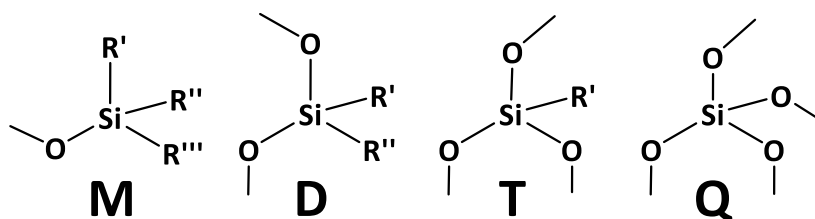


Figura 6.44. Abreviaturas ampliamente utilizadas y aceptadas para los grupos de sílice.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los materiales analizados en este apartado presentan picos de resonancia en la región de los sitios Q y/o D, describiendo los entornos tetraédricos del silicio y sus interacciones con el medio, de esta forma existen varias posibilidades de enlazarse, así, las unidades estructurales Q⁴, Q³, Q², Q¹, D² y D¹ representan la interrelación de los tetraedros formados por el átomo de silicio¹⁶⁰ que dan lugar a los sistemas mesoporosos, como se muestra en la figura 6.45.

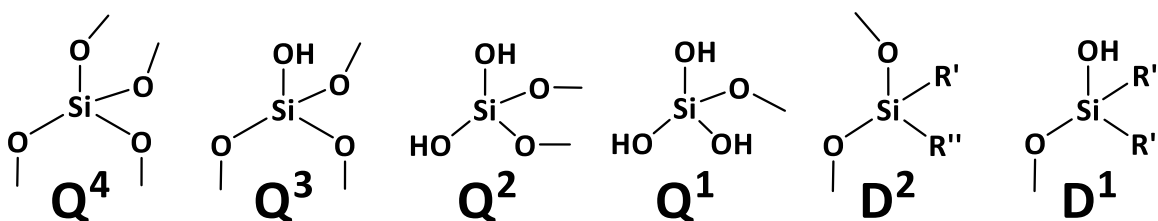


Figura 6.45. Unidades estructurales de los tetraedros de sílice que describen a las especies Q y D de resonancia magnética nuclear (RMN) de ²⁹Si.

En base a lo anterior, la figura 6.46 representa el espectro de RMN CP-MAS de ²⁹Si de los materiales sintetizados a baja temperatura sin NaCl. Se pueden ver tres señales de resonancia correspondientes a los centros de los siloxanos Q⁴ ($\delta = -111$ ppm), Q³ ($\delta = -101$ ppm), y Q² ($\delta = -92$ ppm)^{50, 69, 127, 161}. Se han observado similitudes entre las muestras de cada grupo funcional; las intensidades de los picos Q³: Q⁴ en las muestras SBA-Nn fueron superiores al de las matrices SBA-Sn, sin embargo Q⁴ predomina en el primer caso, mientras Q³ en el segundo; lo cual indica que los grupos etilendiamino se encuentran mayoritariamente anclados covalentemente a la matriz de sílice, a través de tres enlaces siloxano (Si-O-Si). Para los materiales funcionalizados con el grupo tetrasulfuro (SBA-Sn), se observa una condensación inferior de la red de silicato, quedando sin reaccionar parte de los grupos Si-OH para dar origen a sitios de unión tipo Si-O-Si, lo cual se confirma por una mayor intensidad en la banda Q². La funcionalización de la superficie con grupos etilendiamino causó una pérdida de orden estructural, debido a la interacción de los precursores durante la reacción, sin embargo la condensación de los grupos silanol se llevó a cabo correctamente, dando origen a un arreglo mesoporoso amorfo, por su parte la presencia del grupo tetrasulfuro anclado por ambos lados de la molécula a las paredes de la silica, afecto a condensación de los grupos silanol debido a la rigidez y la dificultad de acceder a cierta posiciones en la red, aún así se obtuvieron estructuras ordenadas. Estos resultados son consistentes con lo analizado anteriormente por DRX y BET, donde las áreas superficiales son mayores en los materiales SBA-Nn, pero no se observan las reflexiones características de los sistemas ordenados mesoporosos. Una cantidad alta de grupos silanol en la superficie podría favorecer la bioactividad, dado que se conoce que la presencia de estos grupos en

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

la superficie de los biovidrios contribuye enormemente a su excelente bioactividad, de esta forma, los materiales SBA-Sn al poseer grupos silanol libres podrían ser candidatos a un segundo proceso de funcionalización por post-síntesis.

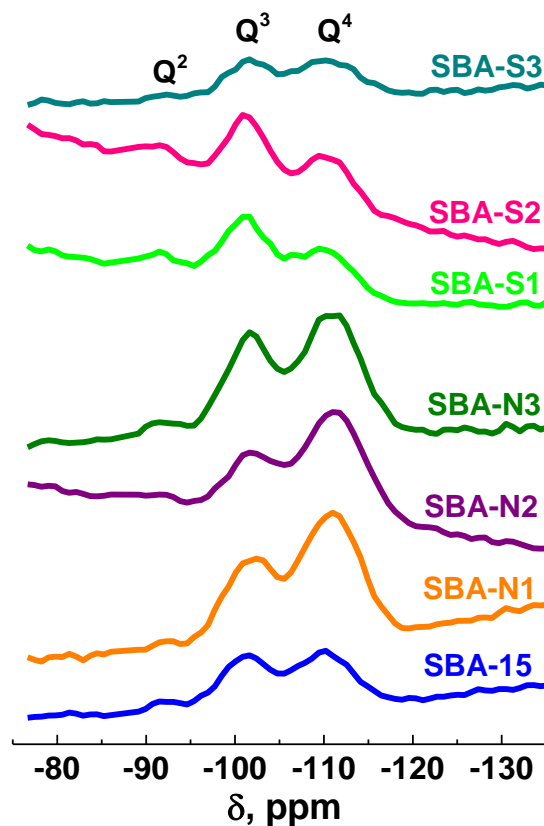


Figura 6.46. Espectros de RMN CP-MAS de ^{29}Si de los materiales mesoporosos sintetizados a baja temperatura sin NaCl.

En el caso de los NCs SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 @ NH_2 , la RMN de ^{29}Si en estado sólido demostró la eficiencia del proceso de funcionalización, observándose picos intensos entre -18 y -32 ppm debidos a las sitios D que describen los sistemas de sílice bifuncionalizados. Particularmente para estos materiales las bandas D resultaron ser 3 veces más intensas que las bandas Q, los cuales comúnmente predominan en los materiales mesoporosos, biovidrios y demás materiales de composición similar. La intensidad de los picos D, evidencia el hecho, de que en la superficie externa predominan las especies de silicio que poseen grupos funcionales amino; mientras que en la mayoría de los ejemplos de los materiales mesoporosos de sílice funcionalizados encontrados en la literatura, las bandas T son menos o de igual intensidad que las Q; esto representa una gran ventaja, ya que se obtiene un alto porcentaje de modificación orgánica de la superficie, sin afectar el diámetro de poro de las matrices mesoporosas, como suele ocurrir en los casos

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

de funcionalización por post-síntesis, de esta forma se tienen materiales con canales de poros disponibles para almacenar diversas moléculas, y a su vez una superficie más reactiva y susceptible a interactuar fuertemente con otros compuestos. A continuación se discuten los espectros de RMN de las figuras 6.47, 6.48 y 6.49, se observa una mayor cantidad de picos en los materiales $MNCN_{HP}$, indicando a un entorno más diverso y con mayor posibilidad de interactuar con otras moléculas. La presencia de distintas bandas vinculadas a una sola unidad estructural por ejemplo Q^4 , representa la variedad de especies próximas a las cuales se encuentra enlazada, pudiendo ser un Q^4 , Q^3 , Q^2 , D^2 o D^1 . El análisis de los materiales se resume en la tabla 6.13.

Tabla 6.13. Desplazamientos en ppm y porcentajes de área bajo la curva de las especies de silicio presentes en los nanocomposites magnéticos funcionalizados con grupos amino.

MNCN	Desplazamiento (ppm)	Entorno de silicio	Area bajo la curva (%)	MNCN	Desplazamiento (ppm)	Entorno de silicio	Area bajo la curva (%)
1_H	-125.69	Q^4	9.40	1_{HP}	-123.80	Q^4	18.76
	-114.20	Q^4	76.73		-114.24	Q^4	45.96
	-104.28	Q^3	13.87		-107.77	$Q^4 + Q^3$	21.82
	-31.46	D^2	21.28		-101.55	Q^3	13.46
	-27.15	D^2	32.45		-35.01	D^2	5.81
	-20.99	D^1	46.36		-31.40	D^2	21.02
					-26.99	D^2	35.06
			-20.51	D^1	35.56		
				-14.58	D^1	2.55	
2_H	-31.34	D^2	6.91	2_{HP}	-117.55	Q^4	11.98
	-29.25	D^2	17.22		-112.31	Q^4	58.31
	-27.99	D^2	44.04		-109.01	Q^4	3.09
	-25.66	$D^2 + D^1$	31.83		-107.66	$Q^4 + Q^3$	1.78
					-104.15	Q^3	14.12
					-101.22	Q^3	10.72
					-29.86	D^2	20.01
			-26.65	D^2	44.22		
				-22.94	D^1	35.77	
3_H	-36.40	D^2	3.01	3_{HP}	-32.93	D^2	22.19
	-32.02	D^2	33.98		-31.76	D^2	14.53
	-29.68	D^2	24.71		-30.02	D^2	3.20
	-27.60	D^2	25.66		-29.16	D^2	20.58
	-22.18	D^1	12.64		-27.75	D^2	1.13
					-26.46	D^2	10.42
				-24.75	$D^2 + D^1$	5.92	
				-22.90	D^1	21.29	
				-19.82	D^1	0.74	

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

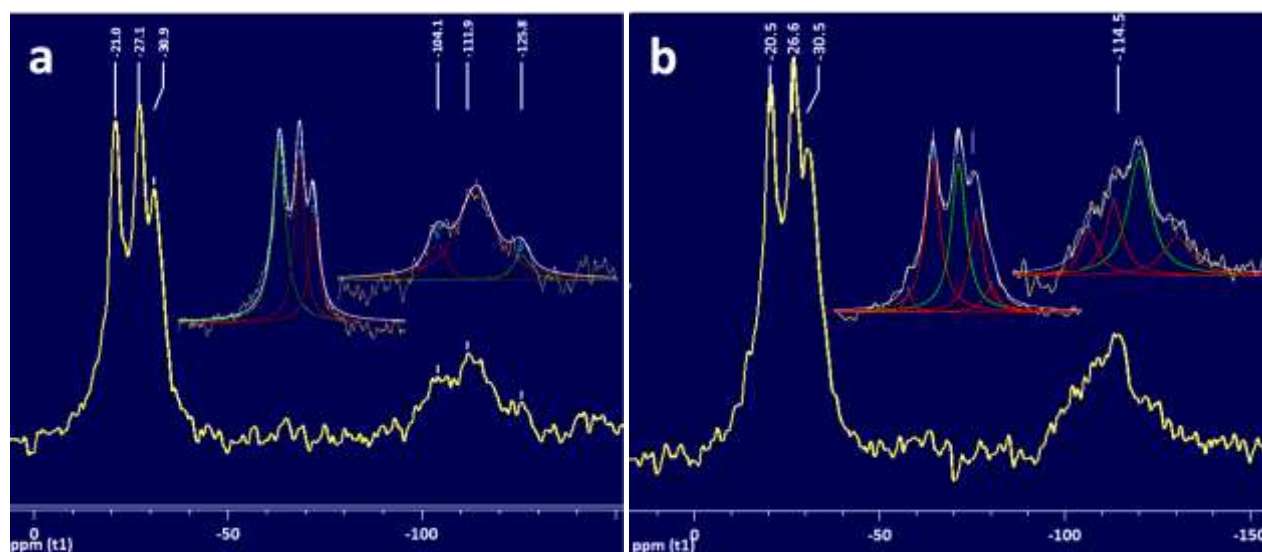


Figura 6.47. Espectros de RMN CP-MAS de ^{29}Si de los nanocompositos magnéticos funcionalizados con NH_2 y CH_3 , (a) MNCN1_H y (b) MNCN1_{HP}.

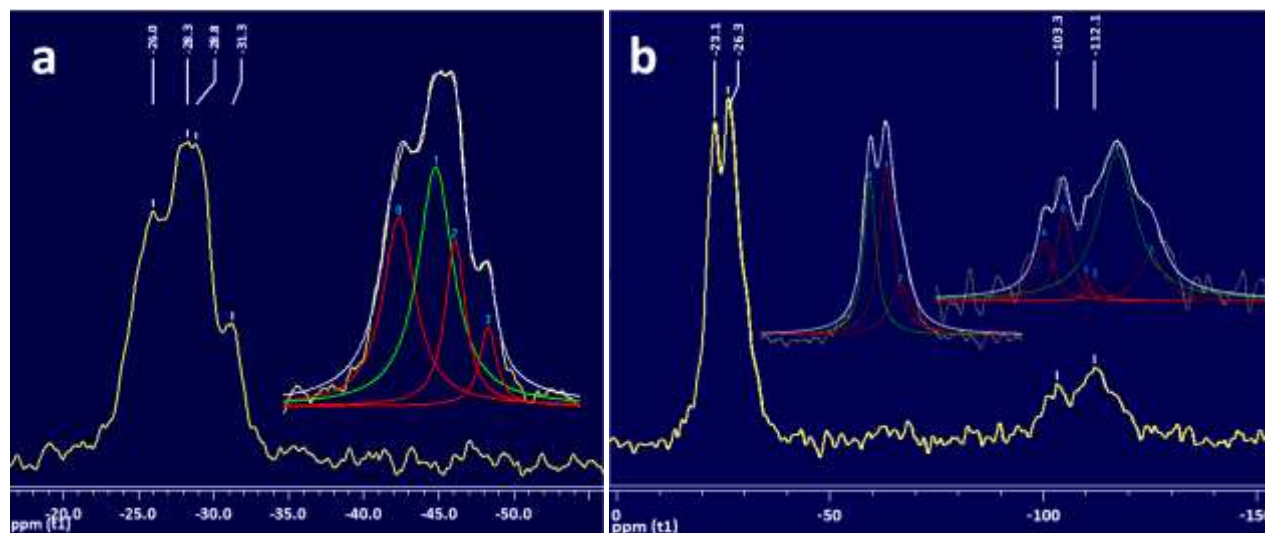


Figura 6.48. Espectros de RMN CP-MAS de ^{29}Si de los nanocompositos magnéticos funcionalizados con $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ (a) MNCN2_H y (b) MNCN2_{HP}.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

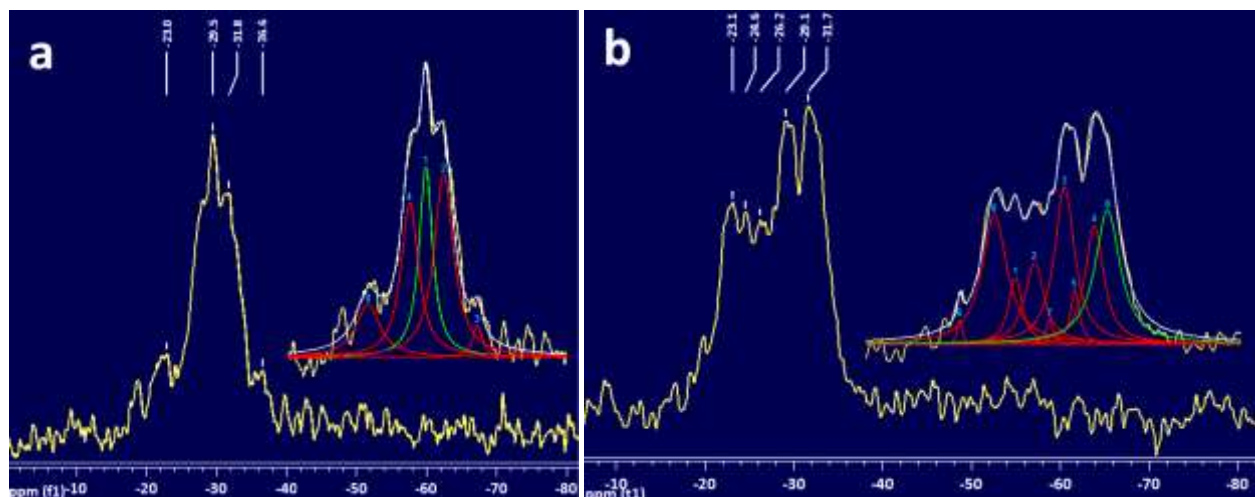


Figura 6.49. Espectros de RMN CP-MAS de ^{29}Si de los nanocomposites magnéticos funcionalizados con NH_2 , (a) MNCN3_H y (b) MNCN3_HP .

6.8. CARACTERIZACIÓN POR MAGNETOMETRÍA DE MUESTRA VIBRANTE

Las curvas de magnetización en función del campo magnético aplicado hasta 10 kOe, se realizaron en muestras secas a temperatura ambiente. Los datos de magnetización se normalizaron a la cantidad de masa de magnetita para cada muestra (determinada por FAAS), asumiendo que todo el hierro presente en la muestra existe en forma de Fe_3O_4 . Los datos de magnetización frente al campo de los NCs sintetizados a partir de la cerámicas mesoporosas S15, se presentan en la Figura 6.50, mostrando pequeños campos coercitivos, aunque en sentido estricto no debería haber campo coercitivo, son lo suficientemente pequeños para decir que los materiales se comportan de manera superparamagnética (SPM), ver tabla 6.14. De la figura 6.51, se puede inferir que el método de síntesis juega un papel importante en las propiedades magnéticas de estos materiales. Todos los NCs que tienen anclada la magnetita en la superficie exterior del SBA-15 presentan una mejor respuesta magnética, siendo los NCs SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 los que ostentan la mayor respuesta.

Tabla 6.14. Valores de campo coercitivo H_c (Oe) de los NCs magnéticos SBA-15/ Fe_3O_4 .

Muestra	H_c (Oe)	Muestra	H_c (Oe)	Muestra	H_c (Oe)	Muestra	H_c (Oe)	Muestra	H_c (Oe)
LMNC _H	0.78	LMNC _{HP}	0	NCPAA _H	1.09	NCPEI _H	3.28	MNCN2 _H	1.91
HMNC _H	0.39	HMNC _{HP}	0.19	NCPAA _{HP}	0.55	NCPEI _{HP}	0.68	MNCN3 _H	0
MANC _H	40.46	MANC _{HP}	30.56	NCHPAA _H	0.68	MNCN1 _H	0	MNCN2 _{HP}	1.06
CSNC _H	44.99	CSNC _{HP}	36.97	NCHPAA _{HP}	3.68	MNCN1 _{HP}	1.48	MNCN3 _{HP}	0

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

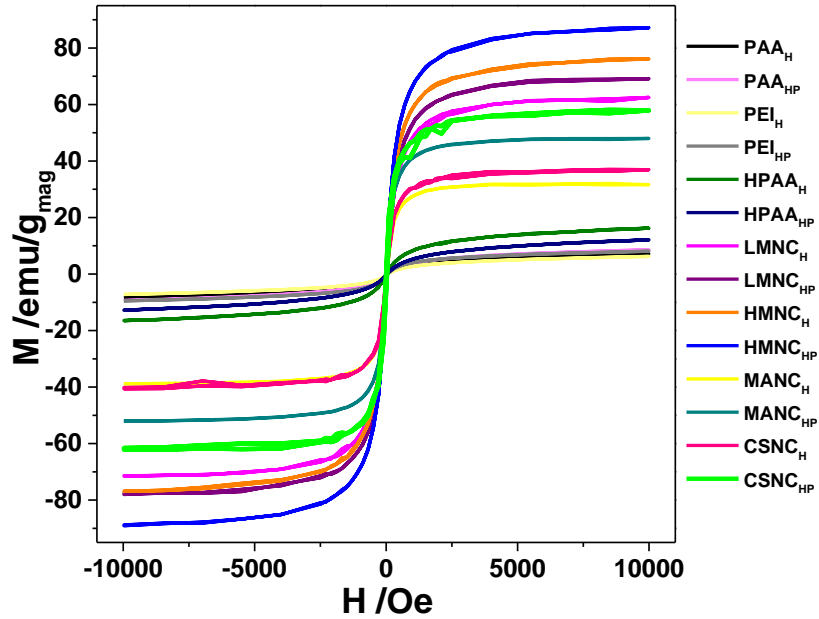


Figura 6.50. Ciclos de magnetización de los NCs magnéticos SBA-15/Fe₃O₄, hasta 10 kOe.

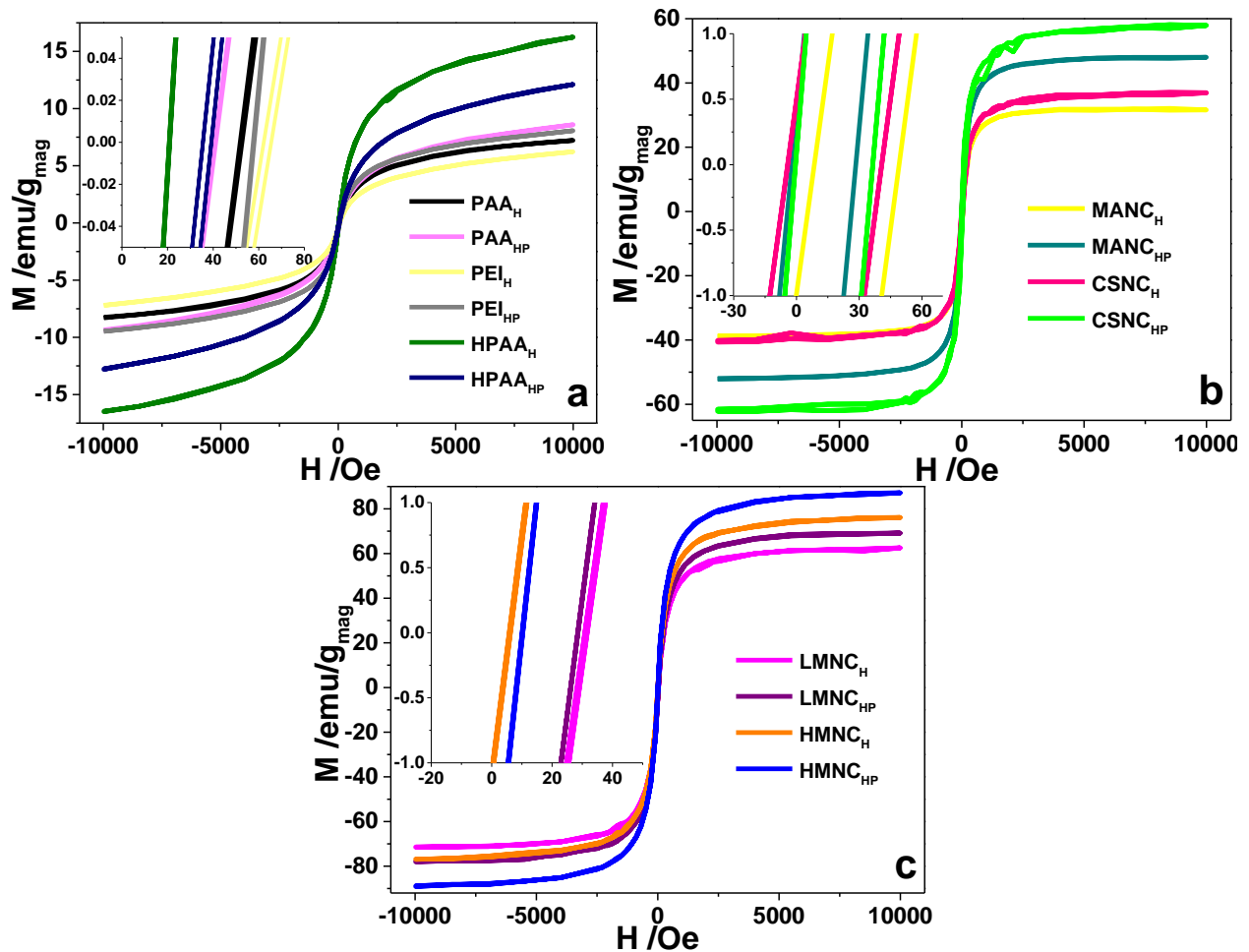


Figura 6.51. Ciclos de magnetización (a) SBA-15/Fe₃O₄@PAA_PEI; (b) SBA-15/Fe₃O₄@C y (c) SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el caso de las muestras NCPAA, NCHPAA y NCPEI, fue necesario realizar una estimación del tamaño de los núcleos de óxido de hierro presentes en el interior de los poros de las matrices mesoporosas, esto se llevó a cabo mediante cálculos indirectos utilizando las ecuaciones desarrolladas por Vekas¹⁶², que contienen un sistema de nanopartículas magnéticas que interactúan SPM. El diámetro magnético (D_{mag}), y su desviación (S) se puede obtener usando las siguientes ecuaciones:

$$D^3 = \frac{6k_B T}{\mu_0 \pi H_0 M_d} \sqrt{\frac{M_s}{3\alpha H_0}} \quad S = \frac{1}{3} \sqrt{\frac{3\alpha H_0}{M_s}} \quad (1)$$

$$\alpha = (\sqrt{9 + 12\chi_i} - 3)/2$$

donde M_s y M_d son la magnetización de saturación de las nanopartículas y la magnetización espontánea, respectivamente, y χ_i es la susceptibilidad inicial a campos bajos. La magnetización de saturación M_s se determinó extrapolando los datos M de $H^{-1} \rightarrow 0$ para $H \leq 1$ kOe y, $1/H_0$ se tomó como el punto donde la tangente cruza los ejes horizontales.

De esta forma, el diámetro promedio de las NPs de Fe_3O_4 fue $D = 4.7$ nm ($S = 0,4$), lo que concuerda con el valor del tamaño de dominio cristalino determinado por difracción de rayos X; este resultado explica en parte, su reducida $M_{\text{sat}}^{\text{NP}}$ (por debajo de 10 emu/g), en comparación con la de magnetita masiva $M_{\text{sat}}^{\text{bulk}}$ (92 emu/g). La relación superficie-volumen para partículas pequeñas ($D < 5$ nm)¹⁶³, puede ascender hasta un 30% y la contribución magnética de la superficie (capa magnética desordenada) participa fuertemente en el comportamiento magnético principal de las NPs mediante la reducción de la magnetización total. Además, la presencia de otros óxidos de hierro no magnéticos podría contribuir también a esta baja $M_{\text{sat}}^{\text{NP}}$.

En la figura 6.52 (a) se muestran las curvas de magnetización en función del campo magnético aplicado hasta 10 kOe, de los nanocompuestos magnéticos funcionalizados con diversos grupos amino, se observa en todos los casos un comportamiento muy similar a los NCs magnéticos SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 (LMNC) presentando una excelente respuesta magnética normalizada a la masa de magnetita presente en estos materiales, sólo por debajo de la magnetización de la magnetita masiva antes mencionada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

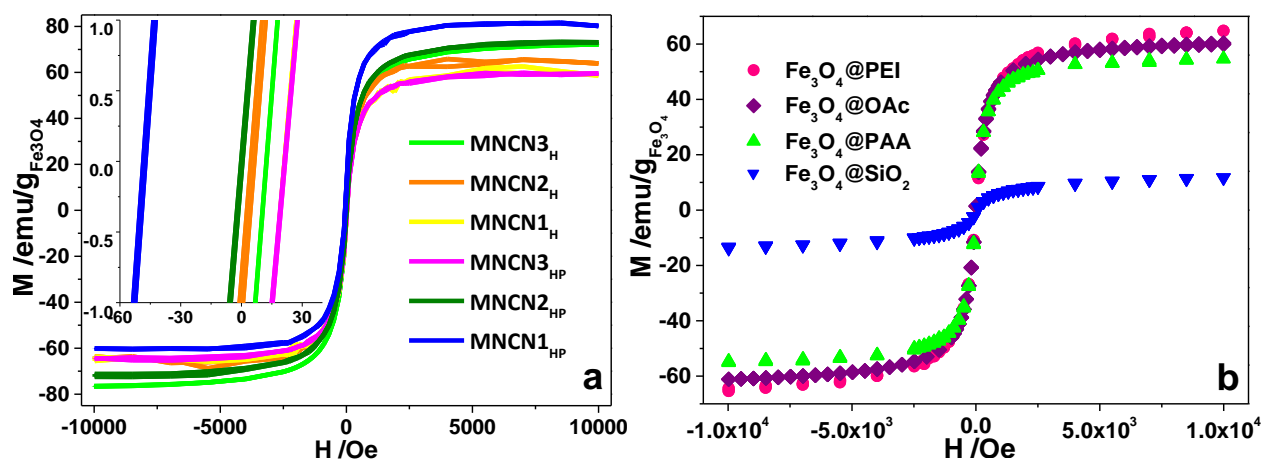


Figura 6.52. Ciclos de magnetización (a) de los NCs magnéticos SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 funcionalizados con grupos amino, hasta 10 kOe y (b) de las NPs magnéticas Fe_3O_4 @PEI, Fe_3O_4 @PAA, Fe_3O_4 @OA y Fe_3O_4 @ SiO_2 .

En la figura 6.52 (b) se presentan las curvas de magnetización de las NPs de magnetita funcionalizadas con PAA, PEI, ácido oleico y recubiertas por una capa de SiO_2 amorfo de 6.8 ± 1.3 nm de espesor (NPs mono core-shell), con la finalidad de comparar el comportamiento de las mismas una vez ancladas a las matrices ordenadas de sílice mesoporosa. Las NPs funcionalizadas con PEI y PAA sintetizadas por coprecipitación presentan una M_s entre 60-70 $\text{emu/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$; sin embargo, cuando éstas son sintetizadas en el interior de los canales del SBA-15 (NCs SBA-15/ Fe_3O_4 @PAA_PEI), la M_s cae hasta 7-17 $\text{emu/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$, valores que resultan ser muy parecidos a la M_s de las NPs Fe_3O_4 @ SiO_2 alrededor de 13 $\text{emu/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$, lo que implica que la SiO_2 juega un papel primordial en el apantallamiento de la respuesta magnética. Por otra parte, resulta muy interesante que los NCs SBA-15/ Fe_3O_4 @ SiO_2 y SBA-15@glicerol/ Fe_3O_4 @ SiO_2 funcionalizados con grupos amino, en los cuales la magnetita se encuentra anclada en la superficie exterior de las cerámicas mesoporosas mediante una capa imperceptible de SiO_2 amorfa, presentan magnetizaciones de saturación entre 60-90 $\text{emu/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$, mayores a la M_s de las NPs precursoras (Fe_3O_4 @OA) y en algunos casos cercanos a los valores de la magnetita masiva ya reportada. Aún cuando poseen también una capa de SiO_2 como las NPs mono core-shell su respuesta magnética no se ve afectada de la misma forma siendo que se encuentran rodeadas por una mayor cantidad de material inorgánico no magnético. De allí se concluye que el lugar de anclaje de las NPs de magnetita a los nanosistemas de SBA-15 determina en gran forma u respuesta magnética y sus propiedades fisicoquímicas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.1. ANDAMIOS 3D

El desarrollo de una nueva generación de *andamios 3D* (cerámica-polímero) que asemeje las características de los huesos, fue posible mediante el diseño de un método de preparación que permita de forma simultánea moldear fácilmente el *andamio* y generar una microestructura adecuada que favorezca la colonización, adhesión, crecimiento celular y la angiogénesis, como se describe brevemente en el esquema de la figura 7.1.

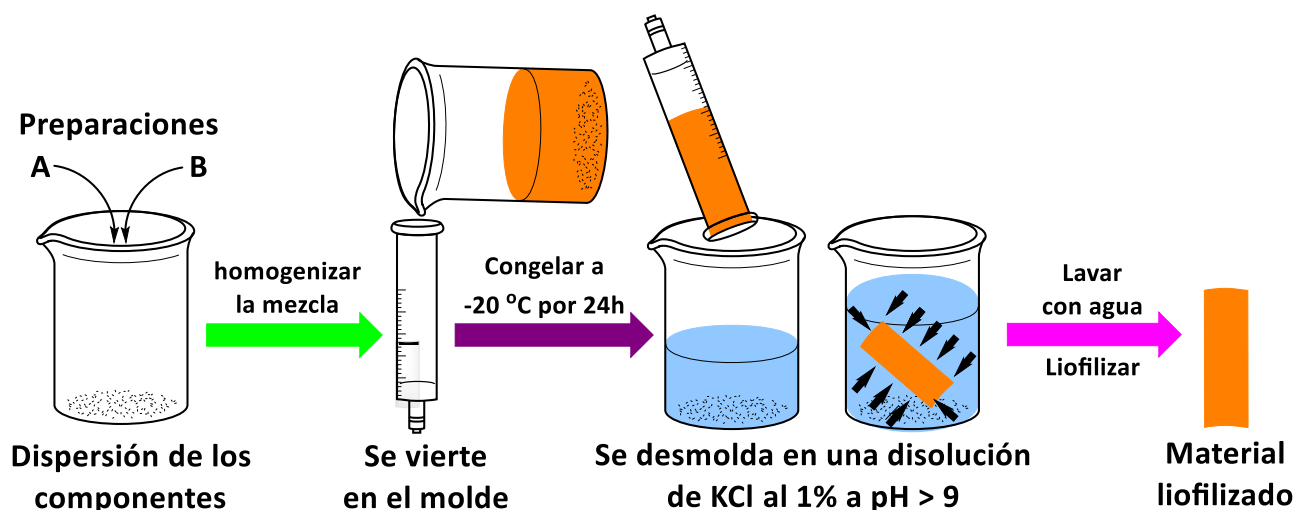


Figura 7.1. Esquema de preparación de los *andamios*

Como base polimérica elegida para la elaboración de estos sistemas se utilizaron simultáneamente dos polisacáridos naturales con distintas propiedades: por un lado, y como constituyente principal una poliamina lineal, figura 7.2 (a), de alto peso molecular con grupos amino e hidroxilo reactivos, que se comporta como un polielectrolito catiónico y por debajo de pH 6.5 presenta una alta densidad de carga, lo cual le permite adherirse fácilmente a las superficies negativamente cargadas y formar quelatos con iones metálicos^{164, 165}; y por otro, un segundo polisacárido capaz de formar en agua, geles elásticos de alta fuerza que a la vez aporta moderada viscosidad al material, presentando un alto poder de

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

gelificación, su uso en bajas dosis permite lograr la textura deseada del gel; a su vez, es un polímero lineal conformado de moléculas alternadas de D-galactosa y 3,6 anhidrogalactosa, unidas por enlaces α -1,3 y β -1,4, figura 7.2 (b), estas moléculas de galactosa poseen grupos sulfato encontrándose generalmente como sales de sodio, potasio o calcio, que han demostrado tener propiedades osteogénicas favoreciendo la adhesión y crecimiento de las células óseas¹⁶⁶. El contenido de éster sulfato se encuentra entre 24-25 %, y el de 3,6 anhidro galactosa entre 35-40 %. Para su completa disolución necesita una temperatura de 70-75°C¹⁶⁷.

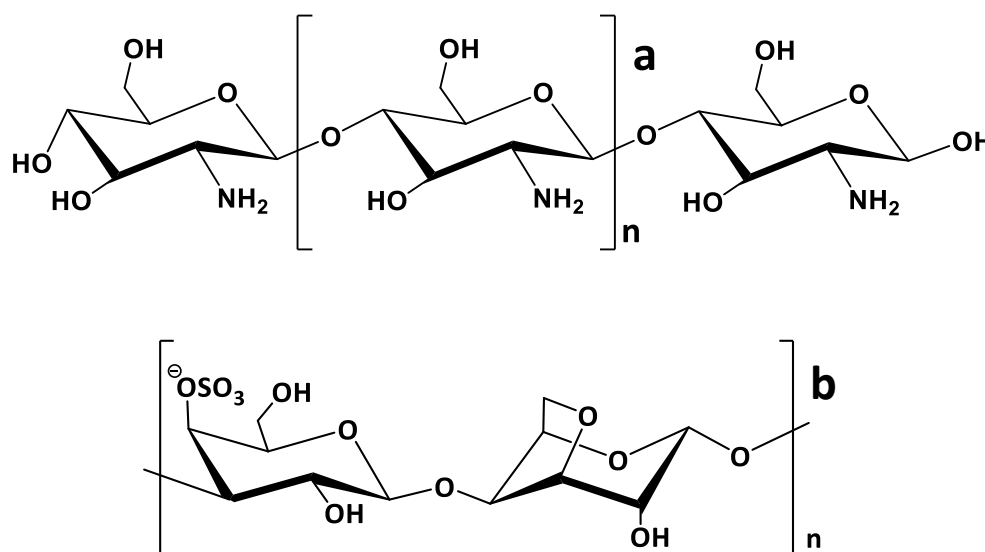


Figura 7.2. Fórmula química (a) quitosano; (b) Kappa carragenato

La dispersión inicial de los dos componentes permitió realizar una gelificación iónica rápida mediada por los iones Ca²⁺ del carragenato, brindando resistencia y capacidad de moldeo a los *andamios*, la posterior adición del reticulante 1,4- butanodiol-diglicidiléter (BDDE) a la mezcla homogénea, propició el entrecruzamiento de los grupos amino e hidroxilo del quitosano dando lugar a la formación de aminas secundarias o éteres, lo que aumentó las propiedades mecánicas de los mismos proporcionándoles dureza y elasticidad, y a su vez aportándoles mayor resistencia a la degradación. El BDDE, también es capaz de reaccionar químicamente con los grupos funcionales hidroxilo del carragenato, figura 7.3. Al introducir el cilindro congelado a la solución básica de KCl, se produjo la gelificación iónica del k-carragenato y el quitosano, lo cual ayudó a preservar la forma cilíndrica de los *andamios* una vez fuera del molde evitando su contracción.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

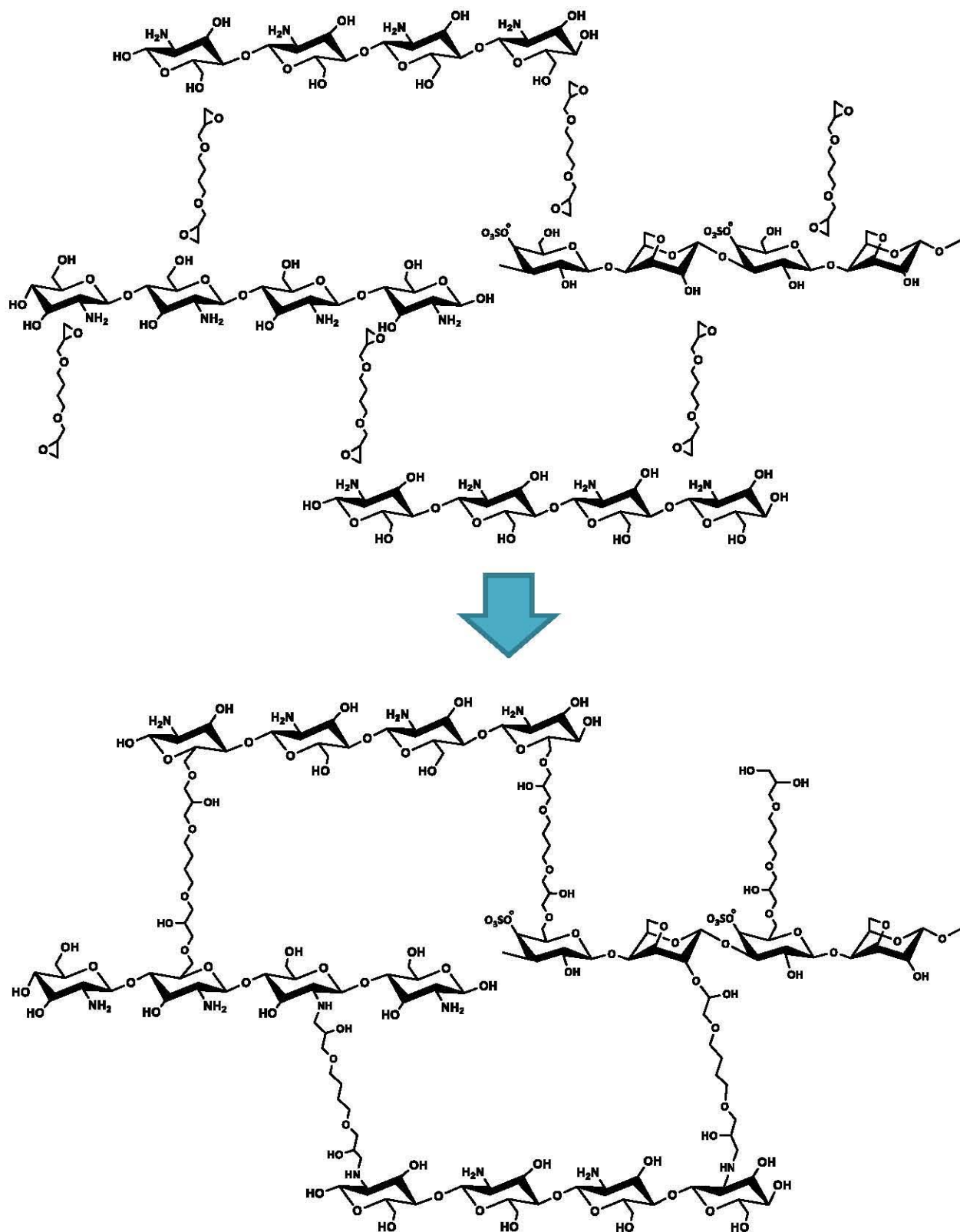


Figura 7.3. Esquema de reacción del entrecruzamiento entre las cadenas de quitosano y el K-carragenato en presencia de BDDE¹⁶⁸.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

La incorporación de la cerámica mesoporosa o del nanocomposite magnético a la mezcla polimérica, brindó propiedades únicas que sólo están presentes en estos materiales. Actuando como el componente mineral del biomaterial, proporcionando cohesión y una mayor resistencia mecánica, necesarias para un buen andamiaje celular¹⁷. Cabe resaltar que los *andamios* adquieren el mismo color que su componente cerámico, lo cual implica, que los nanocomposites magnéticos no sufren alteración tras los procedimientos químicos y mecánicos que se requieren para la elaboración de los mismos, figura 7.4. De esta forma se corrobora que las NPs de magnetita están ancladas covalentemente a la superficie de la sílice mesoporosa, aseveración que se confirma claramente durante el proceso de liberación controlada, donde la solución de PBS/simvastatina se mantuvo incolora a lo largo de la cinética. Las implicaciones biológicas debidas a el carácter magnético de las NPs de magnetita pueden ser grandes, entre las que destacan tanto la estimulación magnética que favorece la adhesión y proliferación celular, como el seguimiento del implante por MRI durante el proceso de regeneración ósea⁸¹. Cabe destacar que en algunos andamios a pesar del alto porcentaje de componente polimérico y del complejo proceso de síntesis, se observa respuesta al imán, principalmente en aquellos andamios elaborados con los NCs que presentan el anclaje de las NPs en la superficie exterior.

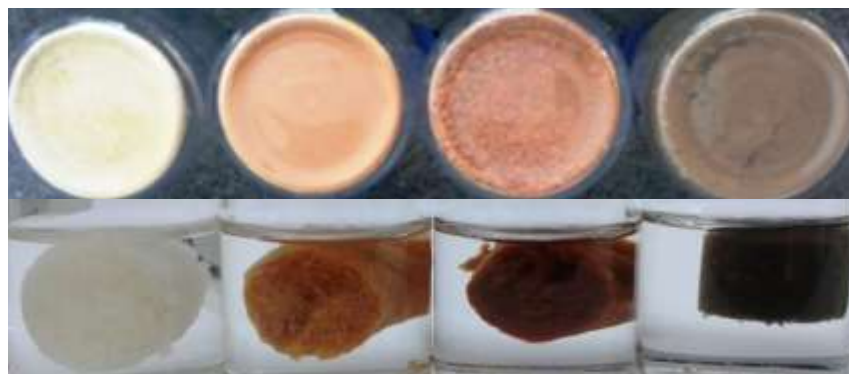


Figura 7.4. *Andamios* presentan el mismo color que las cerámicas mesoporosas o nanocomposites magnéticos con los que se elaboraron.

7.1.1. Microscopía electrónica de barrido

Para conocer mejor las propiedades de estos sistemas fue necesario estudiar su microestructura y morfología mediante microscopía electrónica de barrido (utilizando electrones secundarios y operando a 5 kV). De la figura 7.5 a la 7.12 se muestran las imágenes a diferentes aumentos de los distintos *andamios*. Es claramente evidente que todos poseen estructuras muy porosas con morfología en forma

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

de celdillas o láminas¹⁶⁹. Los poros se encuentran ubicados a lo largo del material de forma aleatoria, y presentan distribuciones de tamaño de poro muy variables. Cabe mencionar que cuentan con las tres clases de poros descritas por la IUPAC (microporos, mesoporos y macroporos), cada una tan importante como la otra, desempeñando un papel fundamental en las aplicaciones de estos sistemas; por un lado, los macroporos proporcionan a las células un lugar adecuado para su anclaje, mientras que los mesoporos sirven de almacenaje para diversas sustancias de interés biológico que posteriormente serán liberadas de forma controlada, así mismo brindan una superficie reactiva donde se puedan llevar a cabo diversas reacciones bioquímicas, mientras que los microporos interconectan el sistema de canales de los mesoporos. En las imágenes de mayor ampliación de la figura 7.5, se observan los cristales de hidroxiapatita en forma de granos de arroz, material que predomina en la superficie.

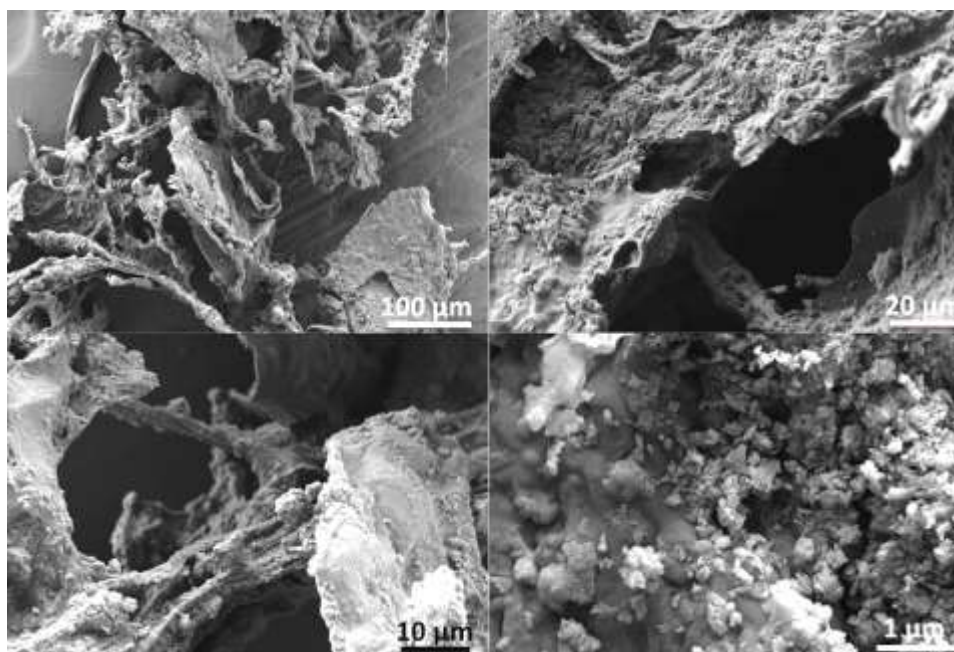


Figura 7.5. Andamio elaborado a partir de S15_{HP} con HA (Sc1).

La presencia de las matrices mesoporosas es más evidente en las micrográficas de las figuras 7.6 y 7.7, a pesar de contener un 50 % de HA como componente mineral. La morfología de estos materiales en forma de filamentos facilita su anclaje a la superficie polimérica, la cual actúa como adhesivo. A partir de las micrográficas a mayor escala de la figura 7.7, se aprecia la estabilidad de las nanopartículas enlazadas covalentemente a la superficie de la sílice mesoporosa, manteniéndose el nanocomposite prácticamente intacto a pesar de todos los procesos a los que fue sometido para la elaboración del *andamio*. Es de suma importancia puntualizar que la presencia de estos sistemas mesoporosos modifica completamente

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

la topografía del material; ya que la matriz polimérica por sí sola presenta una superficie tendiendo a lisa, de esta forma, las zonas donde se hayan estos sistemas se observan totalmente rugosas, proveyendo infinitos puntos de anclaje para las células.

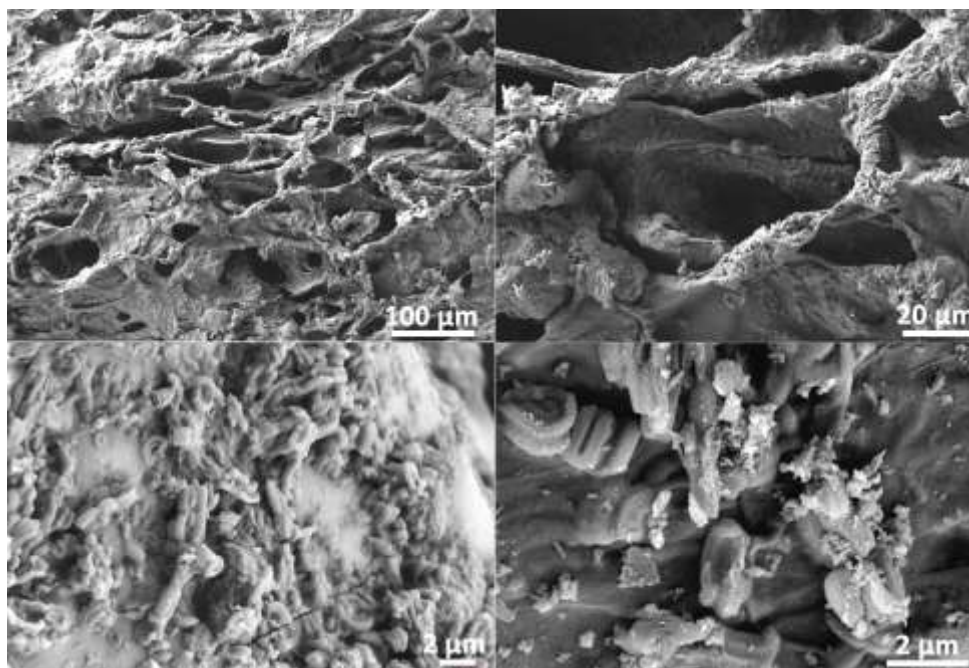


Figura 7.6. Andamio elaborado a partir de LMNC_{HP} con HA (Sc2).

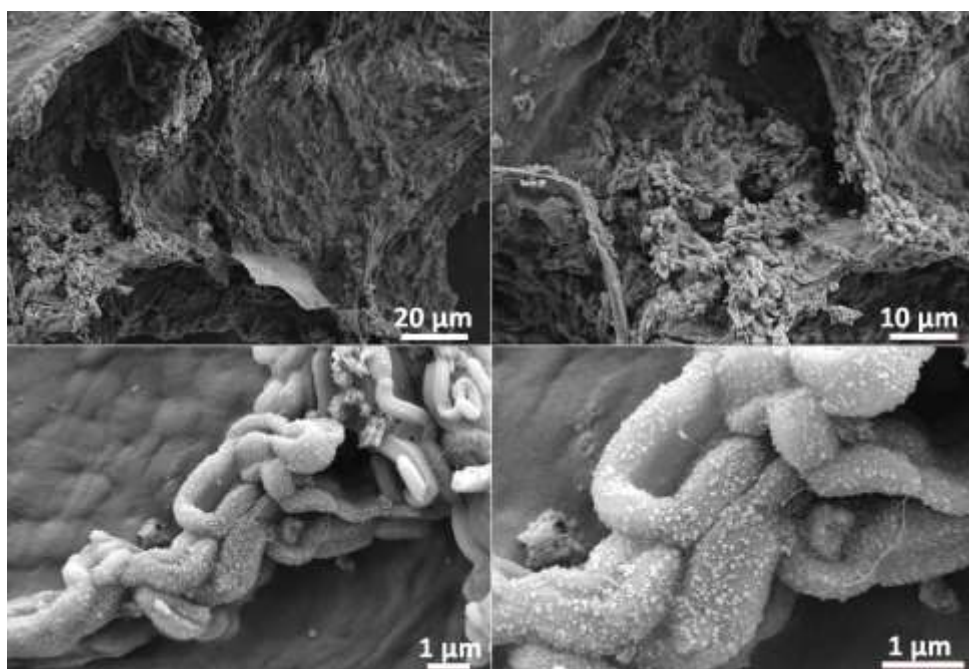


Figura 7.7. Andamio elaborado a partir de MANC_{HP} con HA (Sc3).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Para los materiales donde el 100% de la materia inorgánica está constituida por la cerámica mesoporosa o el nanocomposite, las superficies son aún más rugosas que en los casos anteriores, con una mayor cantidad de poros, por ende una mayor área superficial (figuras 7.8-7.12). El material se encuentra distribuido aleatoriamente en toda la superficie de la matriz polimérica.

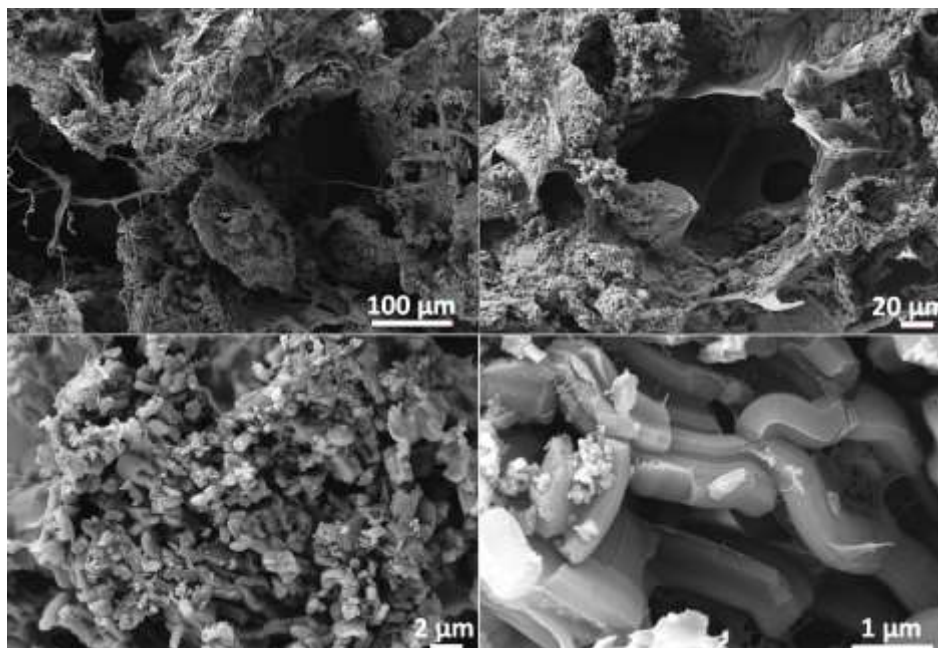


Figura 7.8. Andamio elaborado a partir de S15_H (Sc4).

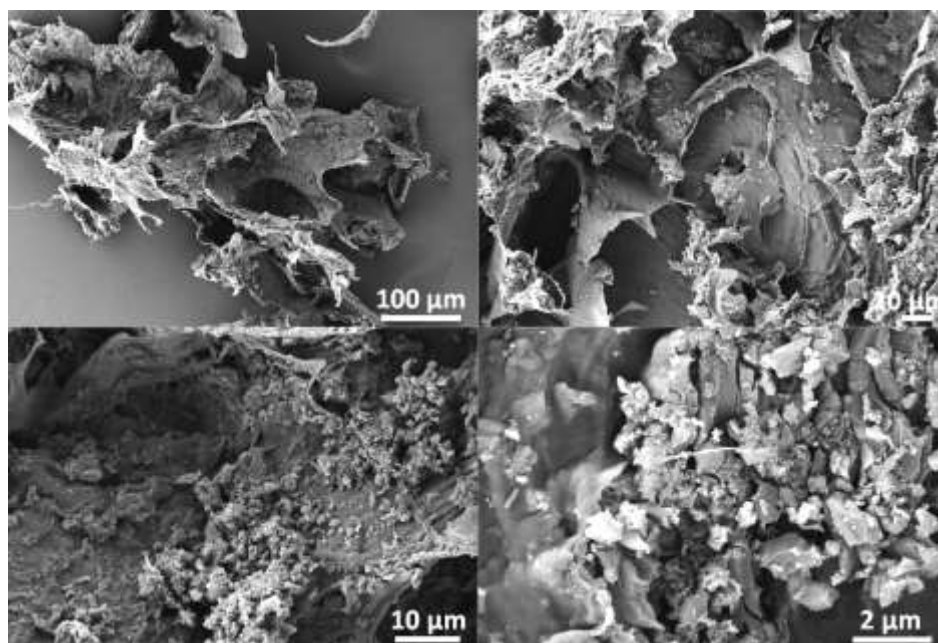


Figura 7.9. Andamio elaborado a partir de NCPEI_H (Sc5).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

En la micrografía a 200 nm de la figura 7.10, se observa que gran parte del material inorgánico quedó embebido en la matriz polimérica durante el proceso de elaboración del *andamio*, lo que bloqueó parcialmente el acceso al sistema de canales de poros, disminuyendo así, el área superficial disponible para cargar con fármaco. Esto no necesariamente representa un problema, ya que podría cargarse previamente el material SBA-15 con algún fármaco o agente biológico que quisiera liberarse en una fase más avanzada del proceso de regeneración ósea, para que aquella parte que quede embebida en la matriz polimérica, sea liberada una vez que comience a degradarse ésta, al permitir el acceso a los poros bloqueados. La figura a 200 nm muestra una imagen clara del material atrapado parcialmente dentro de la capa polimérica, esto sucede en todos los casos.

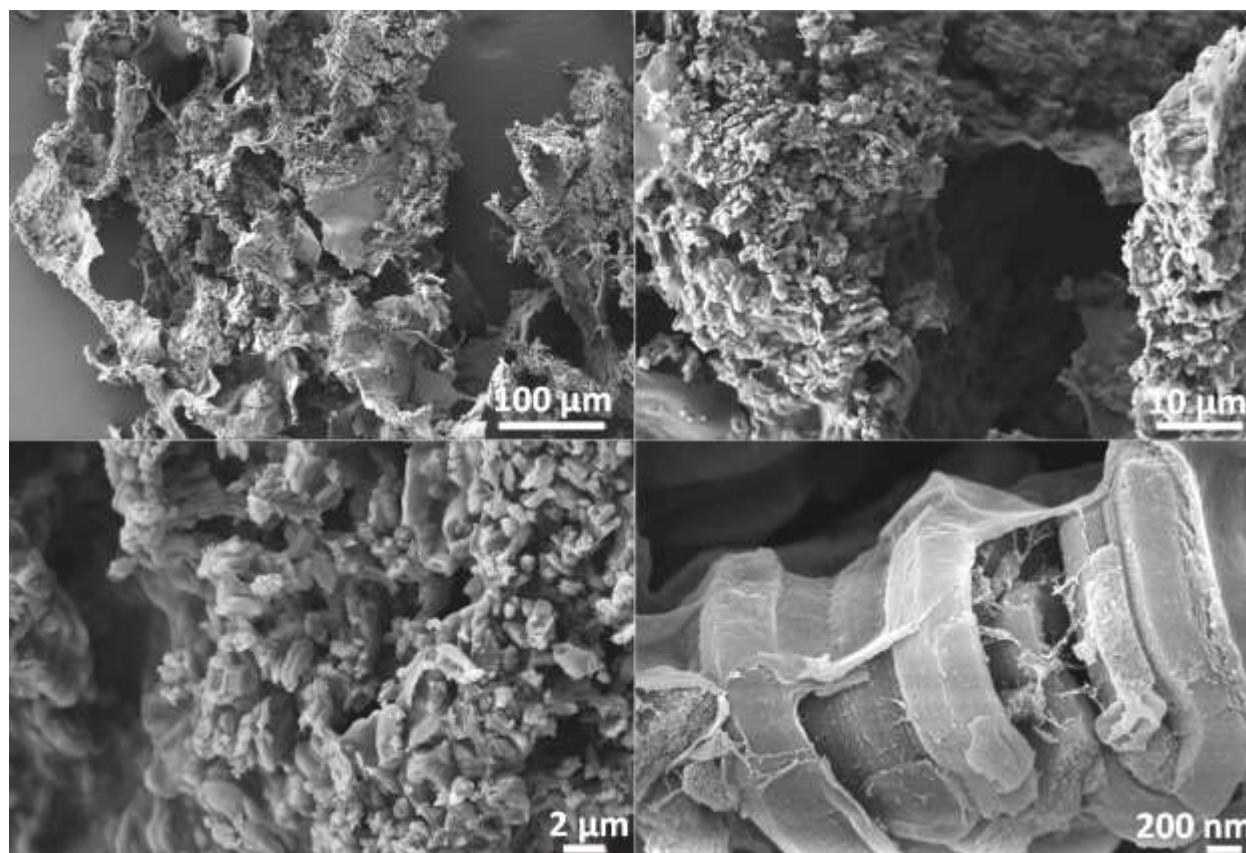


Figura 7.10. Andamio elaborado a partir de LMNC_H (Sc6).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

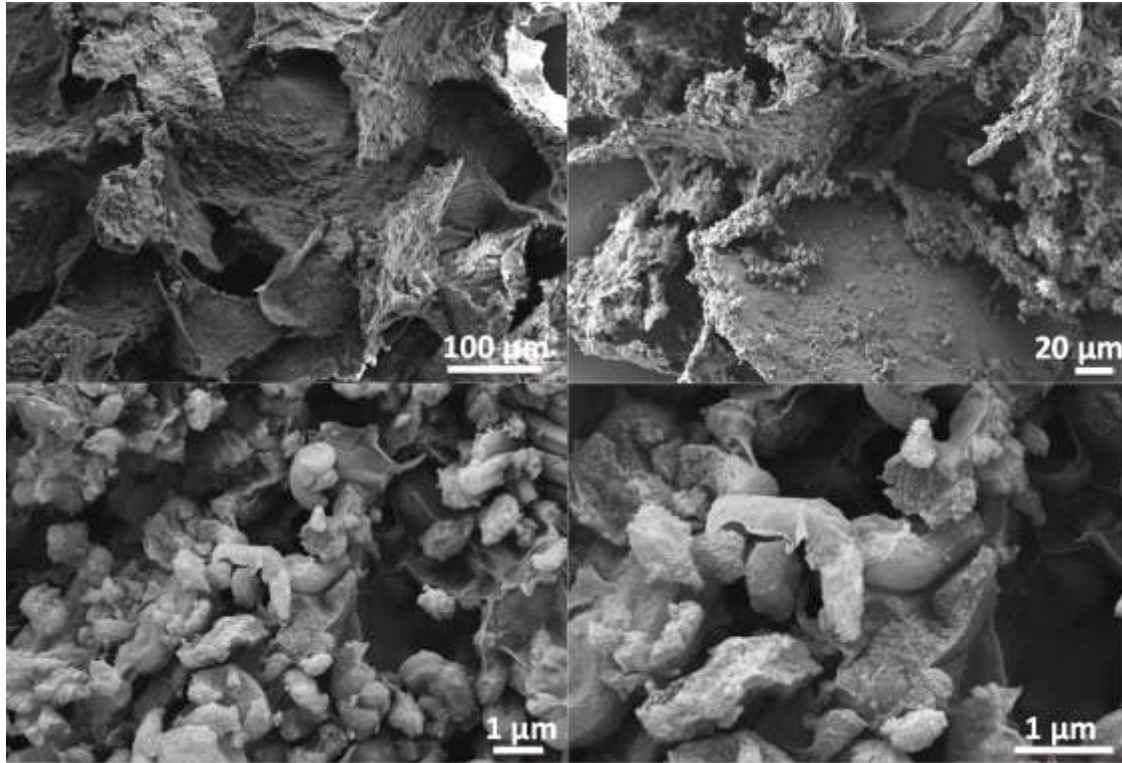


Figura 7.11. Andamio elaborado a partir de HMNC_{HP} (Sc7).

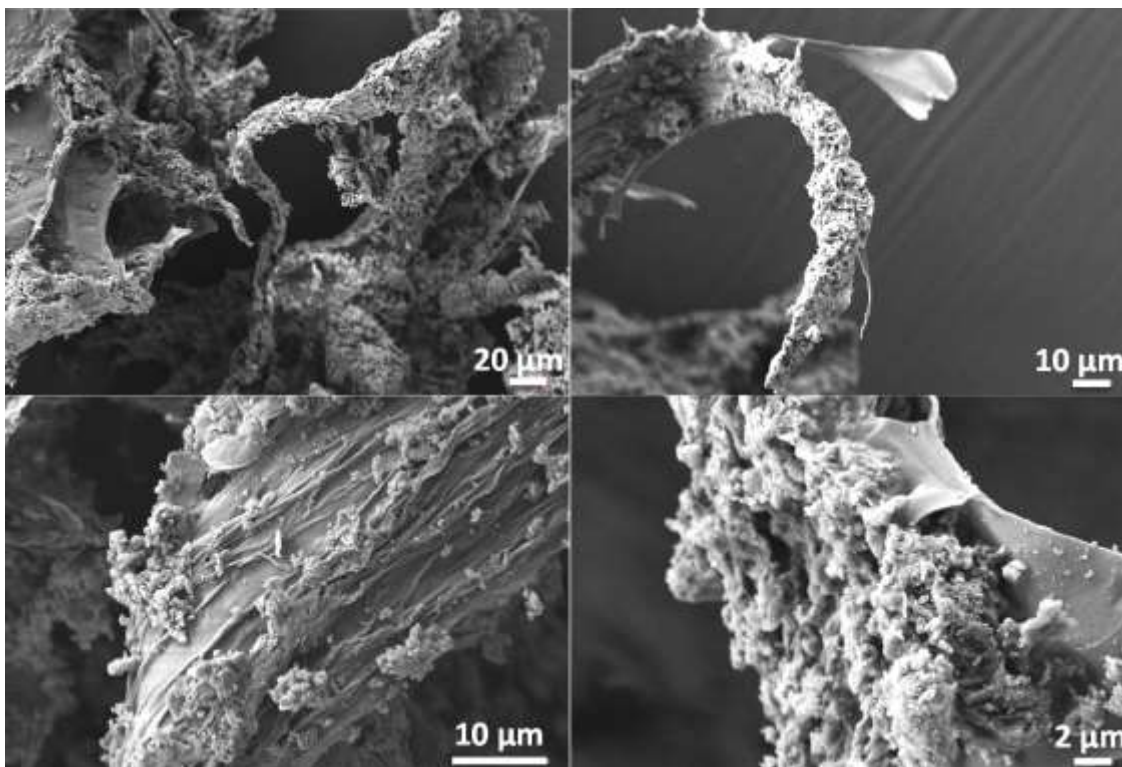


Figura 7.12. Andamio elaborado a partir de NCHPAA_{HP} (Sc7).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.1.2. Porosimetría de intrusión de mercurio y Adsorción de N₂

Para determinar las propiedades texturales de los *andamios*, se emplearon las técnicas de porosimetría de intrusión de mercurio (PIM) y adsorción de N₂. La porosidad, el área superficial, el volumen de poro y la distribución de tamaños de poros son claves para una adecuada colonización por parte de las células¹⁷⁰, las cuales llevarán a cabo el proceso de mineralización dando lugar a la formación de hueso nuevo. Una porosidad elevada aumenta la osteoconductividad, pero una porosidad excesiva en algunos casos debilita la resistencia mecánica del material. Sin embargo, la presencia de las cerámicas mesoporosas tipo SBA-15 o los nanocomposites SBA-15/Fe₃O₄ en la formulación de los *andamios*, les provee estabilidad y una mayor resistencia mecánica, aún cuando son estructuras tridimensionales extremadamente porosas. Mediante PIM fue posible conocer la distribución de la porosidad (macroporos) en función del tamaño aparente de acceso a los poros, figura 7.13. Los macroporos de 50 a 500 micras permiten un medio óptimo para la vascularización y migración de osteoblastos y osteoclastos, además los macroporos deben estar conectados entre sí para permitir la formación de tejido óseo en todo el implante. Por su parte los mesoporos y microporos, que se definen por su tamaño inferior a 50 nm y 2 nm, respectivamente, permiten la circulación de líquidos orgánicos, acelerando el proceso de remodelación ósea. La presencia de los mismos conlleva a un aumento del área superficial, permitiéndole a los NCs actuar como matrices de soporte, carga y liberación controlada de sustancias químicas y biológicas necesarias para la regeneración ósea^{171, 172}. Por si fuera poco, la magnetita es capaz de promover este mismo proceso debido a sus propiedades magnéticas y su capacidad de producir calor, estimulando a las células a adherirse y proliferar^{75, 81}.

La gráfica de la distribución de tamaños de poro de la figura 7.13 (A), muestra un comportamiento similar entre los *andamios* elaborados, esto es, presentan tamaños de macroporo situados entre 0.1 y 200 μm. Comparando estos resultados con los obtenidos anteriormente por el grupo de trabajo del Dr. Francisco Otero Espinar de la Facultad de Farmacia de la USC, donde se elaboraron *andamios* a partir de diversas mezclas de polímeros con HA (datos no publicados), se observa una clara diferencia, ya que los elaborados con HA presentan macroporos en un rango de 70 a 200 μm, figura 7.13 (B), lo cual limita sus propiedades, ya que no posee macroporos de menor tamaño y más rigurosamente no presentan mesoporos, ni microporos. La distribución de tamaños obtenida es ideal para que las células puedan colonizar el material, aunado a la aparición de poros más pequeños que favorecen enormemente las

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

interacciones, el intercambio de sustancias, entre otras actividades que pudieran llevarse a cabo durante el proceso de regeneración ósea.

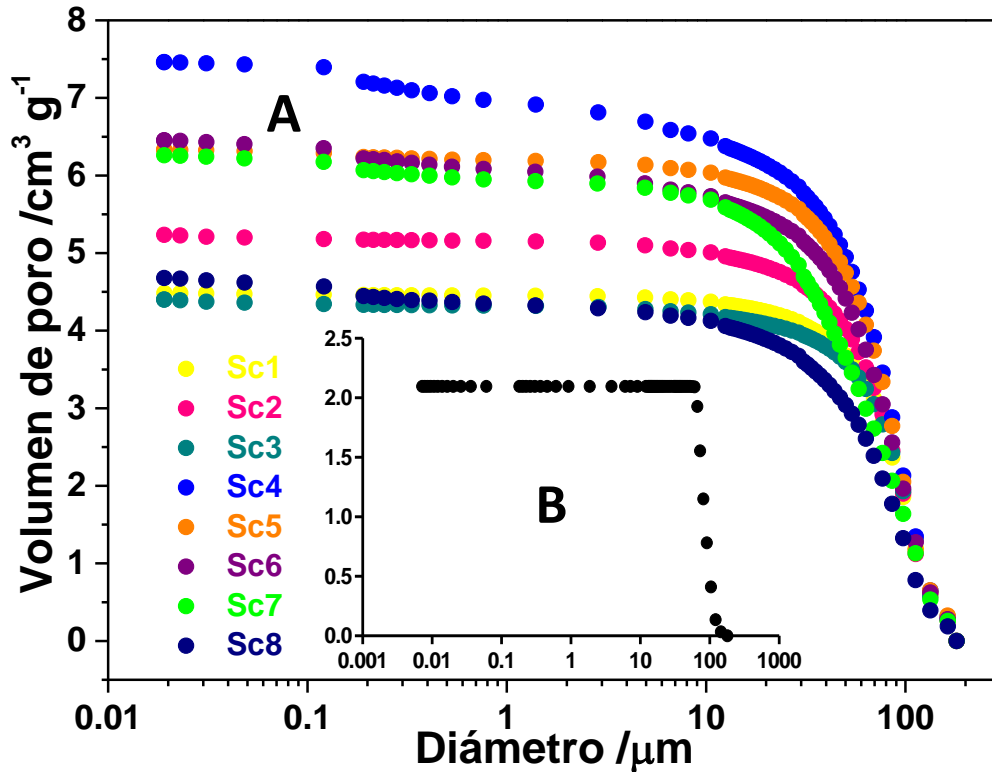


Figura 7.13. Distribuciones del tamaño de poro de los *andamios* obtenidas mediante PIM (A) elaborados a partir de las cerámicas mesoporosas o los nanocompuestos magnéticos y (B) elaborado con HA.

La existencia de los mesoporos se corroboró mediante la técnica de adsorción de nitrógeno (BET), donde se aprecian claramente las isothermas de adsorción tipo IV, características de los sistemas mesoporosos, figura 7.14. Aún cuando un gran porcentaje en peso de los materiales está compuesto por polisacáridos, se observa la presencia de dos ciclos de histéresis distintos, los materiales Sc4 y Sc7 poseen el tipo H1, mientras que para el resto de los biomateriales presentan una combinación de los tipos H1 y H2. El tipo H1 indica ramas de adsorción y desorción que muestran la existencia de mesoporos de geometría cilíndrica abiertos por ambos lados, mientras que el H2 indica un sistema de mesoporos con un arreglo de poro más irregular. Las características texturales de los *andamios* se resumen en la tabla 7.1. La figura 7.15, muestra los diámetros de poro calculados por BJH de los *andamios*. En algunos casos se observan dos picos, el segundo debido a los macroporos en las estructuras 3D. Los picos principales representan el tamaño promedio de los mesoporos, conservando distribuciones estrechas típicas de los materiales mesoporosos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

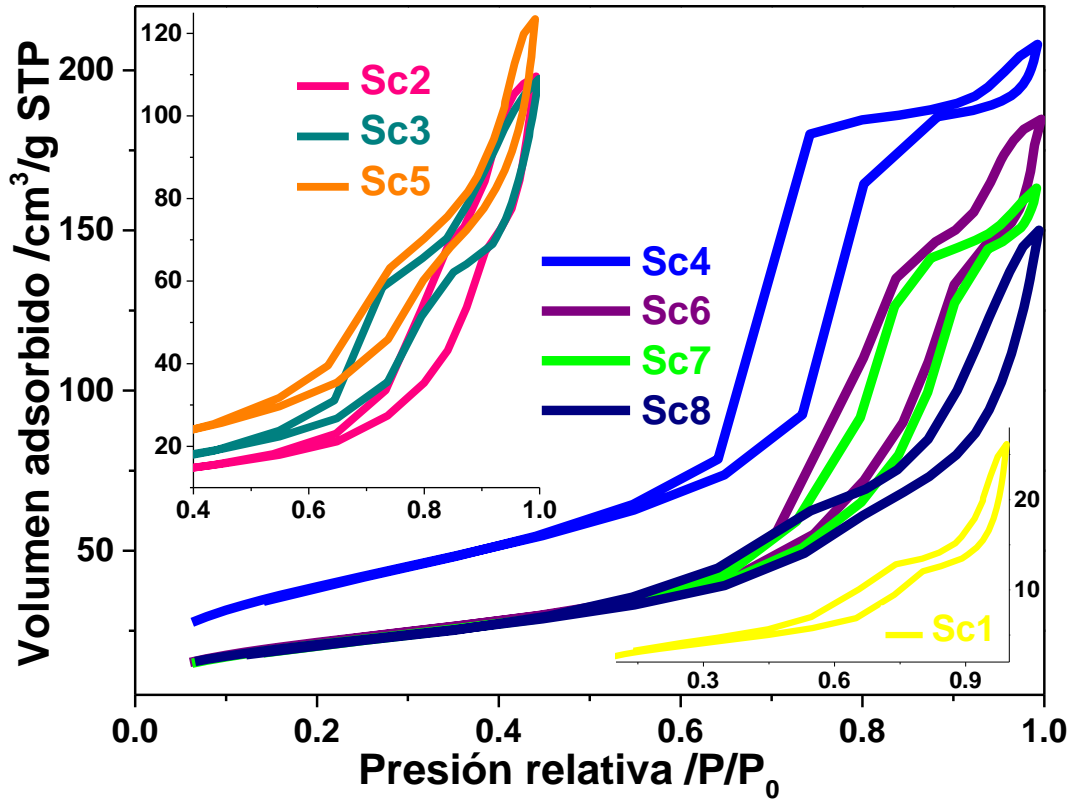


Figura 7.14. Isotermas de adsorción de los andamios elaborados a partir de las cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15 y de los nanocompuestos magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄).

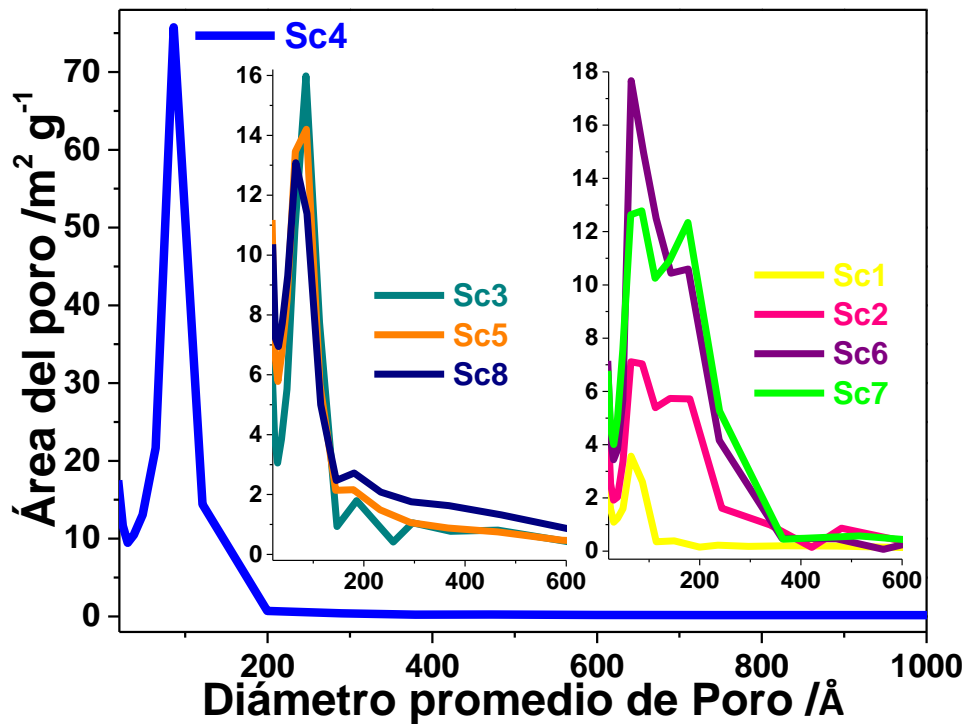


Figura 7.15. Distribución del tamaño de poro de los de los andamios elaborados a partir de las cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15 y de los nanocompuestos magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tabla 7.1. Valores texturales de los andamios elaborados a partir de las cerámicas mesoporosas ordenadas tipo SBA-15 y de los nanocomposites magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄).

Muestra	S _{BET} (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)	D _{B_{JH}} (nm)
Sc1	13.6018	0.034654	10.1911
Sc2	42.6822	0.156314	14.6491
Sc3	51.8466	0.149369	11.5239
Sc4	145.6743	0.308025	8.4579
Sc5	68.7288	0.172506	10.0398
Sc6	80.1002	0.260567	13.0121
Sc7	77.3303	0.240253	12.4274
Sc8	76.7574	0.208542	10.8676

Para realizar un estudio detallado de las estructuras de los *andamios*, se empleó el programa PoreCor que analiza la información sobre la porosidad obtenida mediante PIM. El software provee modelos con características de percolación similares a los materiales analizados. De esta forma se consiguen estructuras cúbicas formadas por poros e interconexiones. La tabla 7.2 resume las características calculadas a partir de este software, por un lado, el porcentaje de porosidad es una medida directa de la cantidad de poros que posee el material; la conectividad hace referencia al número de canales que desembocan en una dada cavidad del medio; el nivel de correlación determina el grado de orden o desorden estructural del material; mientras que la permeabilidad es la capacidad que tiene un material de permitirle a un flujo que lo atraviese sin alterar su estructura interna; por su parte la tortuosidad está definida como la razón entre la longitud real que debe recorrer una partícula de fluido para unir dos puntos en el seno del medio poroso y la distancia en línea recta entre dichos puntos. Algunas propiedades se esquematizan en la figura 7.16.

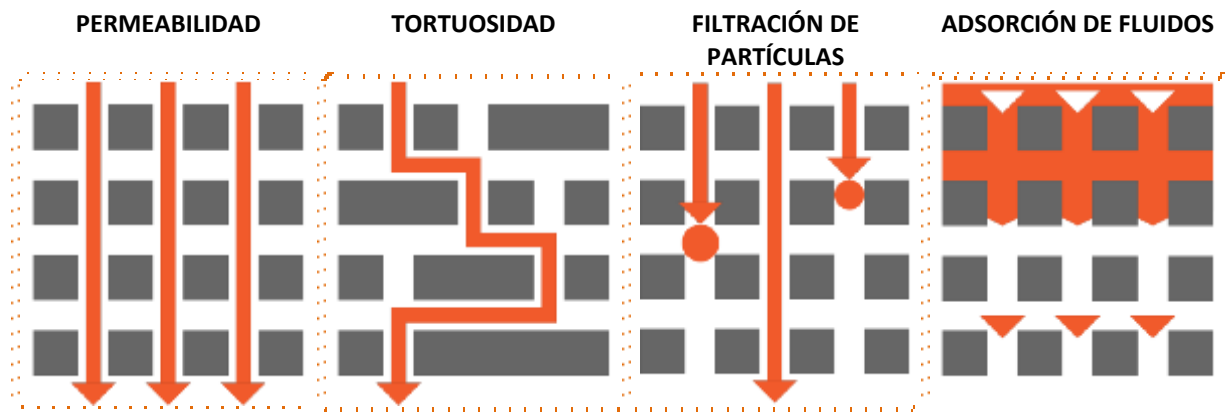


Figura 7.16. Propiedades calculadas y modeladas para los *andamios*, obtenidas a partir del software PoreCor.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tabla 7.2. Valores calculados con el software PoreCor a partir de los datos experimentales obtenidos por PIM, para determinar las propiedades de los andamios.

Muestra	Porosidad (%)	Conectividad	Nivel de correlación	Permeabilidad (mD)	Tortuosidad	Partículas retenidas	Adsorción de fluidos (% V)
Sc1	78.78	5.35	0.085	17626.29	1.2	12	72.88
Sc2	79.72	4.18	0.215	2962.52	1.3	15	62.29
Sc3	76.46	3.81	0.209	6487.20	1.4	5	64.75
Sc4	83.77	3.90	0.161	2332.03	1.4	5	50.12
Sc5	84.06	3.84	0.245	8539.52	1.6	3	67.92
Sc6	81.01	3.47	0.176	1882.39	1.6	17	56.81
Sc7	81.52	3.80	0.262	980.20	1.6	17	58.82
Sc8	78.96	5.82	0.166	3187.65	1.3	3	38.50

En todos los casos el porcentaje de porosidad es muy elevado, más aún en los materiales que sólo poseen la cerámica mesoporosa o el nanocomposite; por su parte, los niveles de correlación obtenidos para los modelos, indican la presencia de estructuras desordenadas, sin embargo, tienen cierto grado de orden, el cual viene dado por el componente inorgánico y la magnetita. Los valores de conectividad fueron elevados, lo que significa que hay muy buena comunicación entre las cavidades. Así mismo, los factores de tortuosidad son bajos debido a la elevada porosidad de los materiales que favorece la difusión efectiva. El estudio de permeabilidad se simuló en H₂O a 25°C y 1 atm, como era de esperarse el *andamio* con mayor permeabilidad fue el que contuvo el mayor porcentaje de HA, ya que las cerámicas o los NCs son más hidrófobos, a pesar de eso, la permeabilidad depende del tipo de NC con el que se hayan elaborado. Aquellos que contienen grupos amino o carboxilo en su superficie fueron más permeables, mientras que los recubiertos con sílice amorfa fueron los menos, esto es de gran importancia, ya que podrían diseñarse dispositivos a medida, según su aplicación y el tipo de moléculas que se pretendan almacenar. En general los modelos indican grandes poros interconectados, lo que en principio favorecería una buena osteoconductividad.

A continuación se exponen los modelos obtenidos por el software. La figura 7.18 (a) indica el grado de porosidad, donde los cubos representan los poros, y los cilindros las interconexiones; la 7.18 (b) muestra la retención de partículas, las cuales simulan el paso de las células óseas a través de los *andamios*, estudio que se realizó calculando la travesía de 100 partículas de carbonato de calcio en H₂O (25°C, 1 atm), para ejemplificar este comportamiento se muestra la gráfica del material Sc4, figura 7.17, donde se observa que la mayoría de las partículas en suspensión atraviesan con facilidad el sistema de canales irregulares, la retención de partículas aumenta conforme aumenta su tamaño de las mismas; de la tabla

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.2, se puede concluir que la movilidad de las células a través de los *andamios* varía entre un 97 % a un 83 %. Finalmente la figura 7.18 (c) muestra el porcentaje en volumen de H₂O que es absorbido en 0.01 s.

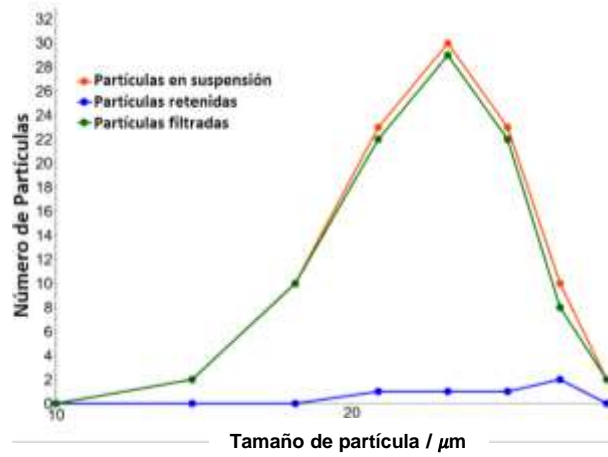
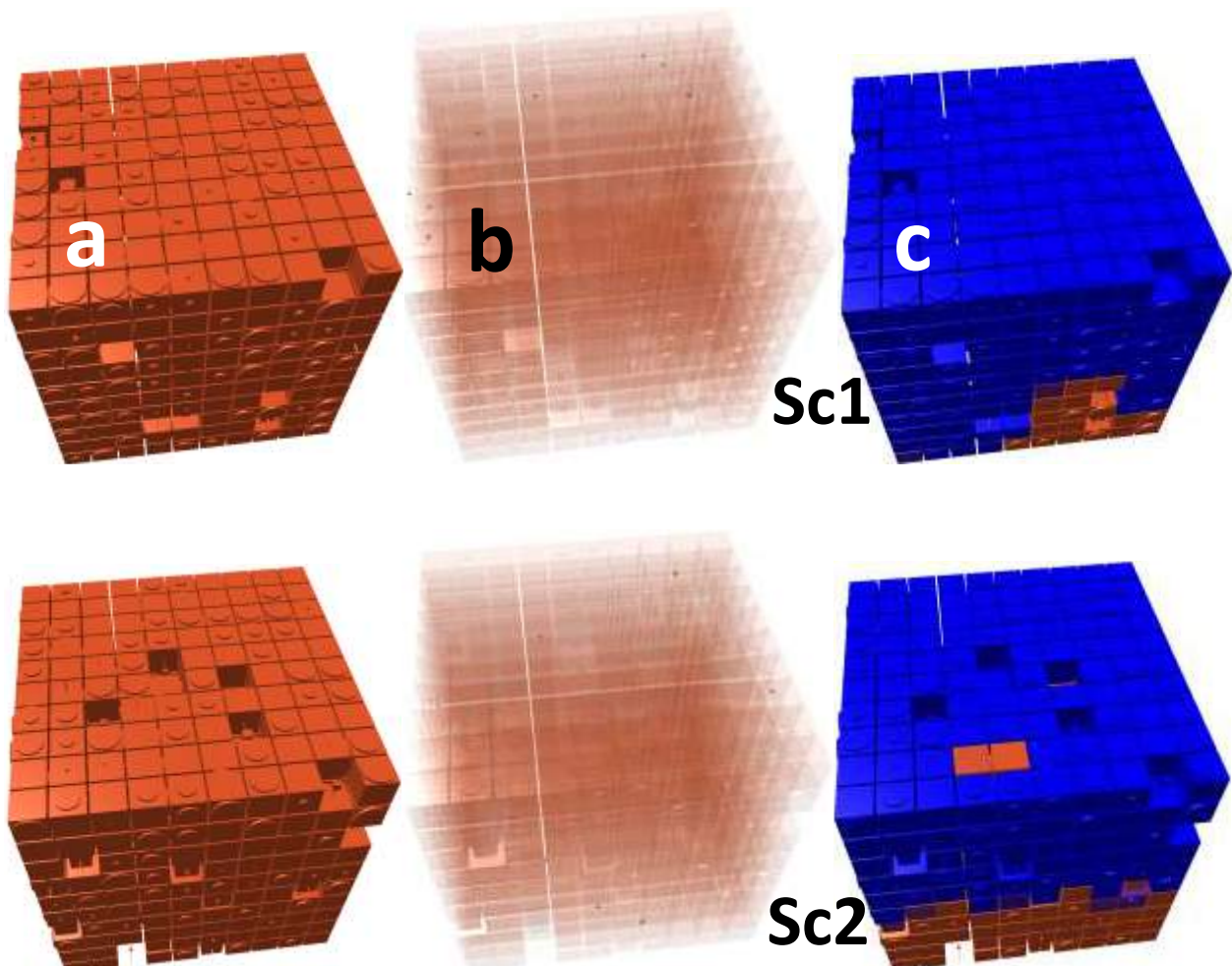
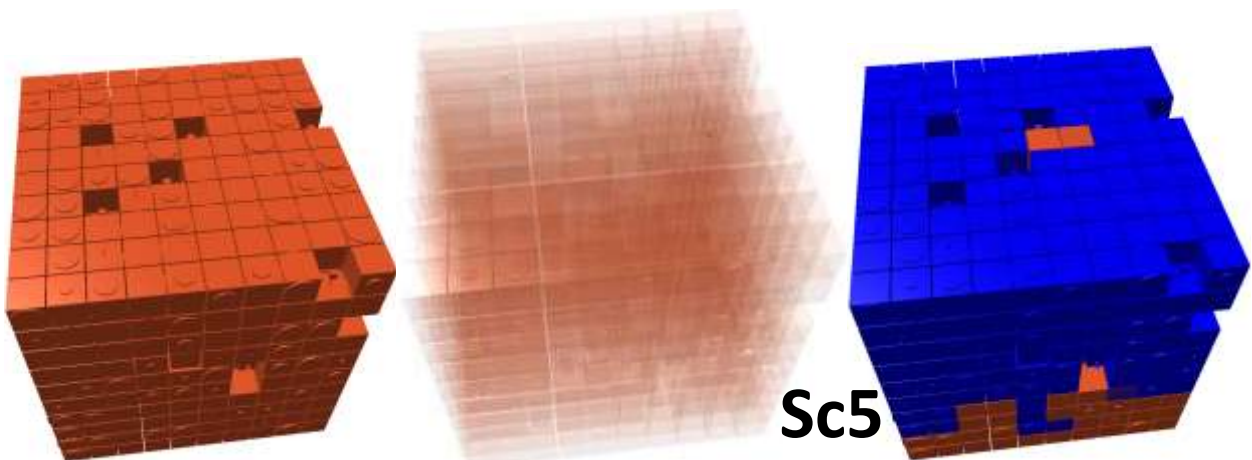
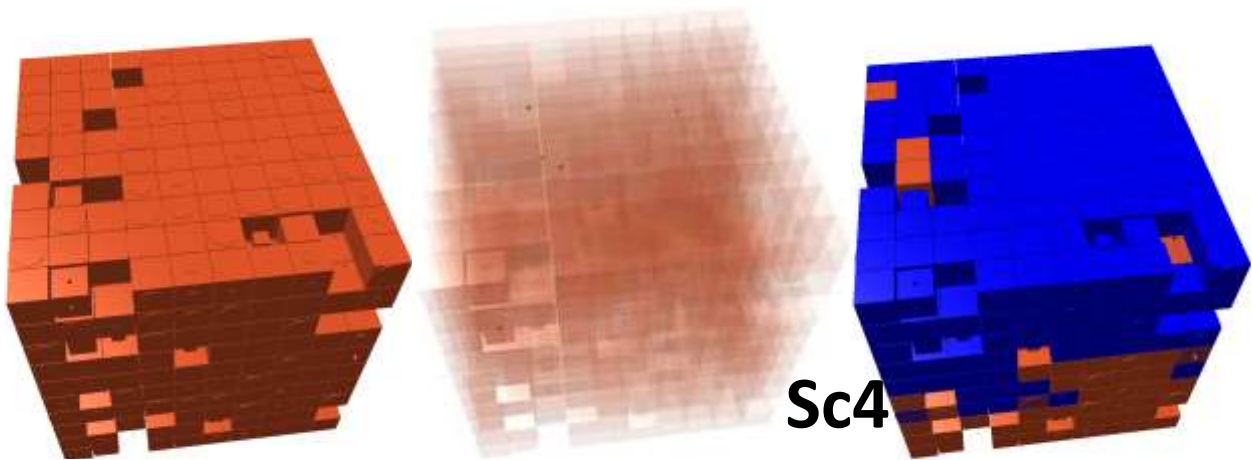
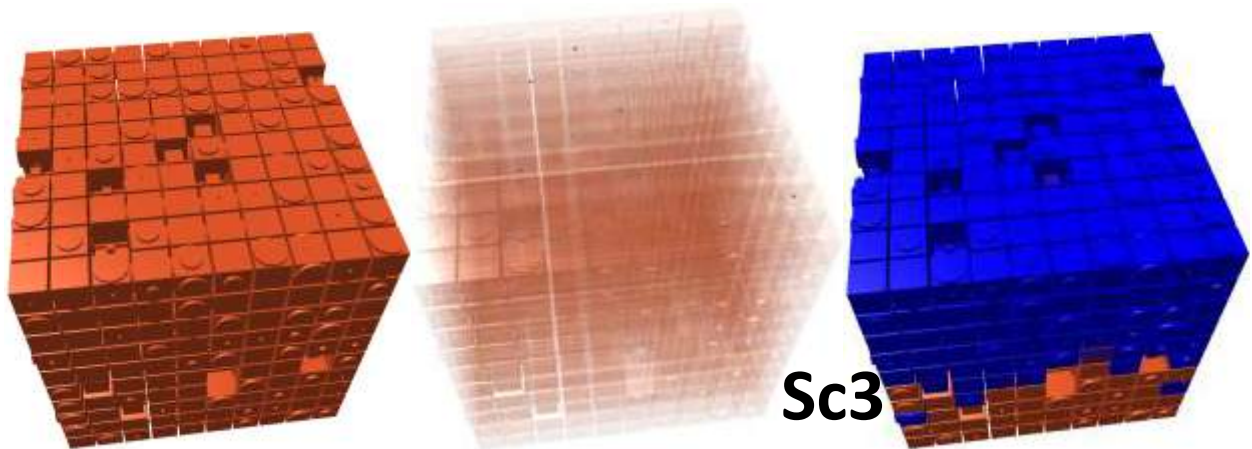
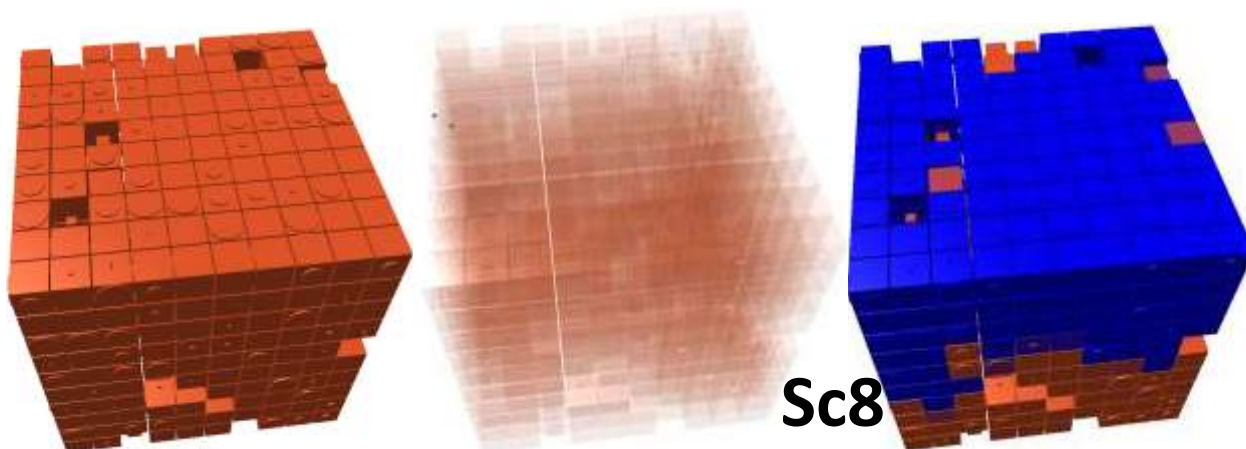
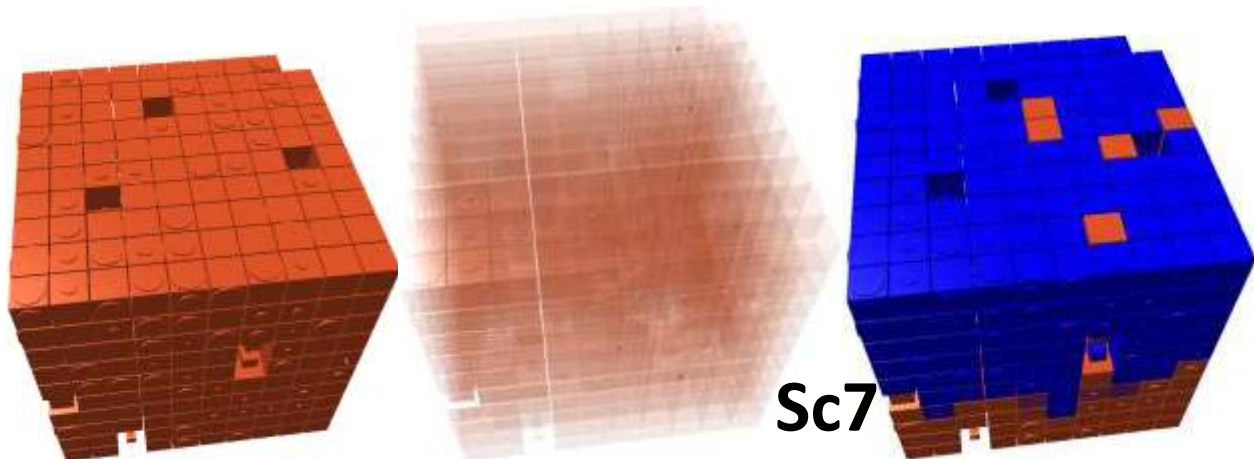
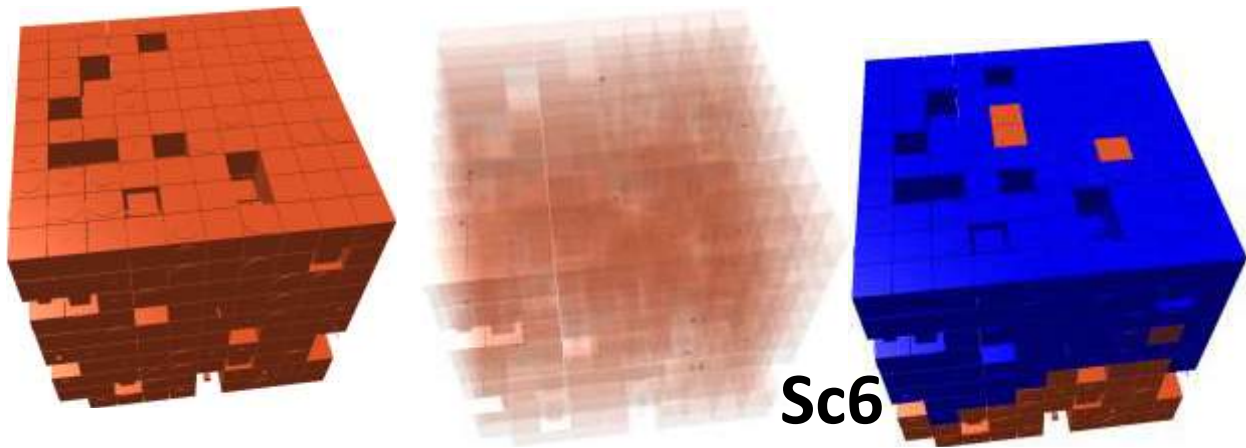


Figura 7.17. Distribución del tamaño de partículas que se filtran por el *andamio* Sc4.







7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

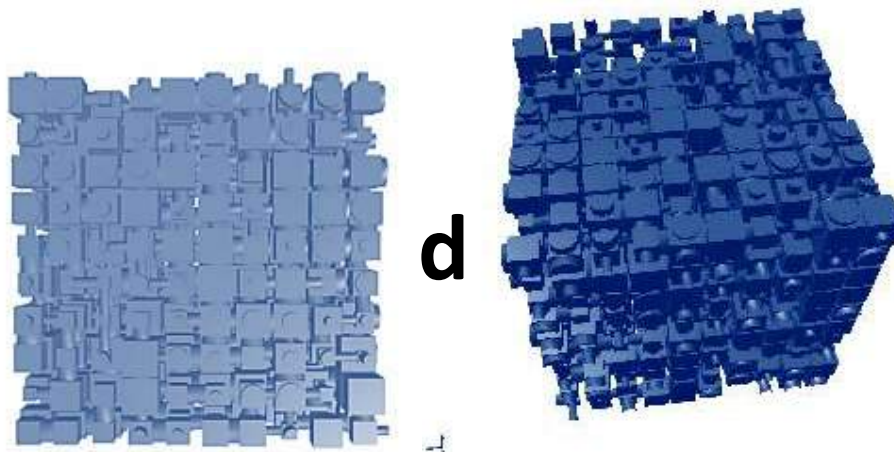


Figura 7.18. Modelos simulados con el software PoreCor a partir de los datos experimentales obtenidos por PIM de cada *andamio* (a) porosidad, (b) filtración de partículas, (c) adsorción de fluidos y (d) *Andamio* elaborado con HA en la Facultad de Farmacia, USC.

Si comparamos los modelos de la figura 7.18 (a) con el modelo del *andamio* elaborado en Facultad de Farmacia de la USC, que contiene como componente mineral HA, figura 7.18 (d), se observa una diferencia significativa en la cantidad de poros presentes en los materiales que contienen las cerámicas mesoporosas con respecto del *andamio* con HA. Los cubos simulados de los *andamios* desarrollados en esta tesis se observan casi completos, indicando que son sistemas altamente porosos, mientras que en el segundo caso los cubos están parcialmente completos, por lo que se tiene un material con una menor porosidad.

7.1.3. Ensayo de carga de simvastatina

Finalmente y con el objetivo de estudiar la capacidad de los *andamios* para liberar fármacos o moléculas de interés biológico durante su inserción en el hueso, se procedió a la carga y liberación de simvastatina. La simvastatina es un fármaco de la familia de las estatinas utilizado para disminuir los niveles de colesterol en sangre, figura 7.19. Su importancia es grande, dada la trascendencia del colesterol como factor de riesgo cardiovascular. Es un hipolipemiente muy empleado en la actualidad, se ha comprobado su efecto al reducir la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con dislipemia. Se le atribuye además efectos antiproliferativos o inmunomoduladores (prevención de injuria glomerular en enfermedades renales, efecto antineoplásico en enfermedades malignas como la leucemia, prevención de rechazo de transplantes). En lo relativo a la disminución del riesgo de osteoporosis, existe evidencia experimental de potenciales efectos osteogénicos de las estatinas sobre el hueso. Desde 1999 se ha

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

corroborado por Mundy y por otros autores que las estatinas en especial la simvastatina aumentan la síntesis de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) encargada de la formación de nuevo hueso, al estimular la proliferación, diferenciación y maduración de los osteoblastos. Recientemente se ha demostrado su participación en el aumento de la producción de osteocalcina, en el incremento de la masa ósea, y se ha descrito su efecto protector óseo, reduciendo el riesgo de fracturas¹⁷³. Por lo tanto se trata de un excelente candidato para su utilización en la terapia ósea regenerativa.

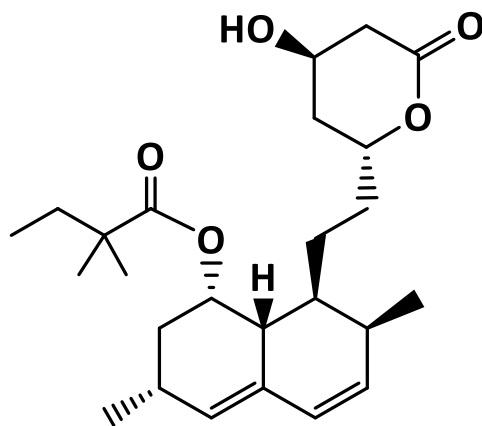


Figura 7.19. Fórmula química de la simvastatina.

El proceso de carga se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante la impregnación del *andamio* en una disolución con una concentración de 3 mg/mL de simvastatina en una mezcla 1:1 de agua-etanol durante 24h bajo agitación orbital a 180 rpm. En estas condiciones los *andamios* fueron capaces de adsorber apropiadamente la simvastatina.

Para determinar la cantidad cargada y liberada de simvastatina, se realizó una curva patrón por cuadruplicado para asegurar la veracidad de los valores, utilizando estándares de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16 y 0.2 mg/mL de simvastatina en una disolución de PBS a pH=7.4, medidas que fueron determinadas por espectrofotometría UV-Vis a 239 nm. Así se obtuvo una recta de calibrado de $Abs = 5.554[simvastatina]$ con un factor de regresión de 0.982, como se muestra en la figura 7.20. Para conocer el valor más exacto de carga, se procedió a la liberación de simvastatina hasta concluir a 100%. Los valores de carga se muestran en la Tabla 7.3.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

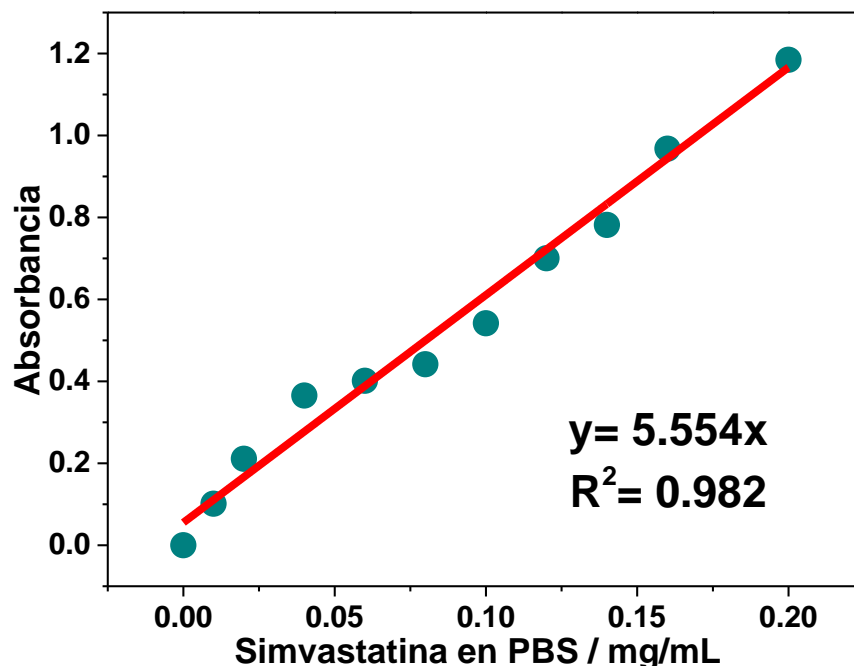


Figura 7.20. Curva patrón de simvastatina en PBS.

Tabla 7.3. Carga de simvastatina en los distintos *andamios* (mg simvastatina/g material).

Andamio	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7	Sc8
MMS/NC	S15 _{HP} HA	LMNC _{HP} HA	MANC _{HP} HA	S15 _H	NCPEI _H	LMNC _H	HMNC _{HP}	NCHPAA _{HP}
mg _{sim} /g _{mat}	159.04 ± 1.97	150.18 ± 1.36	175.29 ± 2.25	235.53 ± 2.78	148.20 ± 1.05	187.10 ± 2.67	212.02 ± 2.80	195.25 ± 1.85

Interesantemente para todos los *andamios*, la presencia de los materiales mesoporosos potencializó enormemente la capacidad de carga, adsorbiendo un alto porcentaje de simvastatina, particularmente en los casos de Sc4 y Sc7 donde prácticamente se adsorbió el 100% de la cantidad de simvastatina presente en la solución. Por su parte, los *andamios* elaborados con los nanocomposites obtenidos a partir de la matriz mesoporosa S15_{HP} (sintetizada con una mezcla de ácidos), muestran mejores propiedades de carga que los obtenidos a partir de S15_H, aún cuando algunos poseen mayor cantidad de magnetita (HMNC_{HP} y NCHPAA_{HP}), lo anterior se confirma para los *andamios* elaborados con una mezcla de S15_{HP}/HA en relación 1:2 o nanocomposite_{HP}/HA en relación 1:1, donde la capacidad de carga es bastante buena. Esto viene aunado a que los materiales HP ostentan mejores propiedades texturales que los H. En resumen, una mayor capacidad de carga en mg_{sim}/g_{mat}, tendrá lugar en materiales mesoporosos con mejores propiedades fisicoquímicas, estructurales y texturales. Por lo tanto son el componente determinante en la elaboración de los *andamios*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.1.3.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Analizando los espectros de infrarrojo antes y después de la carga del fármaco podemos corroborar la presencia de simvastatina debido a la aparición de nueva bandas, en la figura 7.21, se muestran los espectros de los *andamios* que mejor ejemplifican cada caso.

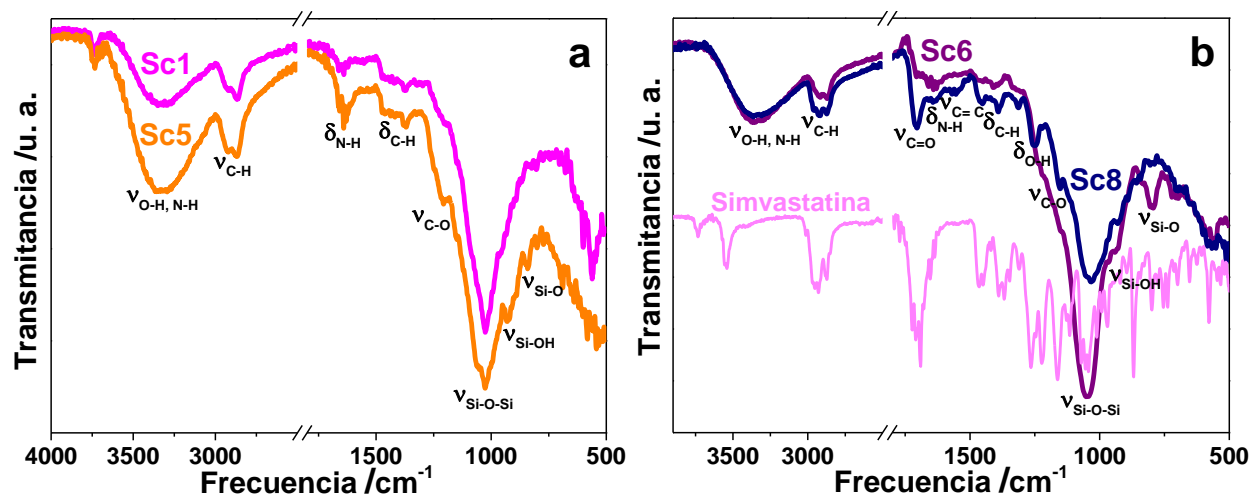


Figura 7.21. Espectros de IRTF de algunos *andamios* (a) antes y (b) después del ensayo de carga con simvastatina.

En la figura 7.21 se observan las diferencias claras con respecto a los espectros IR antes y después del ensayo de carga. En ambos espectros se pueden ver las bandas características de los componentes de los *andamios*, entre las que destacan las bandas en 929 y 1025 cm^{-1} asociadas a la presencia de las cerámicas mesoporosas, correspondientes a las vibraciones de tensión de los silanoles (Si-OH) y los enlaces Si-O-Si, respectivamente. En 1158 cm^{-1} se aprecia tenuemente la vibración de tensión del enlace C-O de los grupos éter presentes en ambos polisacáridos, la cual se traslapa con la gran banda de la sílice. En 1640 cm^{-1} aparece la importante banda de flexión del enlace N-H evidenciando los grupos amino del quitosano. Entre 3240-3400 cm^{-1} , se observa una banda ancha debida a la vibración de tensión de los enlaces O-H, así como de los N-H que constituyen a todos los componentes presentes en los *andamios*. Los dobletes en 2935 y 2872 cm^{-1} , así como las bandas en 1460 y 1370 cm^{-1} son debidas a las vibraciones de tensión y deformación asimétrica y simétrica del C-H, respectivamente, mismas que se aprecian con mayor claridad en las muestras cargadas, ya que la simvastatina también contiene estos enlaces en su molécula. La evidencia tácita de la carga de simvastatina, es la aparición de nuevas bandas, siendo la de mayor interés la encontrada en 1709 cm^{-1} correspondiente al doble enlace C=O de los

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

grupos éster, así como la vibración de tensión en 1571 cm^{-1} del doble enlace C=C de los anillos, finalmente en 1250 cm^{-1} se ve la vibración de deformación del O-H presente en el anillo de simvastatina.

7.1.4. Ensayo de liberación de simvastatina

El ensayo de liberación se llevó a cabo de forma semicontinua, recuperando la cantidad de simvastatina liberada en 4 mL de PBS a un tiempo (t), como se muestra en la figura 7.22.

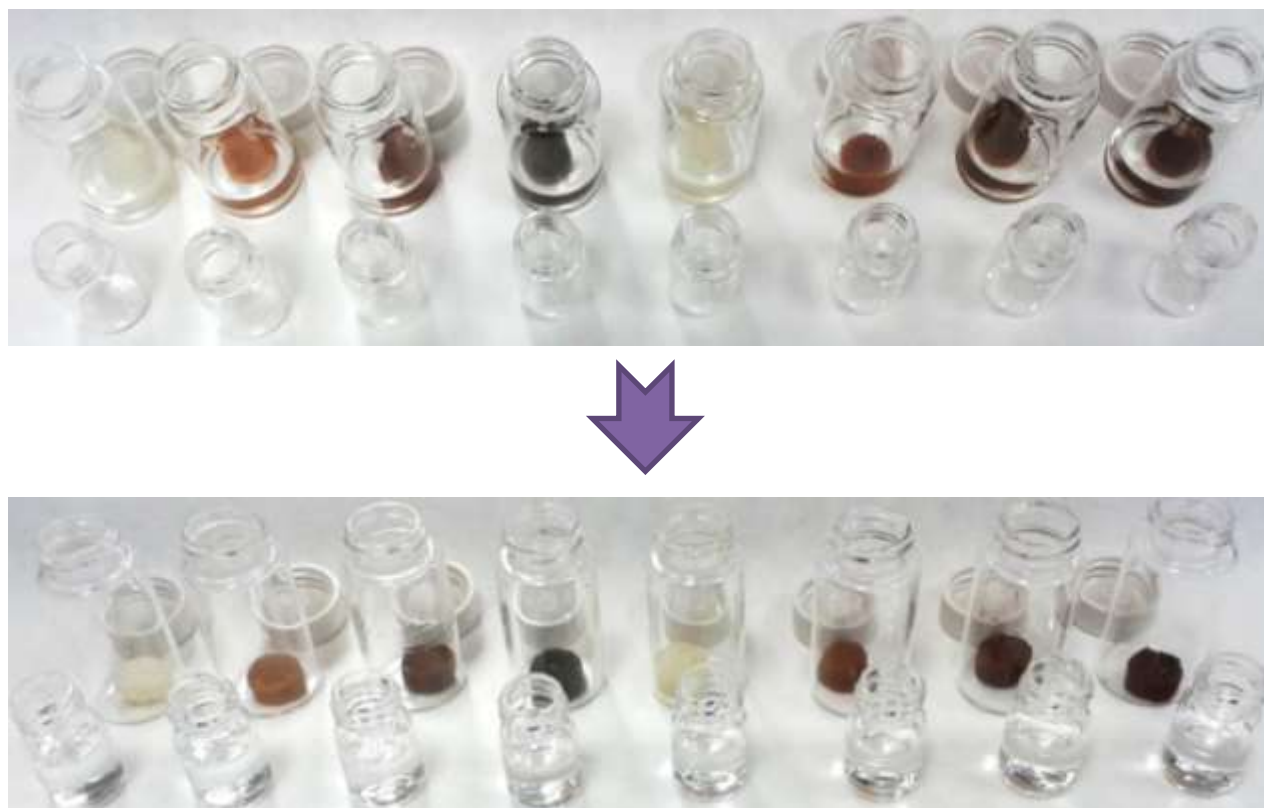


Figura 7.22. Proceso semicontinuo de liberación de simvastatina desde cada andamio.

Se determinó la cantidad de simvastatina liberada a partir de la absorbancia obtenida por espectrofotometría UV/Vis a 239 nm, para ello fue necesario utilizar la misma curva patrón mostrada en la figura 7.20, a continuación se muestran los espectros de UV/Vis del *andamio* Sc4 a lo largo del ensayo de liberación de simvastatina.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

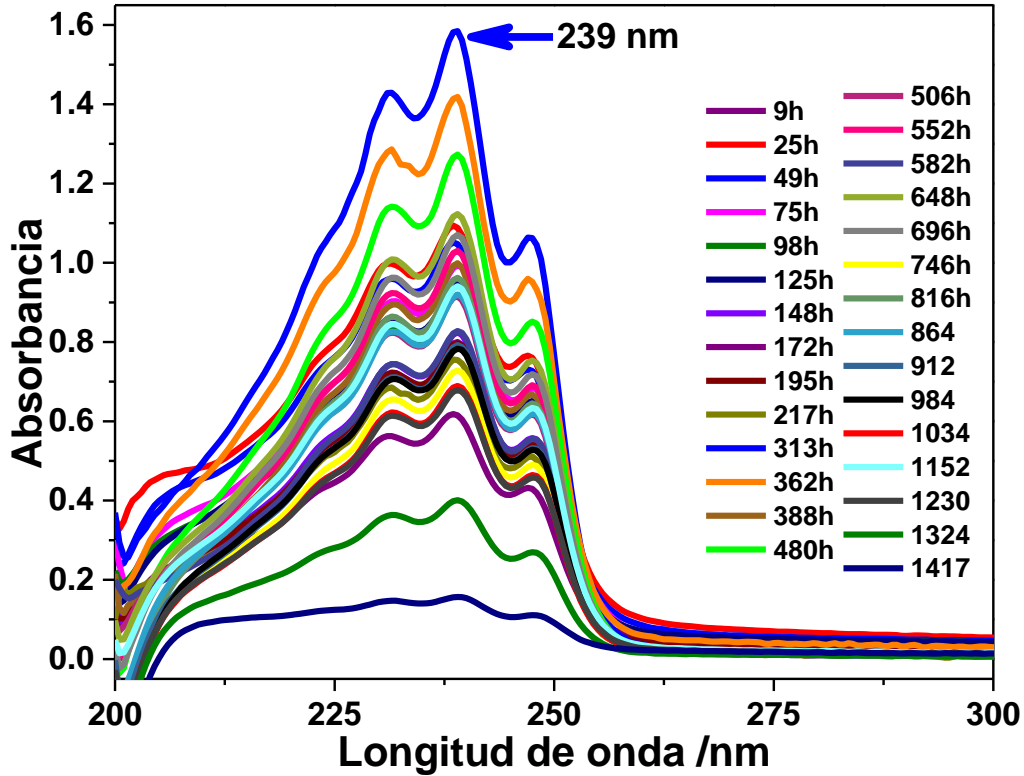


Figura 7.23. Espectros de UV/vis obtenidos del ensayo de liberación de simvastatina del *andamio* Sc4.

Para determinar las cinéticas de liberación de simvastatina desde los distintos *andamios*, se asume que el mecanismo de liberación es debido a la difusión del fármaco a través de los canales mesoporosos, ya que la sílice es prácticamente insoluble en las condiciones fisiológicas de liberación (pH 7.4). Así, la liberación de simvastatina al medio podría determinarse por la ecuación de Noyes-Whitney:

$$\frac{dC_t}{dt} = k\bar{S}(C_s - C_t) \quad (1)$$

donde C_t es la concentración de soluto a tiempo t , S es el área de disolvente accesible por unidad de volumen, C_s es la solubilidad del fármaco en el equilibrio a la temperatura de ensayo y k es la constante cinética. Se asume que durante el tiempo de liberación, una fracción de moléculas liberadas permanece retenida en la superficie del material. El flujo (J) hacia el medio de liberación de las moléculas adsorbidas puede ser descrito por un mecanismo de difusión, mediante un modelo de Fick. En esta aproximación, se considera que el coeficiente de difusión (D) es constante durante el ensayo, ya que la matriz permanece prácticamente insoluble y además C_t sólo depende del tiempo, es decir, la concentración del fármaco

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

liberado es continua en el medio de liberación. Bajo estas consideraciones, las leyes de Fick se escriben como:

$$J = -D \frac{dC_t}{dx}$$

$$\frac{dC_t}{dt} = D \frac{d^2 C_t}{dx^2} \quad (2)$$

Reorganizando las constantes e integrando las ecuaciones (1) y (2), la liberación de un fármaco puede representarse mediante el siguiente modelo de decrecimiento exponencial:

$$\frac{w_t}{w_0} = 1 - e^{-k_1 t} \quad (3)$$

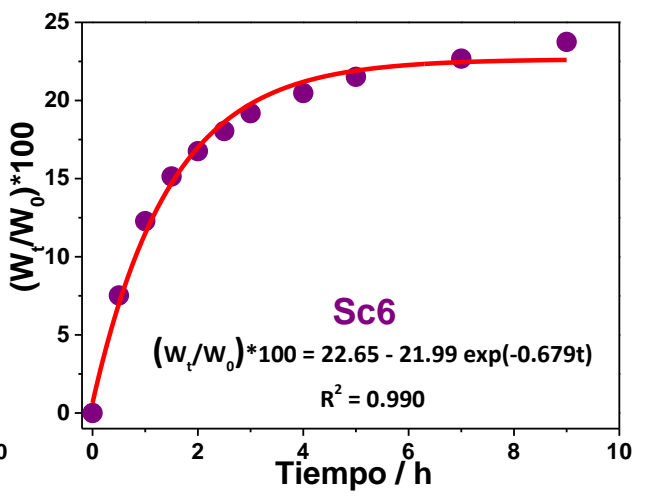
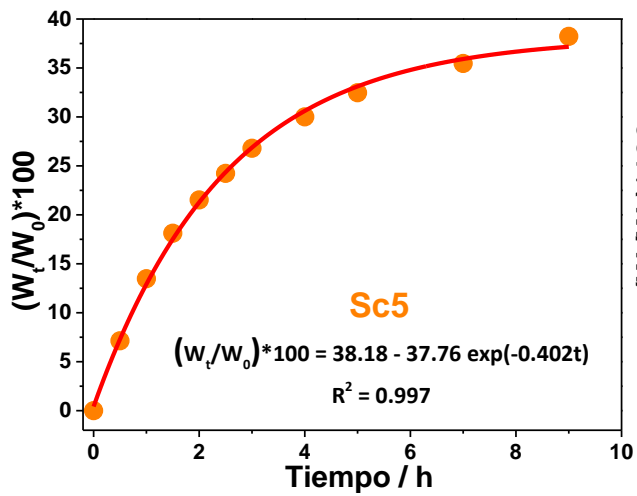
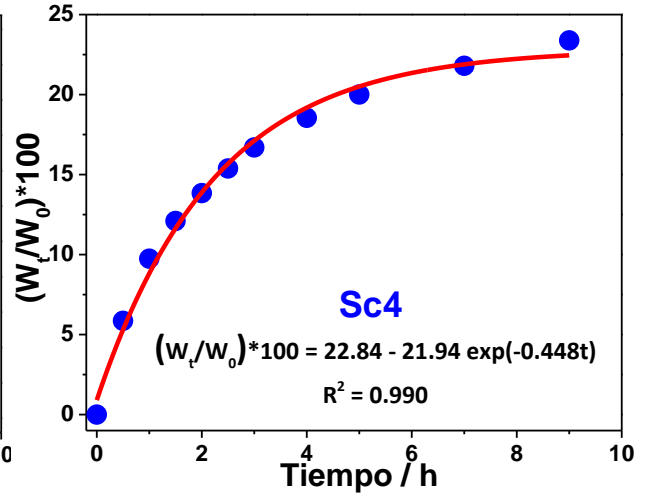
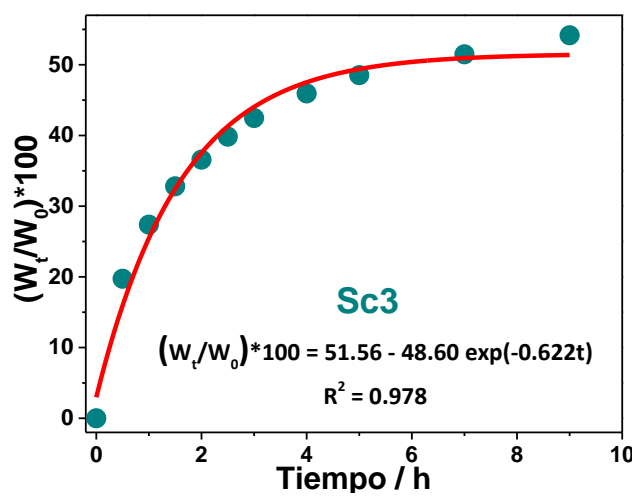
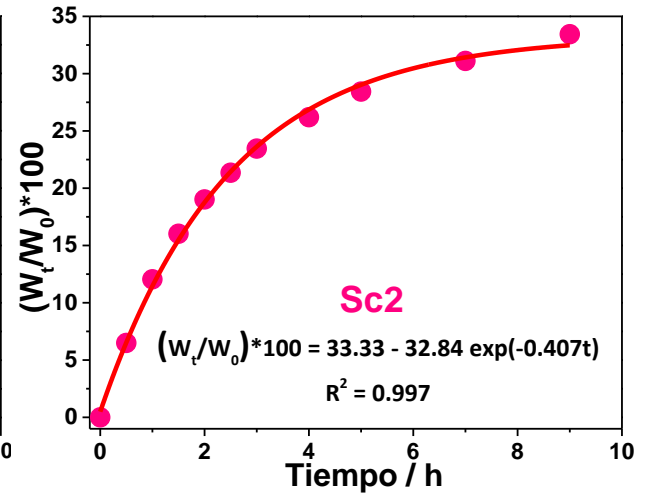
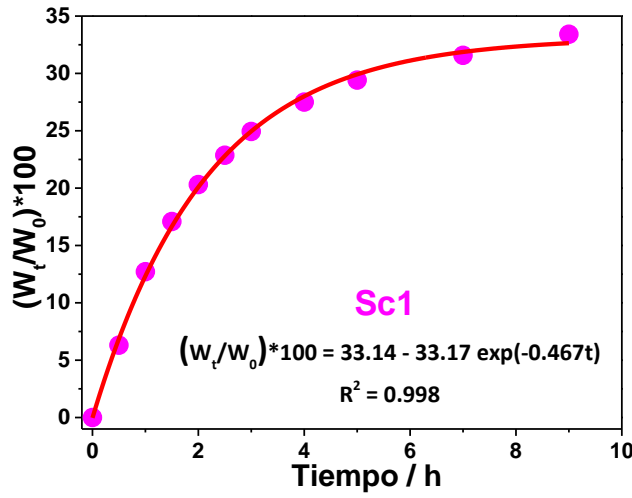
donde w_t y w_0 , son la masa de simvastatina liberada a tiempo t y la masa inicial de simvastatina en el *andamio*, respectivamente. La constante cinética, k_1 , es independiente de la concentración del fármaco y aporta información acerca de la accesibilidad del disolvente y del coeficiente de difusión a través de los canales de la estructura. Teniendo en cuenta todas estas aproximaciones y en las condiciones del experimento, la liberación de simvastatina depende de la cantidad de fármaco adsorbido en los mesoporos interiores, siendo más lenta a medida que la masa adsorbida disminuye. Este modelo ya ha sido aplicado con éxito para la explicación de la cinética de liberación de fármacos desde matrices porosas insolubles con estructura similar^{13, 61, 62, 63, 64, 66}. En la tabla 7.4 se reúnen las constantes W_0 y W_t (a 9 h del proceso de liberación) para cada *andamio* cargado.

Tabla 7.4. Constantes W_0 y W_t de los andamios.

Andamio	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7	Sc8
MMS/NC	S15 _{HP} HA	LMNC _{HP} HA	MANC _{HP} HA	S15 _H	NCPEI _H	LMNC _H	HMNC _{HP}	NCHPAA _{HP}
W_0	17.037	16.178	19.295	25.535	15.204	17.096	23.025	20.251
W_t (t = 9h)	5.693	5.411	10.452	5.972	5.813	4.061	5.482	8.220

Así, los perfiles de liberación experimentales de las primeras 9 horas del proceso, se muestran en la figura 7.24. Se observa que la simvastatina liberada desde los *andamio* se ajusta al modelo de decrecimiento exponencial descrito por la ecuación (3).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

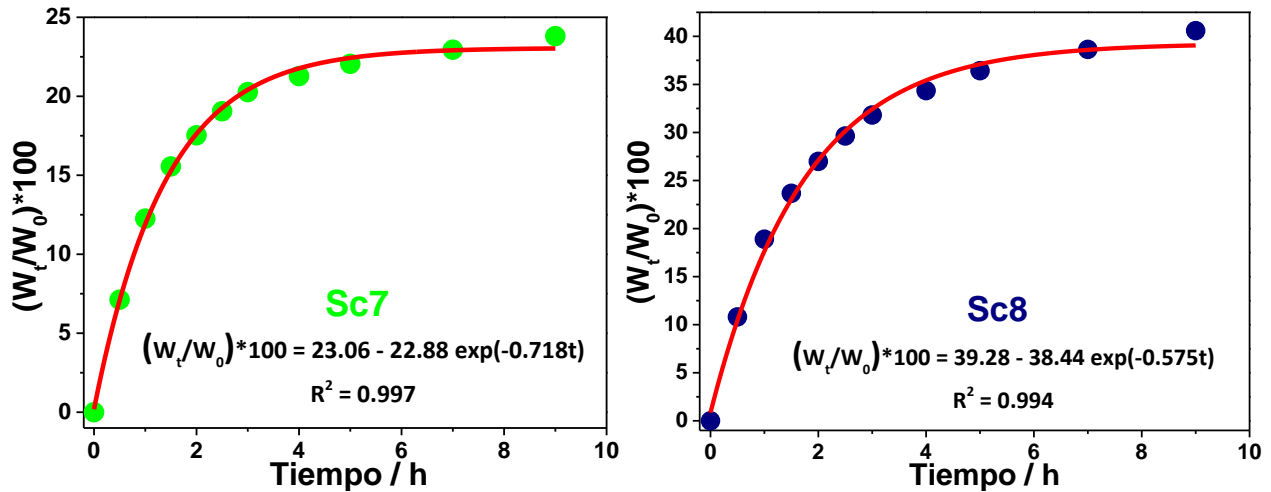


Figura 7.24. Perfiles de liberación de simvastatina en PBS a pH = 7.4 en las primeras 9 horas de ensayo, desde los distintos *andamios* cargados.

Las muestras Sc3 y Sc8 son las que más simvastatina liberan en las primeras 9 h de ensayo, en general, es alto el porcentaje de simvastatina que permanece retenida en los poros que difundirá al medio en un periodo más largo de tiempo; así mismo, se observa que los *andamios* elaborados a partir de las muestras que presentan un mayor número de interacciones superficiales debidas a los grupos silanol (matrices mesoporosas y nanocomposites recubiertos con sílice amorfa), provocan que el proceso de liberación de simvastatina se realice lentamente. Datos que se corroboran en la tabla 7.5, donde se muestra el porcentaje de simvastatina liberada y la constante cinética de primer orden (k_1).

Tabla 7.5. Porcentaje liberado y constante cinética de primer orden (k_1) a las 9 h del ensayo liberación de simvastatina desde los *andamios*.

Andamio	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7	Sc8
MMS/NC	S15 _{HP} HA	LMNC _{HP} HA	MANC _{HP} HA	S15 _H	NCPEI _H	LMNC _H	HMNC _{HP}	NCHPAA _{HP}
Simv. liberada a las 9h (%)	33.42	33.45	54.17	23.39	38.23	23.75	23.81	40.59
k_1 a las 9h (h^{-1})	0.467	0.407	0.622	0.448	0.402	0.679	0.718	0.575

Sin embargo es muy importante puntualizar que todas las curvas de liberación presentan dos perfiles similares. Durante las primeras 9 horas de ensayo, la liberación se ajusta al modelo cinético descrito por la ecuación (3) a tiempos cortos, liberándose hasta un 54.17 %; este primer perfil muestra la liberación de simvastatina desde los microporos de los *andamio*. A partir de este punto y durante los siguientes

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

días de ensayo, la liberación de simvastatina se llevó a cabo mediante la difusión del fármaco desde el interior de los mesoporos (tanto de las cerámicas como de los NCs magnéticos adheridos a los *andamios*) ajustándose a una cinética de orden uno para periodos de tiempo prolongados. Cabe mencionar que el ensayo se monitoreó hasta la liberación del 100% de simvastatina en todos los materiales, proceso que duró entre 700 y 1300 h.

En la figura 7.25, se observan las curvas de liberación de simvastatina del ensayo completo de todos los *andamios*, pareciera que el ensayo de liberación se pudiera representar con una exponencial, sin embargo no es posible describir su comportamiento con un solo ajuste de primer orden, ya que el coeficiente de correlación sería bajo. De esta forma en la figura 7.26, se presentan los segundos perfiles de liberación de orden uno de cada *andamio* que van de las 9h del ensayo hasta la conclusión de los mismos. Está claro que la velocidad y la cantidad de simvastatina liberada cambia drásticamente al pasar de un perfil a otro, el fármaco es liberado muy lentamente durante la segunda fase, mostrando que el proceso se llevó a cabo de forma controlada.

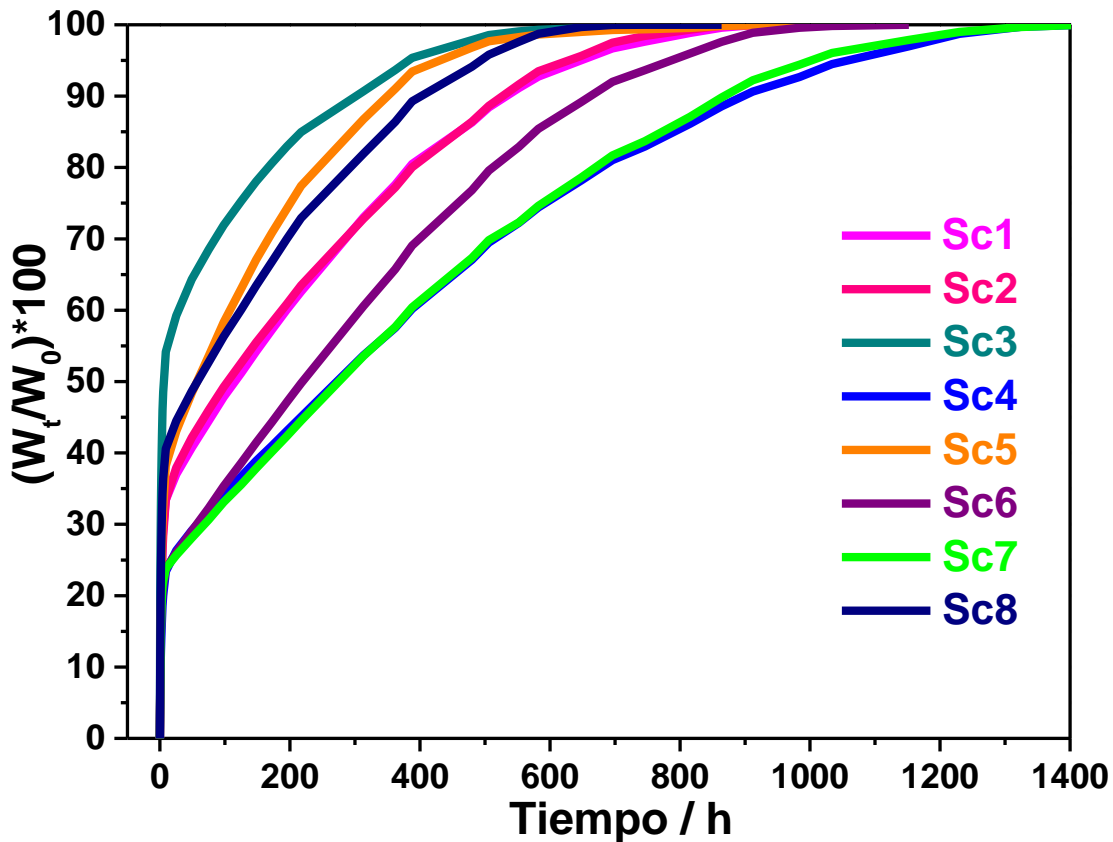
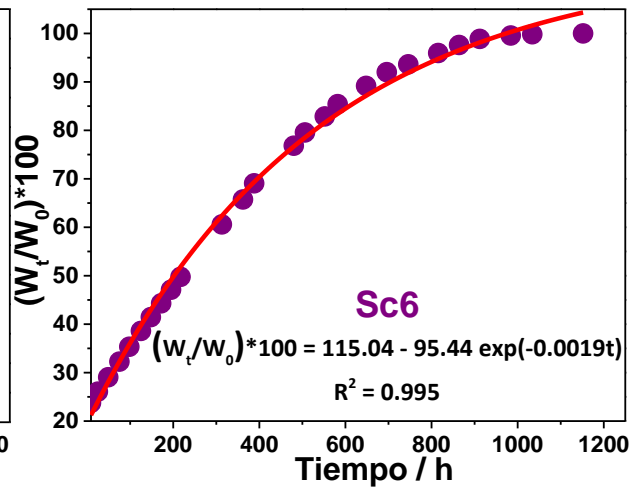
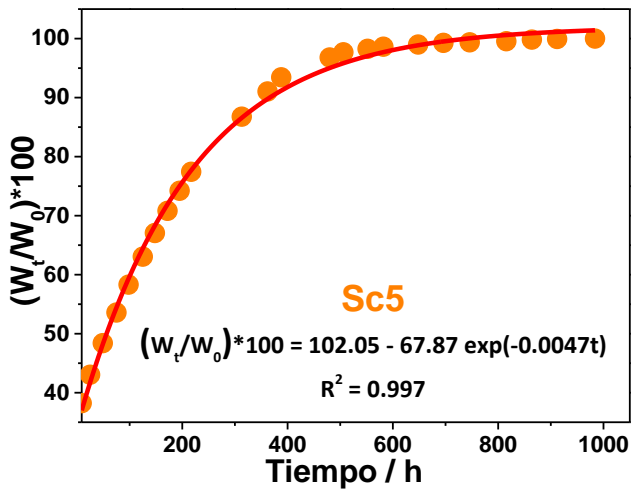
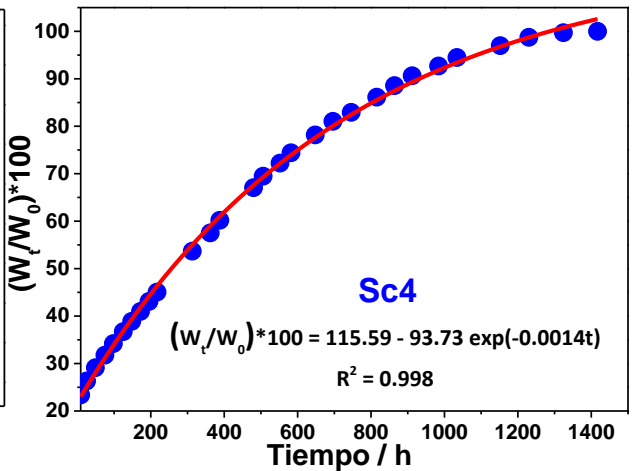
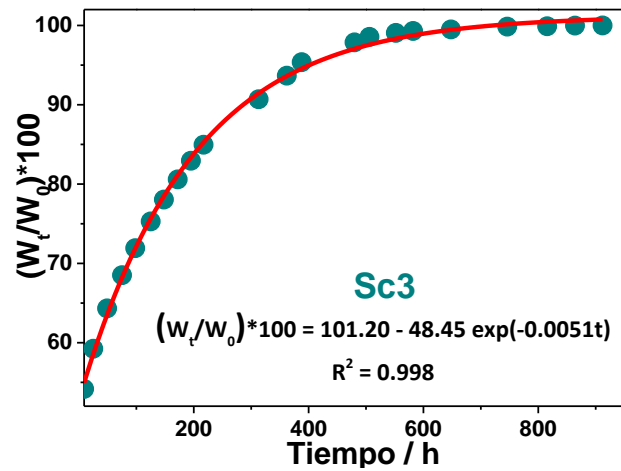
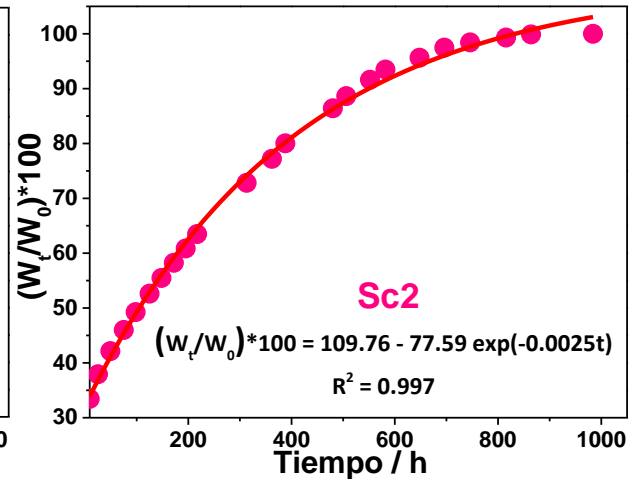
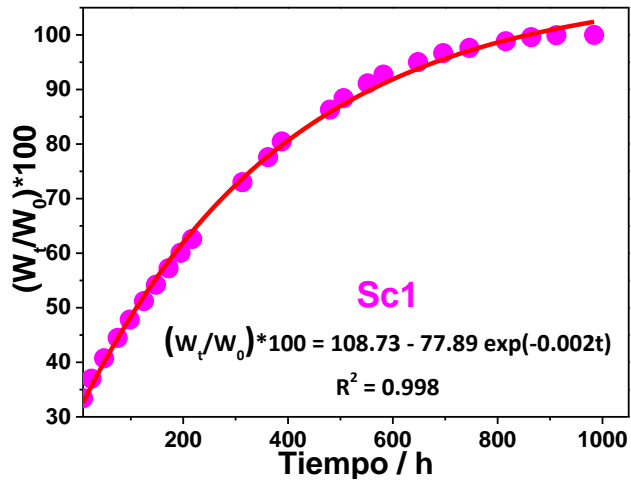


Figura 7.25. Perfiles completos de liberación de simvastatina en PBS a pH = 7.4 desde los distintos *andamios* cargados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

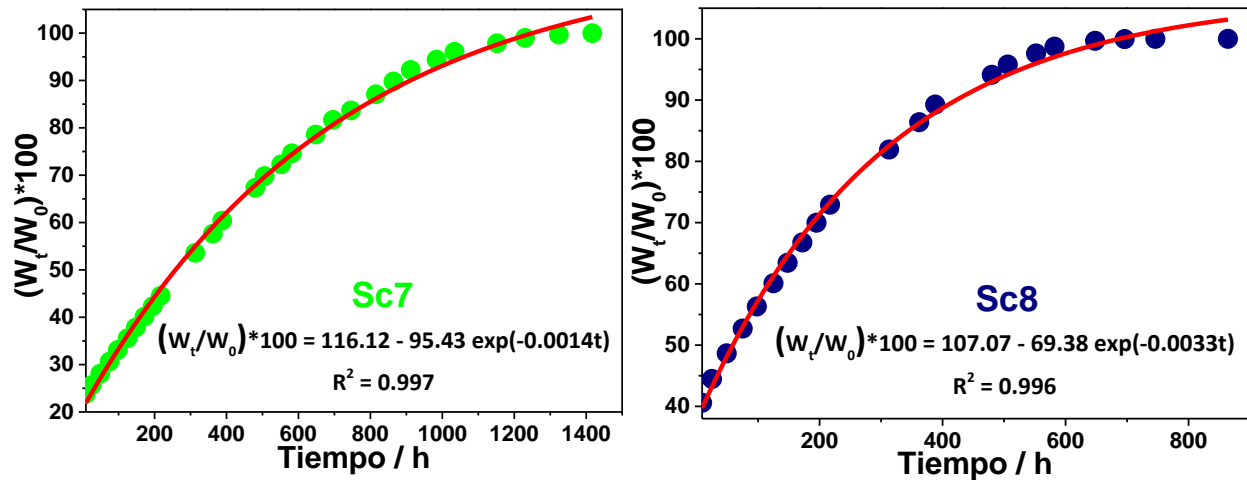


Figura 7.26. Segundos perfiles de liberación de simvastatina (de las 9 h de ensayo hasta el 100% de liberación) en PBS a pH = 7.4 desde los distintos *andamios* cargados.

En la tabla 7.6 se recopilan las constantes cinéticas y el tiempo en que tardó en concluir el ensayo de liberación de cada *andamio*.

Tabla 7.6. Constante cinética de primer orden a tiempos prolongados (k_2) de las 9 h al final del ensayo liberación de simvastatina desde los *andamios*.

Andamio	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7	Sc8
MMS/NC	S15 _{HP} HA	LMNC _{HP} HA	MANC _{HP} HA	S15 _H	NCPEI _H	LMNC _H	HMNC _{HP}	NCHPAA _{HP}
T_{final} (h)	858	832	721	1290	741	972	1252	688
k_2 ($\times 10^{-3} h^{-1}$)	2.55	2.49	5.12	1.39	4.72	1.90	1.42	3.32

Existe una relación entre materiales con interacciones superficiales del mismo tipo, por ejemplo para aquellos que poseen en su mayoría interacciones tipo Si-O (cerámicas mesoporosas y NCs SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂), la liberación por día es aproximadamente 0.45 mg_{sim}, llevándose a cabo por un periodo de tiempo bastante prolongado; mientras tanto, para aquellos *andamios* donde la superficie es más polar debido a la presencia de grupos amino y carboxilo (NCs SBA-15/Fe₃O₄@PAA, SBA-15/Fe₃O₄@PEI y NCs Fe₃O₄@C), la liberación procede más rápidamente pero en mayor cantidad, alrededor de 0.7 mg_{sim}/día, esto es debido a que las interacciones polares con el medio acuoso facilitan la liberación de la simvastatina. En todos los casos se observa que los valores de k_2 son mucho menores a los valores obtenidos para k_1 , lo cual indica que el fármaco está difundiendo más lentamente y de forma controlada.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Los ensayos de carga y liberación de los *andamios* presentados en este apartado fueron comparados con el ensayo de un material elaborado anteriormente por el grupo de investigación del Dr. Francisco Otero (Facultad de Farmacia/USC), el cual fue sintetizado bajo las mismas condiciones y con la misma composición polimérica, pero con hidroxapatita (Sc_HA) como componente inorgánico (datos no publicados). El ensayo de carga fue realizado con otro fármaco, ciprofloxacino, mediante la imbibición del *andamio* Sc_HA en una disolución de ciprofloxacino en agua a una concentración 1 mg/mL durante 24h bajo agitación (100rpm) y manteniendo la temperatura en 37°C.

Aún cuando el ensayo se realizó con otro fármaco, es evidente la diferencia en la capacidad de adsorción que posee el material Sc_HA, ya que sólo fue capaz de incorporar $6.8 \pm 1.7 \text{ mg}_{\text{cip}}/\text{g}_{\text{mat}}$, en comparación con el *andamio* Sc5 que fue el que menos simvastatina adsorbió 148.20 ± 1.05 . Sin embargo, la diferencia más destacable está en el ensayo de liberación, dado que el tiempo para liberar el 100% de ciprofloxacino fue aproximadamente de 16 h (figura 7.27); mientras que el tiempo mínimo para liberar el 100% de simvastatina en todos los casos fue mayor a 700 h, llegando en algunos casos alrededor de 1300 h. Por lo tanto la presencia de las matrices mesoporosas de sílice y de los NCs magnéticos en un material con la misma composición polimérica que Sc_HA, cambió drásticamente las propiedades de adsorción y liberación de los *andamios*, confiriéndoles la capacidad de actuar como sistemas de liberación controlada a nivel local (in situ).

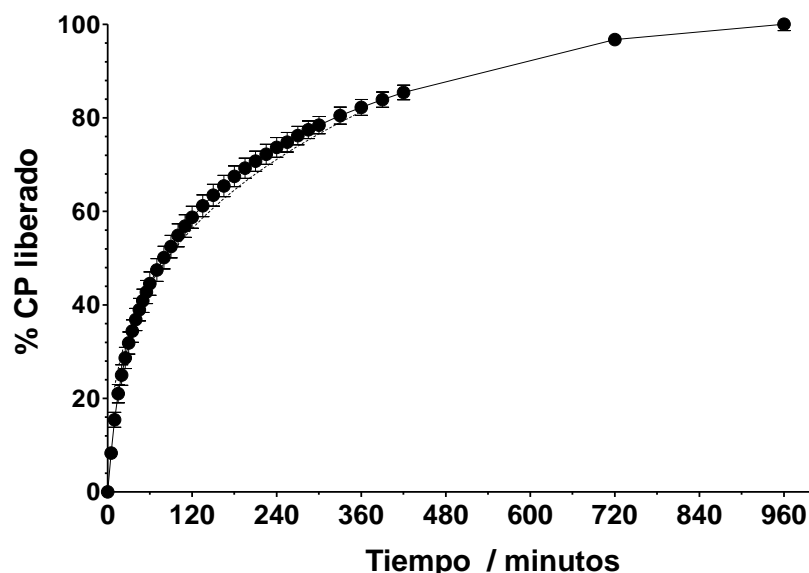


Figura 7.27. Perfil de liberación de ciprofloxacino a partir del *andamio* Sc_HA (Beatriz Rey Aira, PFM, FF/USC, 2014).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.1.5. Degradabilidad

El aporte de las cerámicas mesoporosas o de los nanocomposites magnéticos en la composición final de los *andamios* es de vital importancia, ya que estudios previos realizados en la facultad de Farmacia de la USC (datos no publicados¹⁷⁴) demostraron que los sistemas elaborados con diversas mezclas de polímeros, en ausencia de un componente cerámico o de materia mineral, no poseen una resistencia mecánica, ni química suficiente para su empleo en regeneración ósea. Lo cual se determinó mediante ensayos de estabilidad observándose una disminución en el peso de los *andamios* sumergidos en tampón fosfato salino, mostrando una rápida disgregación de estos sistemas en menos de 48 horas. Uno de los problemas fue que el alginato y el κ -carragenato utilizados se ionizan a pH fisiológico, por lo que los sistemas tienden a incorporar medio salino, hinchándose, lo que produce tensiones en el hidrogel que favorecen su disgregación, la adición de quitosano mejora sus propiedades, sin embargo sigue siendo insuficiente para obtener un sistema estable que perdure por más tiempo. La incorporación de un componente cerámico insoluble a pH fisiológico incrementó enormemente su estabilidad como se observó en el caso del *andamio* con HA. Particularmente en este trabajo de tesis, la degradación y estabilidad de los *andamios* se pudo estimar a partir del material final recuperado tras el proceso de liberación de simvastatina.

Los *andamios* se dejaron 1500 h en PBS bajo condiciones fisiológicas (37°C y 80 rpm), observándose que la mayoría conservó su estructura 3D original y mantuvo una muy buena apariencia y cohesión, figura 7.28; por su parte, el material Sc1 fue el que más absorbió líquido del medio, hinchándose de inmediato, sin embargo, mostró una buena estructura final. Las muestras con la mejor apariencia fueron Sc3 y Sc4, en contraste con el material Sc8, que presentó mayor perturbación. Por lo tanto, el componente cerámico es quien determina la estabilidad y degradabilidad de los materiales, de esta forma las cerámicas mesoporosas y los NCs magnéticos con una estructura bien definida, contribuyen a una mejor cohesión y consistencia. Para obtener un resultado más preciso habrá que repetir todo el experimento detalladamente, debido a que la degradación también pudiera estar asociada al proceso de elaboración, principalmente en los pasos de homogeneización de la mezcla y moldeo. Habrá que asegurarse que la dispersión final quede completamente homogénea y que al colocarse en la jeringa, se encuentre bien distribuida y compactada dentro del molde, evitando la formación de burbujas, que pudieran favorecer la obtención de *andamios* más débiles. Por lo tanto no se puede determinar con seguridad si el material Sc8 que se sintetizó a partir del NC SBA-15/Fe₃O₄@HPAA, se degradó más rápido porque contiene una

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

mayor cantidad de nanopartículas de magnetita tanto en el interior como en el exterior de los poros de la sílice mesoporosa, lo cual podría dificultar el anclaje directo entre la matriz polimérica y la cerámica mesoporosa, o bien fuera por un motivo de procesamiento en el que no se hubiera compactado adecuadamente el material y estuvieran presentes una mayor cantidad de burbujas; considerando el hecho de que el *andamio* Sc5 fue elaborado con un material muy similar, y sin embargo, éste conserva perfectamente su estructura 3D. Razón por la cual es necesario realizar más estudios para descartar que el proceso de elaboración influye en las características finales de los materiales. En general se preserva alrededor del 96 al 98% del peso original de los *andamios*, en el caso de Sc6 y Sc8 este porcentaje bajó a un 90-93% aproximadamente. En la figura 7.29 se observa la apariencia de los *andamios*, una vez que fue retirado el medio PBS, prácticamente su apariencia se conserva igual. Comparando los materiales originales (liofilizados, antes de la carga de simvastatina) con los materiales liofilizados tras el proceso de liberación, se observa en todos los casos una contracción debido al medio y a todas las sales e iones presentes en el mismo durante ambos ensayos, lo cual es normal, ya que aumentan las interacciones de los grupos funcionales que conforman los materiales, lo que puede propiciar un acercamiento entre ellos, figura 6.30. Nuevamente los sistemas Sc6 y Sc8 son los que presentan una mayor alteración, ya que además de la contracción, también sufrieron la pérdida de partículas durante el ensayo de liberación.

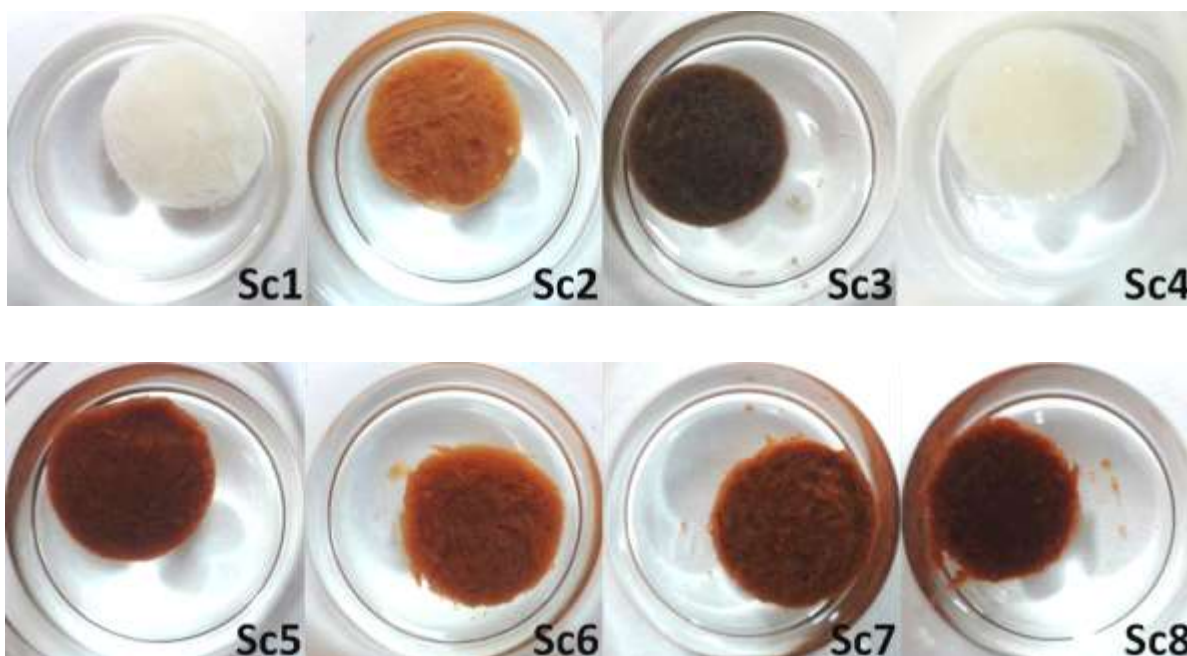


Figura 7.28. Apariencia de los *andamios* en PBS, tras 1500h de liberación bajo condiciones fisiológicas (37 °C y agitación orbital a 80 rpm).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

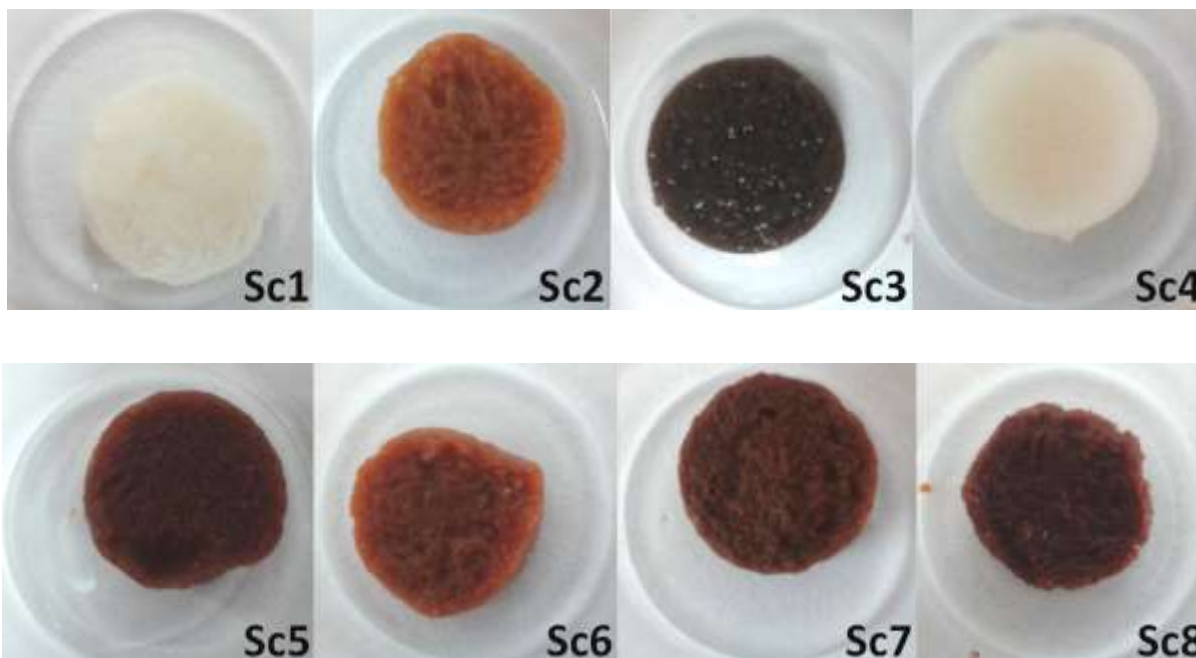


Figura 7.29. Apariencia de los *andamios* una vez retirado el medio PBS, tras 1500h de liberación bajo condiciones fisiológicas (37 °C y agitación orbital a 80 rpm).



Figura 7.30. Apariencia de los *andamios* liofilizados, antes de la carga y tras la liberación, Sc1, Sc2, Sc5, Sc3, Sc4, Sc6, Sc7 y Sc8 (de izq. a derecha y de arriba a abajo).

La velocidad de degradación de un sustituto óseo es de gran importancia, idealmente se espera que un *andamio* mantenga sus características durante el tiempo suficiente para que se produzca la regeneración ósea. Si la resorción se produce con excesiva rapidez, los osteoblastos pierden el andamiaje necesario para la neoformación ósea; pero si es demasiado lenta, no se producirá el reemplazo por tejido óseo en el tiempo adecuado, el hecho de que los osteoblastos sean capaces de formar hueso y reemplazar al *andamio* implica un gran avance científico, ya que el material utilizado es apto para medicina

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

regenerativa y no un reemplazo o sustituto óseo. El tiempo ideal para la degradación de un sistema se encuentra entre 6 y 18 meses (chronos™)¹⁷⁵. Esta estimación se basa en el equilibrio entre la desintegración producida por los osteoclastos y la regeneración del hueso nuevo por los osteoblastos. Los osteoclastos proceden a su resorción como si se tratara de tejido óseo natural o endógeno, adhiriéndose a la matriz, abriendo surcos y poros en la superficie del material al mismo tiempo que los osteoblastos rellenan los huecos y surcos formados mediante la síntesis de matriz extracelular que posteriormente se calcifica¹⁷⁵. En este sentido, todos los materiales sintetizados en este trabajo serían posibles candidatos para *andamios* con aplicación en ingeniería de tejidos/medicina regenerativa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.2. MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA MRI A PARTIR DE ESTRUCTURAS CORE-SHELL (Fe₃O₄)_n@C

7.2.1. Caracterización estructural y magnética de estructuras core-shell (Fe₃O₄)_n@C

El estudio de las fases cristalinas de las estructura core-shell superparamagnéticas, se llevó a cabo mediante DRX de polvos, las muestras fueron analizadas en un difractor Philips PW1710 (fuente de radiación Cu K α , $\lambda = 1.54186 \text{ \AA}$). Las medidas se recolectaron entre $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ con pasos de 0.02° y 5s/paso. La posición y las intensidades relativas de los picos de difracción principales confirmaron que la fase magnética presente en la muestra corresponde a la fase de magnetita con una estructura de espinela inversa (JCPDS card No. 19-0629) como se muestra en el difractograma de la figura 7.31. Donde las reflexiones 111, 220, 311, 400, 422, 511, 440 de la magnetita se observaron. Aplicando la ecuación de Scherrer¹²⁹, se obtuvo un tamaño de cristalito promedio de $D_{hkl} = 16.3 \text{ nm}$ $\sigma = 2.8 \text{ nm}$.

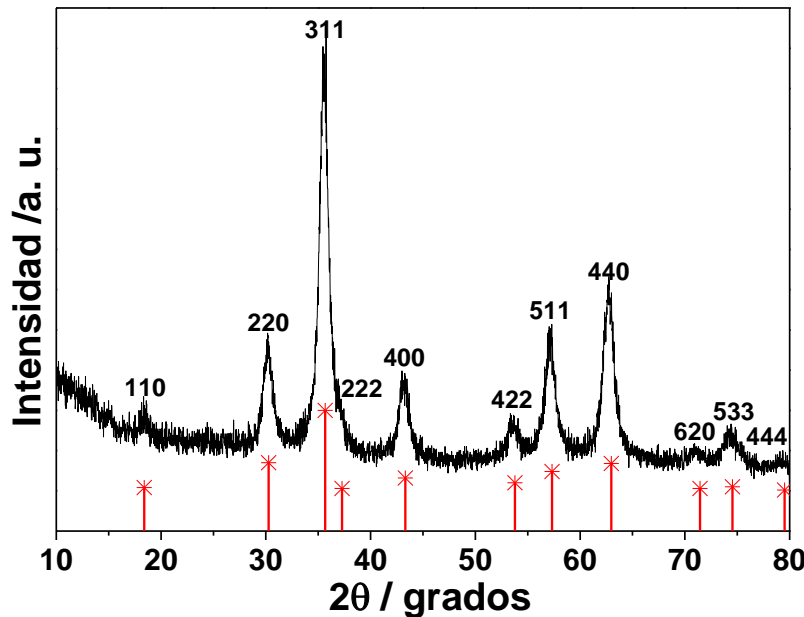


Figura 7.31. Patrón de difracción de rayos X de las estructuras core-shell (Fe₃O₄)_n@C, comparado con el patrón de DRX de la base de datos de la magnetita JCPDS 19-0629.

La morfología de las nanopartículas de magnetita encapsulas en carbón se caracterizaron mediante MEB y MET, como se muestra en la figura 7.32 y 7.33, se puede ver que las nanopartículas obtenidas poseen una estructura relativamente esférica y un tamaño uniforme con un diámetro promedio de $186.5 \pm 31.5 \text{ nm}$, figura 7.34 (a), es claramente evidente partículas con estructura core-shell con un recubrimiento de

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

carbón amorfo que tiene un espesor promedio de 11.6 ± 2.8 nm, figura 7.34 (b), mientras que el *core* está compuesto por docenas de nanocristales de magnetita con un tamaño entre 10-20 nm.

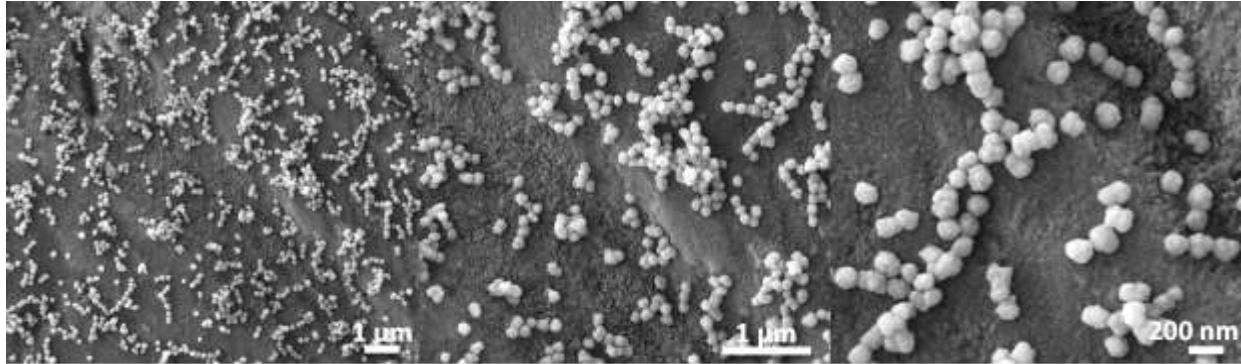


Figura 7.32. Micrografías de MEB de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$.

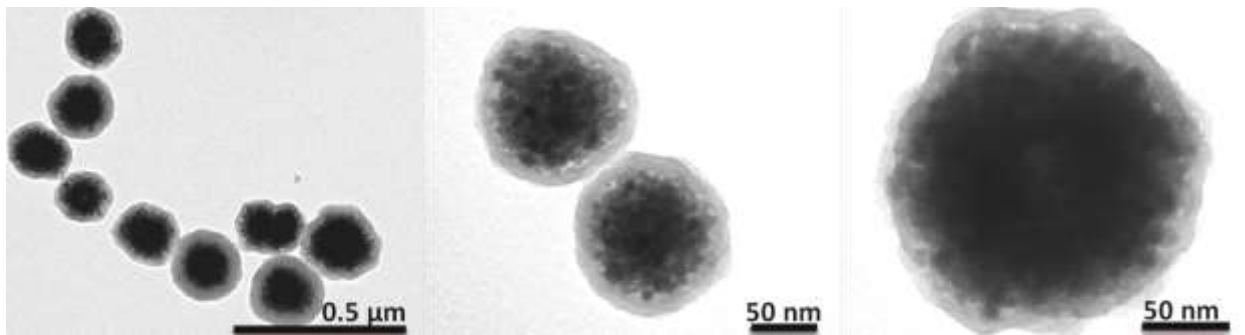


Figura 7.33. Micrografías de MET de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$.

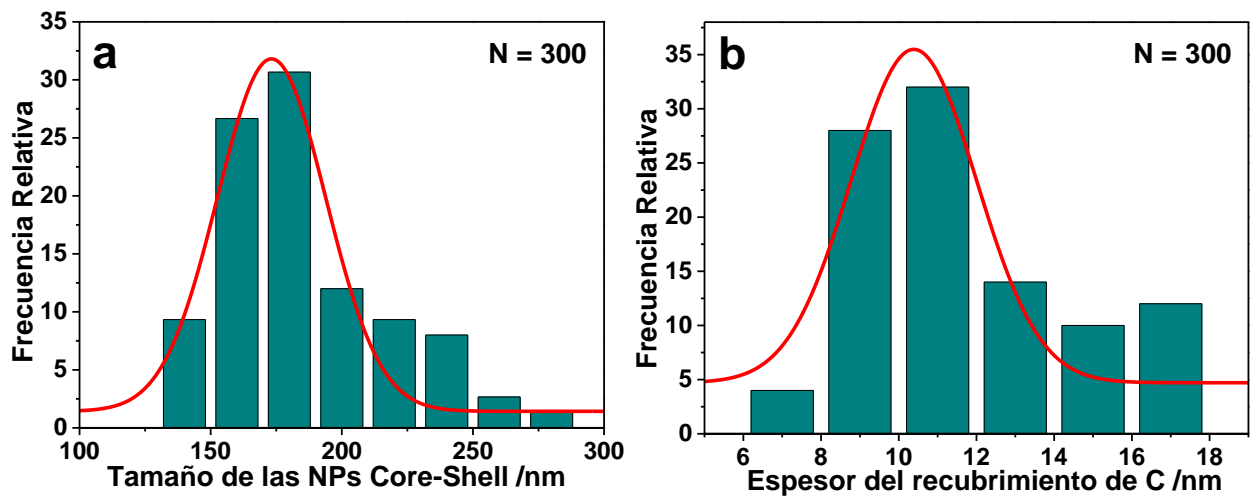


Figura 7.34. Distribución de tamaños (a) de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$ y (b) del espesor del recubrimiento de C.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Las curvas de magnetización en función del campo magnético aplicado, hasta 25 kOe, se realizaron en un rango de temperaturas de interés biomédico ($\{250, 275, 300, 320\}$ K) con un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) sobre la muestra en seco. Los datos de magnetización normalizados a la cantidad de masa de magnetita, se muestran en la figura 7.35 (a), la cual fue cuantificada mediante análisis termogravimétrico en atmósfera de oxígeno, figura 7.35 (b), en donde se observa una primera pérdida a 90 °C atribuida al disolvente atrapado en el material, posteriormente una segunda pérdida en porcentaje en peso debida al recubrimiento de carbono de las estructuras core-shell, siendo ésta de un 32 %. Considerando los datos proporcionados por el TGA, se obtuvo la magnetización de saturación M_{sat} , alcanzando hasta $70 \text{ emu/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$, el análisis mediante SQUID demuestra fehacientemente el comportamiento superparamagnético (SPM) con fuerzas coercitivas o remanencia despreciables a distintas temperaturas, aunque una interacción dipolar magnética interna moderada no se descarta¹⁷⁶. La magnetización de saturación es más pequeña que la magnetita en masivo M_{sat} , 92 emu/g , en concordancia con el efecto superficial dominante en pequeñas NPs magnéticas, por lo cual la capa magnética muerta decrece significativamente la magnetización total.

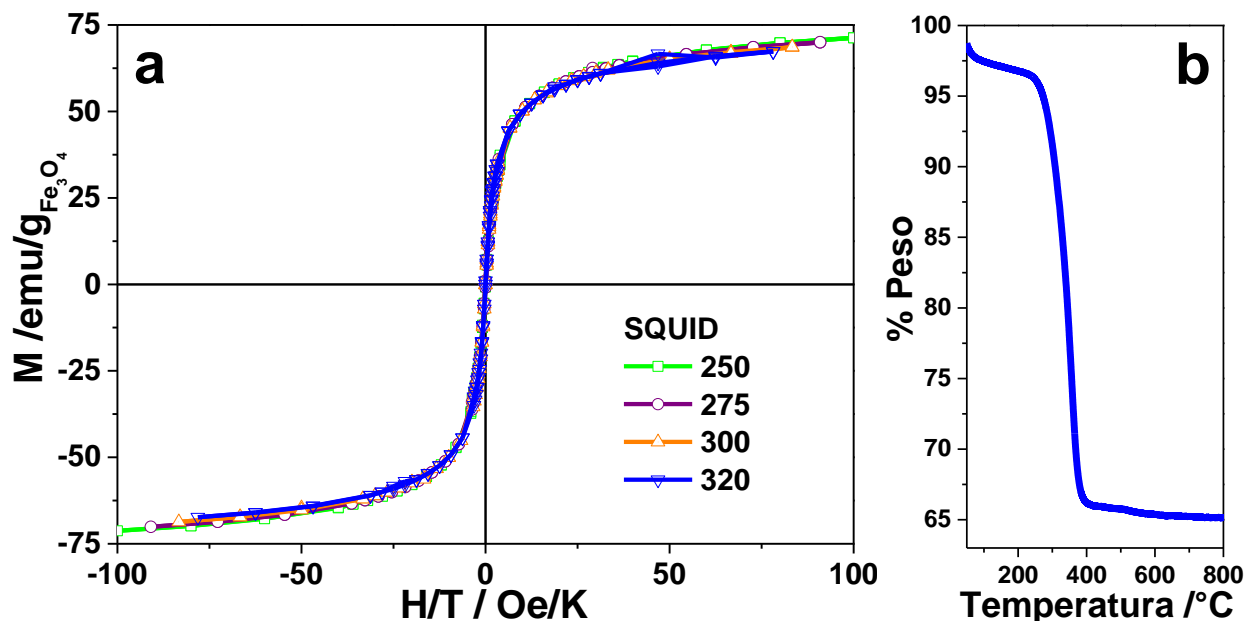


Figure 7.35. a) Curvas de magnetización de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ medidas hasta 25 kOe a diferentes temperaturas ($T=\{250,275,300,320\}$ K). No se aprecian fuerzas coercitivas o remanencia, mostrando un comportamiento SPM y **b)** Curva termogravimétrica de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

La estimación del tamaño de los núcleos de óxido de hierro se realizó mediante las ecuaciones mostradas en el capítulo anterior. Así el tamaño magnético aparente, D_{mag} , de este material fue de $D = 6.24 \text{ nm}$ ($S = 0,13$), casi tres veces menor que los estimados por las imágenes de MET, D_{MET} , o por los difractogramas DRX, D_{XRD} . Esta subestimación del tamaño magnético aparente fue reportada anteriormente¹⁷⁷ en estudios desarrollados para materiales con múltiples núcleos magnéticos (MBs), y fue atribuida al fuerte efecto de la interacción dipolar magnética, la cual es de intensidad moderada entre las NPs de magnetita muy próximas unas con otras en el interior del core.

La caracterización por hipertermia magnética se llevó a cabo mediante la exposición de 200 μL del ferrofluido acuoso multi- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ durante casi 4 minutos a un equipo de calentamiento por inducción trabajando a $H = 30 \text{ mT}$ y $f = 293 \text{ kHz}$. Se observó un calentamiento insignificante ($\Delta T \sim 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 min), aun cuando la cantidad de núcleos de magnetita dentro de cada NP es grande. Esta respuesta térmica ausente se puede atribuir al espesor de la capa de carbono ($\delta = 11.6 \pm 2.8 \text{ nm}$), la cual funciona como aislante térmico en su fase amorfa ($K_{\text{amorph.C}} \sim 0.01 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

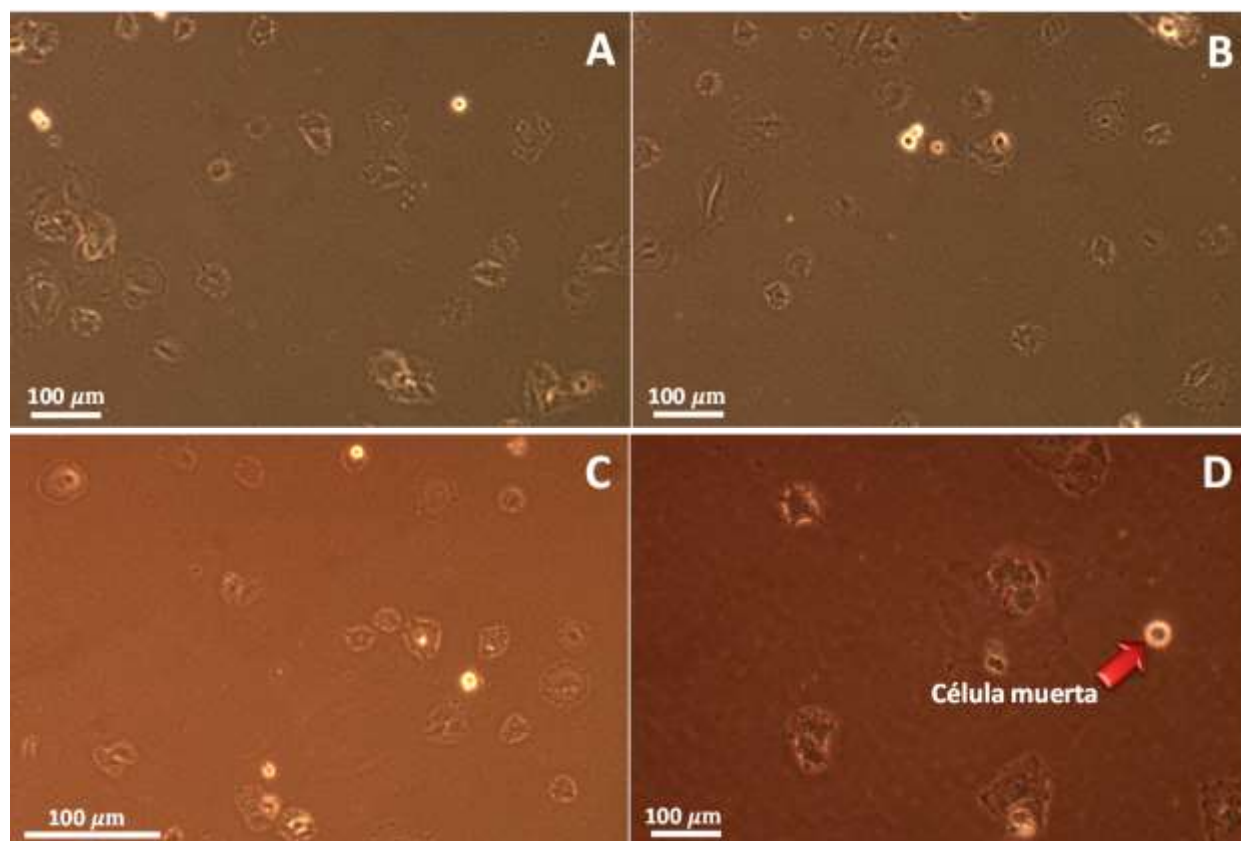
Aunque el aumento de temperatura es muy necesario para terapias contra cáncer basadas en la exposición de ferrofluidos a hipertermia magnética, se convierte en un inconveniente importante para aplicaciones en cerebro, donde se podría ocasionar una lesión neurológica por el aumento de temperatura producido por el material magnético expuesto a la presencia accidental de un campo magnético alterno. Por lo tanto, la actividad termo-magnética insignificante de estas NPs multi- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, les confiere una gran ventaja para ser utilizadas como agentes de contraste para procedimientos de resonancia magnética del cerebro, donde los tejidos están expuestos a pulsos magnéticos de RF.

7.2.2. Biocompatibilidad, marcaje celular y respuesta MRI de las estructuras core-shell (Fe_3O_4) $_n$ @C. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por la Dra. Bárbara Arbigay.

La biocompatibilidad y la capacidad de marcaje celular de los materiales se estudiaron incubando células troncales mesenquimales (MSCs) con 200 $\mu\text{g/mL}$ del ferrofluido (Fe_3O_4) $_n$ @C y con o sin 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de (PLL) dispersadas en medio celular durante 24 horas⁸⁸. La tinción con azul de Prusia (PB) se llevó a cabo para evaluar el marcaje.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Las imágenes de microscopía óptica presentadas en las figuras 7.36 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K Y L muestran el comportamiento de las células durante el proceso de internalización de las NPs core-shell en ausencia y en presencia de PLL, a las 0 h (t_0), a las 24 h de incubación (t_{24}) y tras los lavados de las células con medio, respectivamente. A tiempo t_0 se observa que las NPs no se han agregado en el medio de cultivo, trascurridas las 24 h de incubación siguen estando estables, sin embargo la muestra de PLL con NPs indica la internalización del material en las células MSCs. Mientras que tras los lavados es evidente la diferencia entre las células que fueron incubadas con los sistemas coloidales $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ sin y con 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLL, en el primer caso no se observa con claridad la presencia de NPs cerca del núcleo, indicando que no se internalizaron o bien que no se encuentran en el citoplasma, caso contrario con los materiales $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}+\text{PLL}$ donde las NPs se encuentran alrededor del núcleo, lo cual implica que la presencia de la proteína PLL promueve la internalización apropiada de las estructuras core-shell en las células troncales mesenquimales. Es importante puntualizar que en ninguna fase del proceso se observan agregados de las NPs core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$, manteniéndose intactas las células, por lo tanto el material es biocompatible al no provocar citotoxicidad, ni muerte celular.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

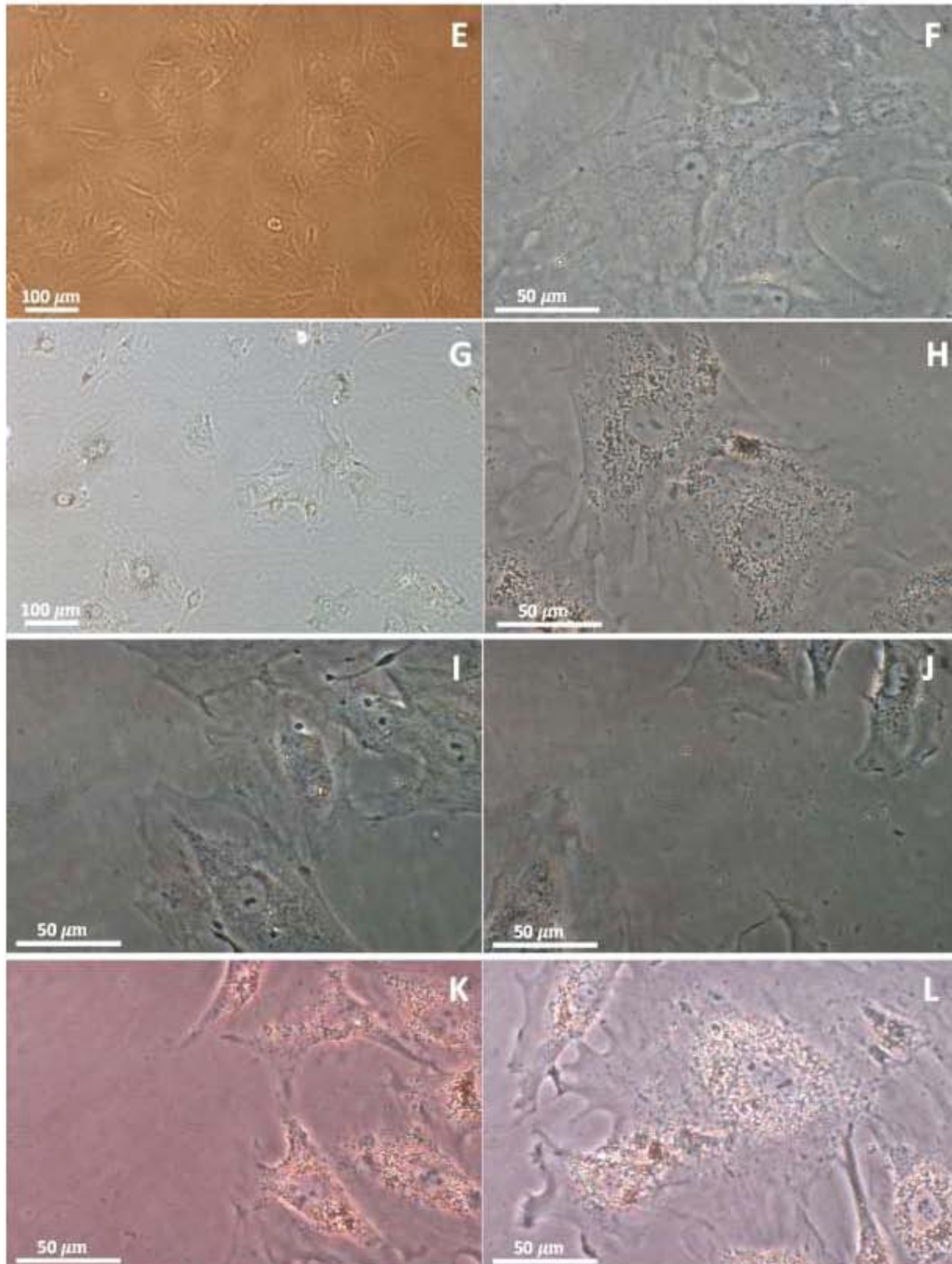


Figura 7.36. Marcaje celular de MSCs con el ferrofluido de estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n\text{@C}$ en agua. **(A-B)** t_0 en ausencia de PLL; **(C-D)** t_0 con $1.5 \mu\text{g/mL}$ de PLL; **(E-F)** t_{24} en ausencia de PLL; **(G-H)** t_{24} con $1.5 \mu\text{g/mL}$ de PLL; **(I-J)** tras los lavados en ausencia de PLL; **(K-L)** tras los lavados con $1.5 \mu\text{g/mL}$ de PLL.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Sabiendo que la adición de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de (PLL) mejora la internalización de las NPs en las células, se comprobó la interacción de estos sistemas $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@\text{C}$ con el colorante azul de Prusia, utilizado para detectar e identificar el ión férrico (Fe^{3+}) presente en el óxido de hierro (magnetita) de las NPs multicore. De esta forma las células control no presentan tinción mediante PB, al haber sido incubadas en ausencia de NPs, figura 7.37 A y B, por su parte las NPs magnéticas se tiñeron de color azul observándose bien dispersas alrededor del núcleo celular sin afectar la morfología de las células, sin embargo no todo el hierro se tiñe, ya que el recubrimiento de carbón aísla los núcleos de magnetita del interior, impidiendo que el colorante difunda, por lo que no se conoce con certeza cuantas nanopartículas se encuentran en la célula (figura 7.37 C y D).

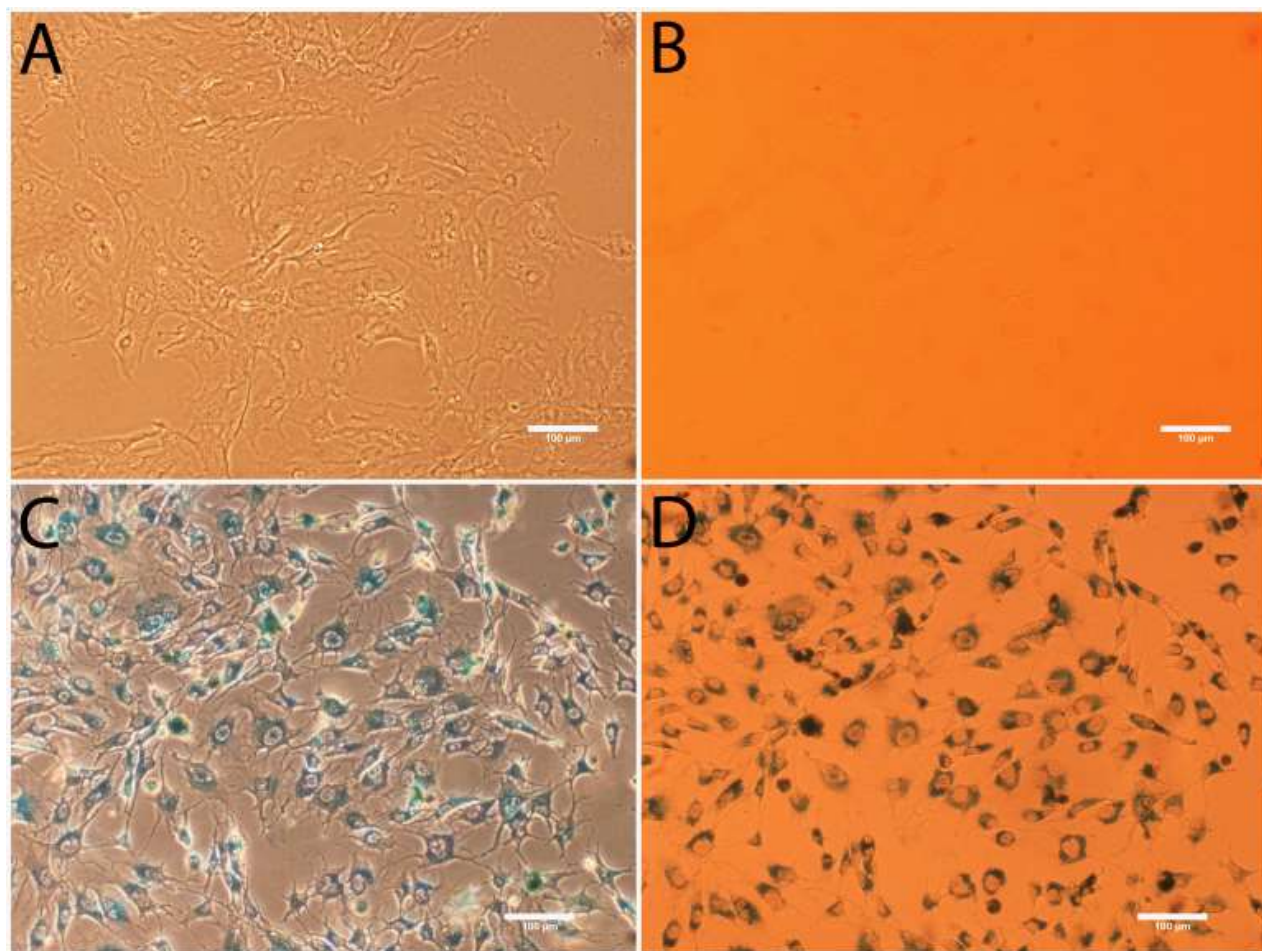


Figura 7.37. El marcaje de las células MSCs con NPs en combinación con PLL. **(A-B)** Contraste de fases y microscopía óptica de campo brillante, respectivamente, de las células no marcadas. **(C-D)** Contraste de fases y microscopía óptica de campo brillante de las células MSCs incubadas con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del ferrofluido $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@\text{C}$ y 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLL, respectivamente. Escala 100 μm .

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

En el segundo ensayo se estudiaron los efectos de la concentración de las nanopartículas, todas fueron incubadas en presencia de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLL, con la finalidad de corroborar su biocompatibilidad y estabilidad. Se partió de dos concentraciones iniciales desconocidas de las cuales se realizaron las diluciones descritas en la metodología, figura 7.38.

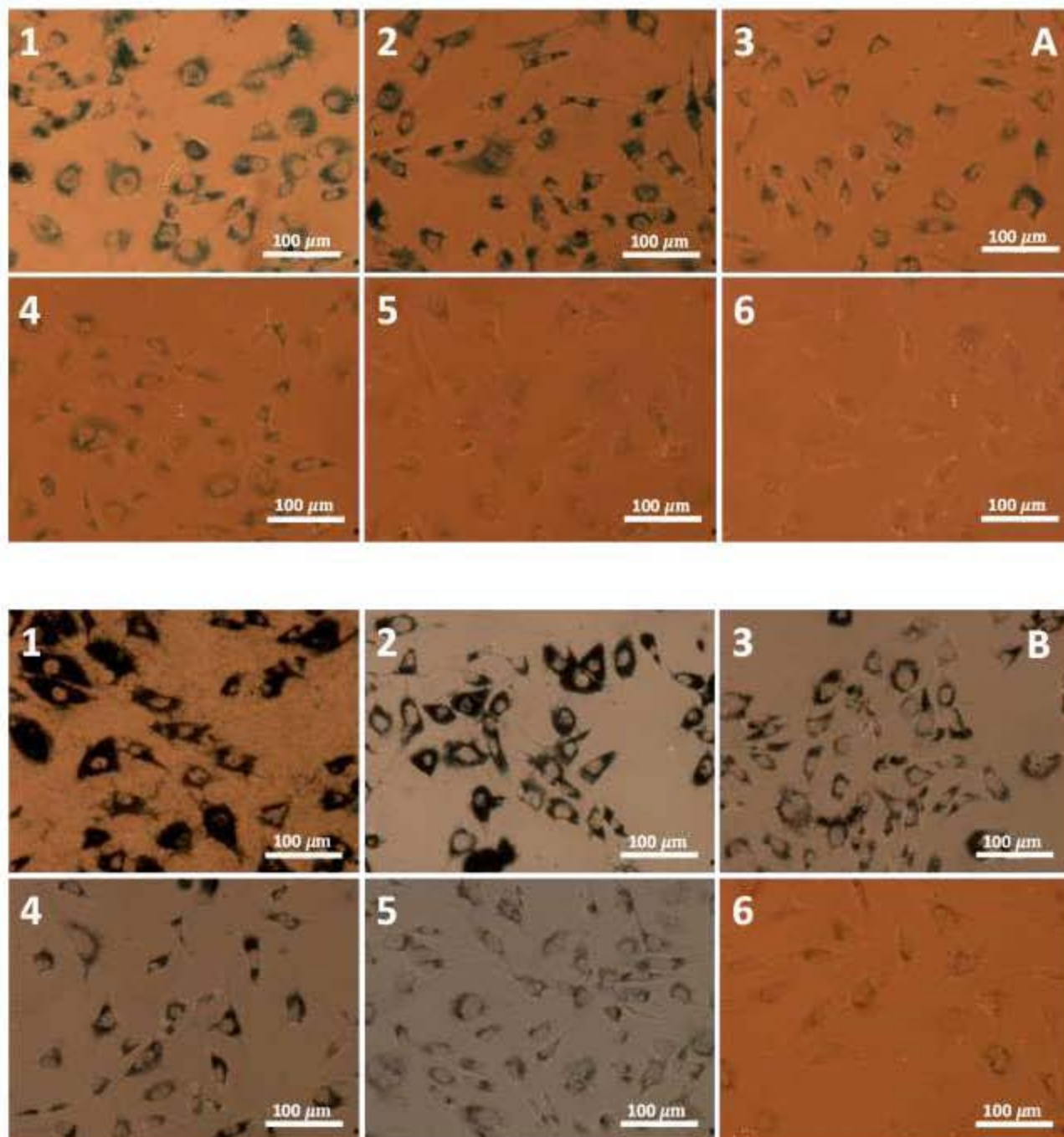


Figura 7.38. El marcaje de las células MSCs con NPs en combinación con PLL a diferentes diluciones **(A)** disolución 1 y **(B)** disolución 2.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

De este segundo experimento, se demostró que las nanopartículas no se agregan al estar en contacto con el medio de cultivo, existe una correlación entre concentración de las MNPs y el porcentaje de internalización celular. Sin embargo en la figura 7.38 B1 (la más concentrada de la disolución 2) se observan muchas NPs presentes en el medio de cultivo que no fueron internalizadas por las células, aún tras los lavados, debido a que la concentración de NPs es tan elevada que hay una saturación en el medio y por lo tanto, las células no son capaces de internalizar tal cantidad.

7.2.3. Estudio por MRI de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@\text{C}$

La imagen por resonancia magnética (MRI) T_2 y T_2^* se llevó a cabo a 9.4 T (BrukerBiospec) sobre un set de halos de agar cargados a diferentes concentraciones de Fe (0.0025 a 0.25 mM), como se muestra en la figura 7.39, presentando un excelente contraste T_2 y T_2^* para concentraciones de NPs mayores de 5 nM.

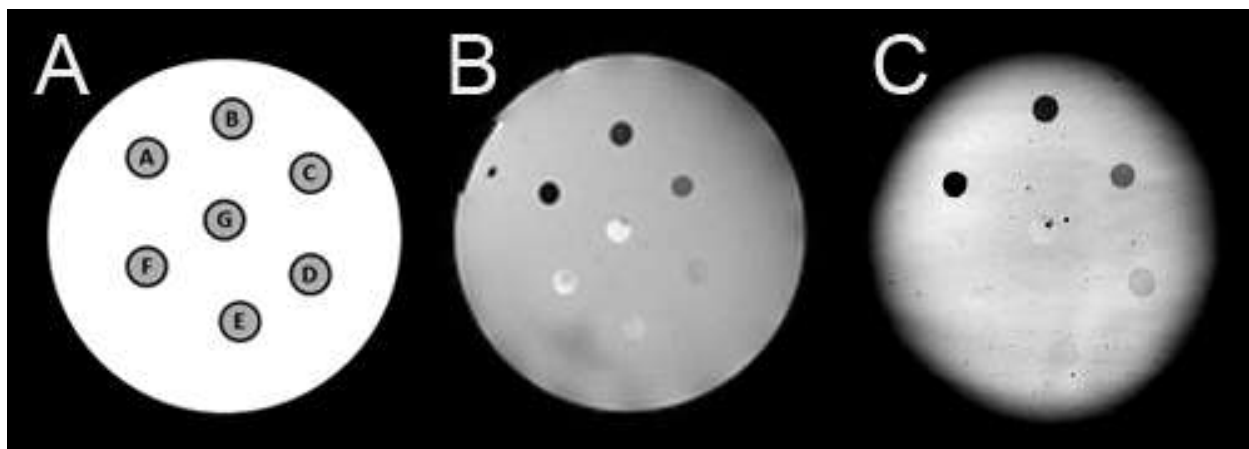


Figure 7.39. Halos de agar a diferentes concentraciones de Fe. (A) Esquema de la distribución de concentraciones de NPs en el halo: A=0.25mg/mL; B=0.1mg/mL; C=0.05mg/mL; D=0.025mg/mL; E=0.005mg/mL; F=0.0025mg/mL and G=0mg/mL. (B) Imagen ponderada de MR T_2 del halo de agar. (C) Imagen ponderada de MR T_2^* del halo de agar.

La velocidad de relajación transversal (r_2) obtenida a partir del experimento fue de $218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, figura 7.40, mostrando un valor superior a los productos comerciales tales como Resovist o Endorem, que al dispersarse en agua presentan un r_2 de $54 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $185 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ en función del campo magnético aplicado ($0.47\text{T} - 4.7\text{T}$)¹⁷⁸. La diferencia entre ambos, se puede atribuir parcialmente a las diferencias de

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

intensidad del campo magnético MRI, a la preparación de la muestra, a los halos de agar y a la dispersión de agua, respectivamente.

Cabe destacar, que se hallaron diferencias de contraste reducido a concentraciones bajas de NPs (entre 0,5 nM y 2,5 nM) y también a 0 mM (sin NPs), debido a que los parámetros de adquisición para MRI de T_2 y T_2^* fueron optimizados para altas concentraciones de NPs (ver figura 7.39). Esto da lugar a un valor anómalo inicial de $r_2 = 1634 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para $\Phi \leq 0.025 \text{ mM}$, sin precisión física. Por lo tanto, estos datos fueron excluidos del cálculo de la $r_2 = 218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ con el fin de obtener un valor optimizado.

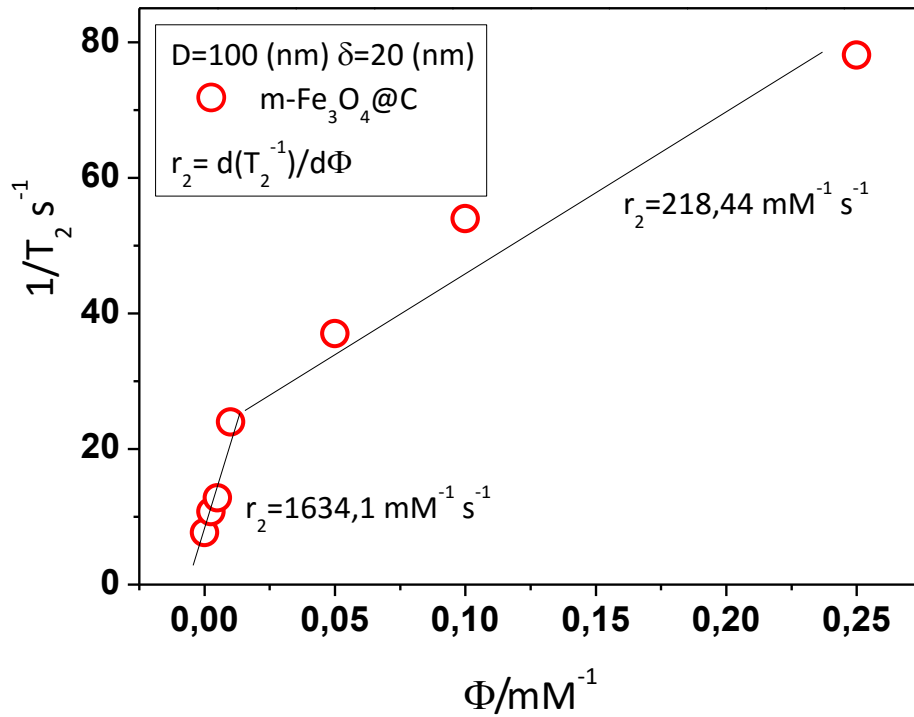


Figura 7.40. Capacidad de relajación calculada a partir de T_2 (MRI) realizada a 9.4T sobre halos de agar cargados con diferentes concentraciones de NPs core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$ en agua.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.3. ENSAYO *IN VIVO*, CITOTOXICIDAD, MARCAJE CELULAR Y RESPUESTA MRI DEL NANOCOMPOSITE MAGNÉTICO SBA-15@GLICEROL/Fe₃O₄@SiO₂ FUNCIONALIZADO CON NH₂ Y CH₃ (MNCN1_{HP}), PARA SU APLICACIÓN EN ISQUEMIA CEREBRAL. Experimentos realizados en el Clinical Neurosciences Research Laboratory del Hospital Clínico Universitario por el Dr. Andrés Alexander Da Silva Candal.

7.3.1. Estudio *in vivo*

Para conocer los efectos que el material MNCN1_{HP} (SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizada con NH₂ y CH₃) pueda tener sobre los sistemas *in vivo*, se estudió su biocompatibilidad como se describió anteriormente en la metodología. Se aplicaron dos tipos de inyecciones intraarterial e intravenosa (figuras 7.41 y 7.42), en cada rata macho. A continuación se muestran las imágenes obtenidas por resonancia magnética de cerebro a $t_0 = 20$ min y $t_{24} = 24$ horas, tiempos críticos para presentar señales de rechazo o incompatibilidad.



Figura 7.41. Imágenes de resonancia magnética de cerebro de una rata macho tras inyección intraarterial (a) secuencia T₂ a $t_0 = 20$ minutos, (b) secuencia T₂* a $t_0 = 20$ minutos, (c) secuencia T₂ a $t_{24} = 24$ horas y (d) secuencia T₂* a $t_{24} = 24$ horas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

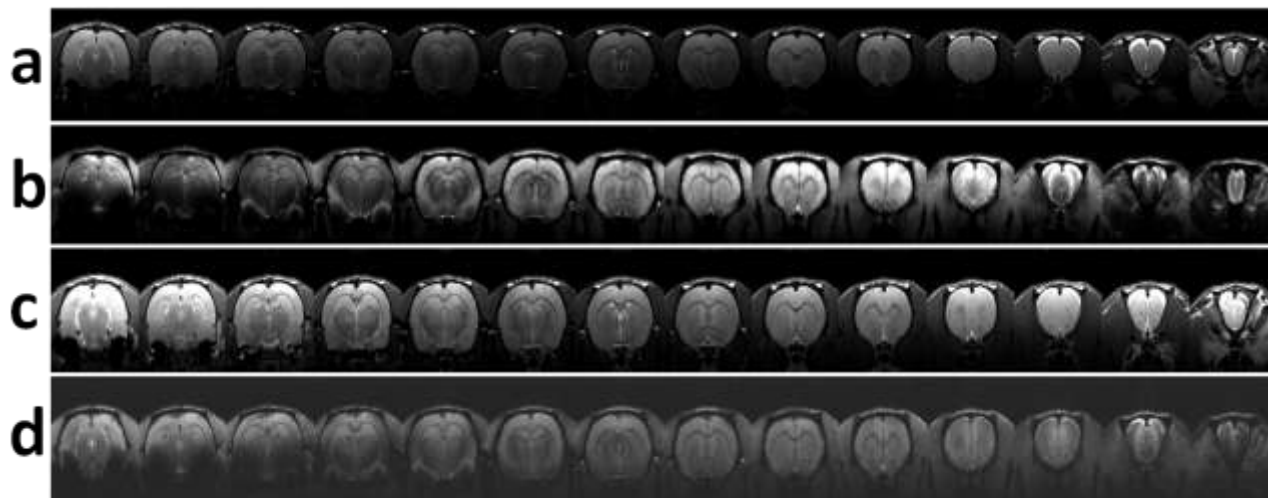


Figura 7.42. Imágenes de resonancia magnética de cerebro de una rata macho tras inyección intravenosa (a) secuencia T_2 a $t_0 = 20$ minutos, (b) secuencia T_2^* a $t_0 = 20$ minutos, (c) secuencia T_2 a $t_{24} = 24$ horas y (d) secuencia T_2^* a $t_{24} = 24$ horas.

Las imágenes por MRI a tiempo cero (t_0) y a las 24 h, muestran aparentemente la ausencia de NPs en el cerebro, sin embargo, el hecho de que no se vean en MRI no significa que no estén presentes, esto podría ser porque no hay un número suficiente para mostrar contraste. Lo importante es que no se observan daños en el parénquima cerebral, lo que parece indicar que las NPs no ocasionan la oclusión de los vasos, lo que podría llegar a causar lesiones isquémicas. Así mismo, tampoco se aprecia edema en el hemisferio derecho como resultado de la administración.

Los animales se evaluaron durante un periodo de 14 días para corroborar que se encontraran en condiciones óptimas. Los animales exhibían un comportamiento normal, sin signos de deficiencias respiratorias, ni alteraciones motoras. Tras dos meses las ratas macho continuaban mostrando un comportamiento normal.

Para estudiar la capacidad del NC ($MNCN1_{HP}$) como agente de contraste para MRI, se realizó una inyección intraparenquimal, en la cual se inyectaron 10 μ L de una solución de NPs mesoporosas magnéticas en suero salino a 0.4 mM de Fe, ésta se realizó directamente en el hemisferio derecho del cerebro de la rata macho, el mismo procedimiento se llevó a cabo en el hemisferio izquierdo donde se inyectó suero salino como control.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tras la administración intraparenquimal, se observó en el hemisferio derecho un aumento del contraste, el cual estuvo dado por el contenido de hierro presente en la magnetita anclada al SBA-15; por su parte, el hemisferio izquierdo no presentó contraste, como se esperaba. El contraste obtenido en la secuencia T_2^* es mayor que el obtenido en la secuencia T_2 (en la secuencia T_2 se exagera más la señal del hierro), evidenciando claramente el contraste en la zona de inyección, figura 7.43. Por lo que se confirma que una acumulación suficiente de NPs en el parénquima cerebral permite su detección por medio de MRI.

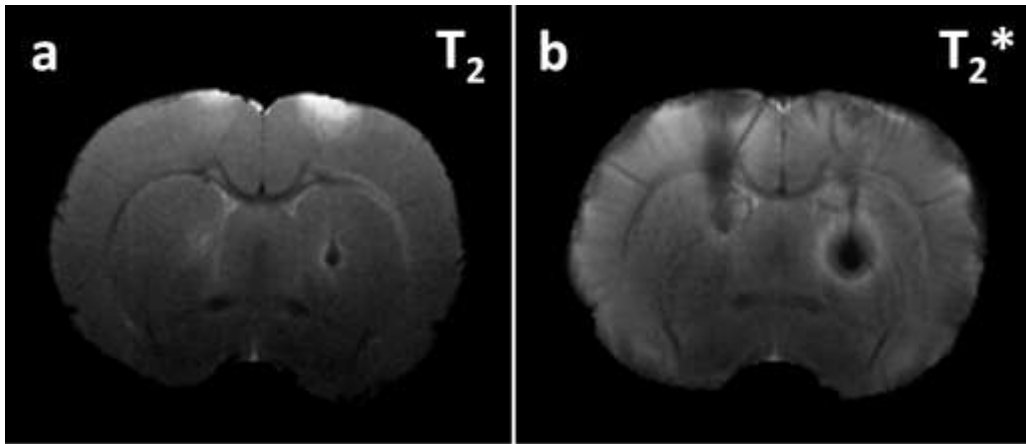


Figura 7.43. Imágenes de resonancia magnética de cerebro de una rata macho tras inyección intraparenquimal (a) secuencia T_2 y (b) secuencia T_2^* .

7.3.2. Estudio *in vitro*, efectividad del NC MNCN1_{HP} en el marcaje celular.

Para realizar los experimentos *in vitro* se utilizaron células endoteliales de la microvasculatura cerebral Bend.3, figura 7.44 (a), las células endoteliales de cerebro son las células objetivo en la búsqueda de un tratamiento en un cuadro de isquemia cerebral, de esta forma, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-CD31 (PECAM-1) producido en ratón para asegurar que el estudio se realizaba en presencia de células endoteliales, figura 7.44 (b). El anticuerpo se utiliza en el marcaje específico de la proteína transmembrana CD31. La CD31 participa en las interacciones adhesivas entre las células endoteliales adyacentes, así como entre los leucocitos y las células endoteliales. Se une tanto de manera homofílica como heterofílica, entre los ligandos heterofílicos, se encuentran los glucosaminoglicanos de heparan sulfato, la heparina y la integrina $\alpha_v\beta_3$. La CD31 se expresa en todo el endotelio continuo, como el de arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. Asimismo, se expresa difusamente en las superficies de los megacariocitos, plaquetas, células mieloides, linfocitos citolíticos naturales y algunos subgrupos de células T, así como en las células B precursoras¹⁷⁹.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

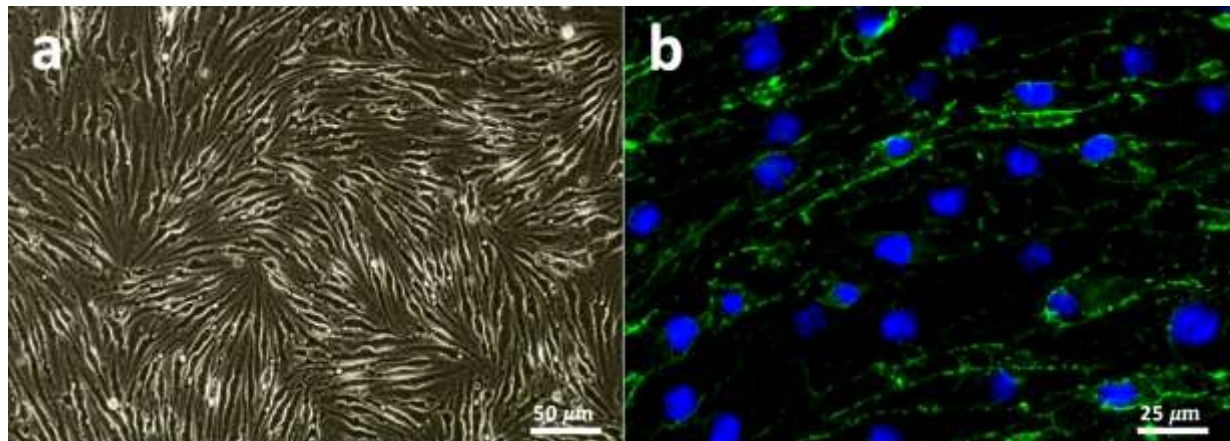


Figura 7.44. Células endoteliales **(a)** de la microvasculatura cerebral Bend.3 y **(b)** en presencia del anticuerpo específico para CD31.

Para su estudio como marcadores celulares, las células se incubaron en presencia de las NPs mesoporosas magnéticas (MNCN1_{HP}) y se tiñeron con azul de Prusia para identificar el ion Fe^{3+} presente en la magnetita. Tras 24h de incubación se lavaron las células para eliminar el exceso de NPs en el cultivo, posteriormente las células se dejaron durante otras 12 h en incubación para asegurar la completa internalización de las NPs.

En el grupo de células con la mayor concentración 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, figura 7.45 A, se observaron agregados de NPs que persistieron aún después de los lavados, debido a la elevada concentración de NPs con las que se cultivaron las células, al final es difícil conocer la situación real con respecto a las células, debido a que los agregados impiden observar con claridad lo que está ocurriendo. Conforme disminuye la concentración de NPs presentes en el medio, se puede apreciar una mejor distribución de las mismas en el interior del citoplasma de las células, y la ausencia de éstas en el núcleo.

Otro punto a destacar visualmente hablando (exceptuando las células con la máxima concentración de NPs), es que preservan sus características y su morfología original, así, la absorción de las NPs por éstas no se ve afectada por los cambios en la concentración, habiendo aparentemente la misma cantidad internalizada a las concentraciones de 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figuras 7.45 B, C y D), micrografías que fueron tomadas a 10X, 20X y 40X aumentos. El tamaño, la funcionalización superficial, y la morfología de las NPs juega un papel fundamental en la internalización y biocompatibilidad de las mismas. Por lo tanto, estas nanoestructuras innovadoras de diseño único funcionan perfectamente como sistemas para marcaje celular y como nanodispositivos de alta tecnología para aplicaciones biomédicas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

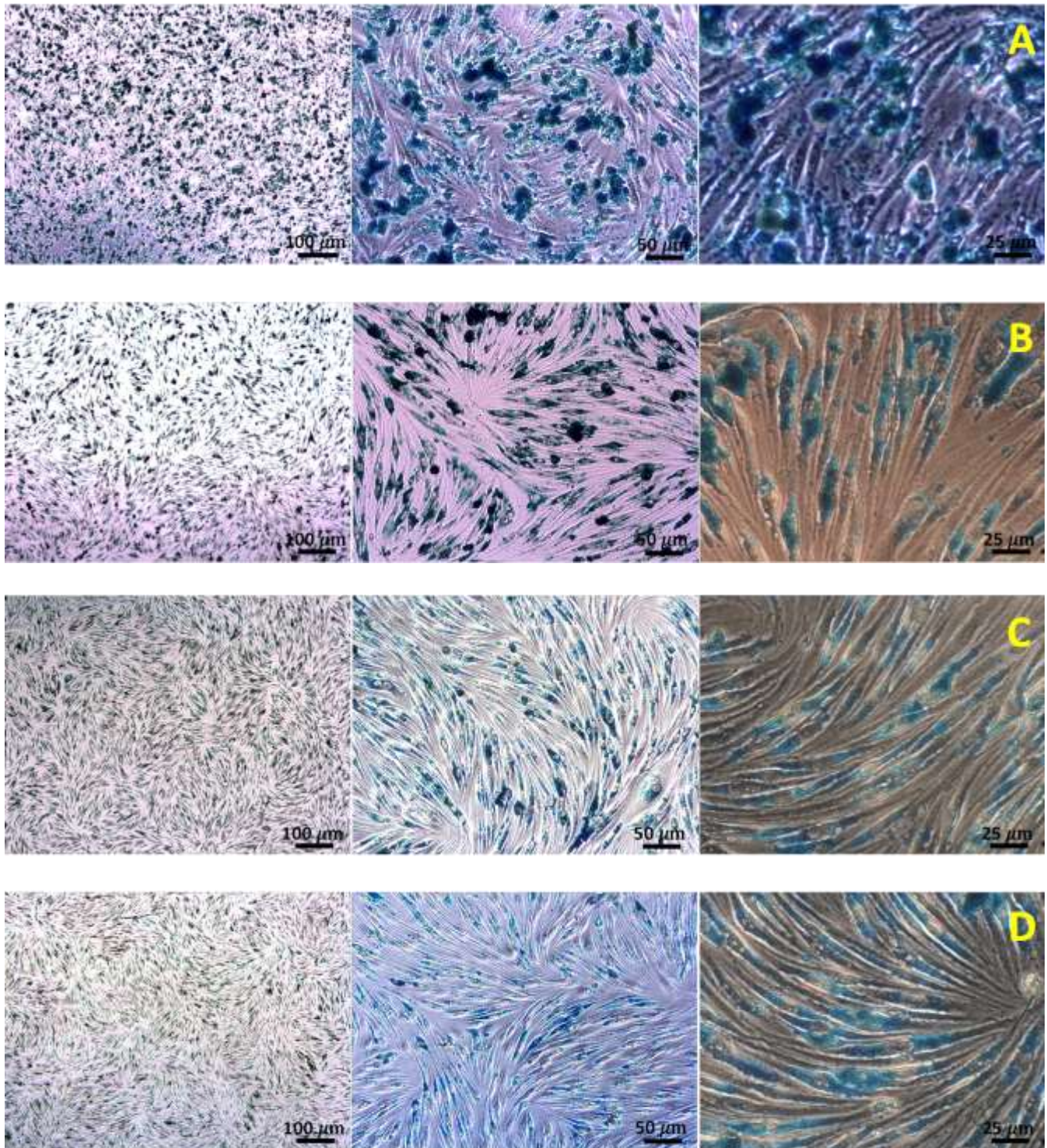


Figura 7.45. NPs mesoporosas magnéticas internalizadas en las células endoteliales: **A** = 400 µg/mL, **B** = 200 µg/mL, **C** = 100 µg/mL y **D** = 50 µg/mL.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.3.3. Ensayo de citotoxicidad por análisis de Lactato Deshidrogenasa

La medida de la actividad de la LDH es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que se han visto afectadas por un agente tóxico, de esta forma una mayor absorbancia a 490 nm será un indicativo de mayor toxicidad.

Para realizar este experimento, se utilizó un grupo de células control sin NPs y un grupo de células muertas que fueron tratadas con una solución que causa lisis celular. En el ensayo de toxicidad por LDH, figura 7.46, se observa un incremento en la muerte celular en el grupo de células que fueron incubadas con una concentración elevada de NPs (400µg/mL), mientras que el resto de los grupos mantienen unos niveles similares al control. Lo que nos indica que sólo se presenta un efecto citotóxico en contacto con altas concentraciones de NPs, mientras que a concentraciones más bajas las células responden con una buena biocompatibilidad.

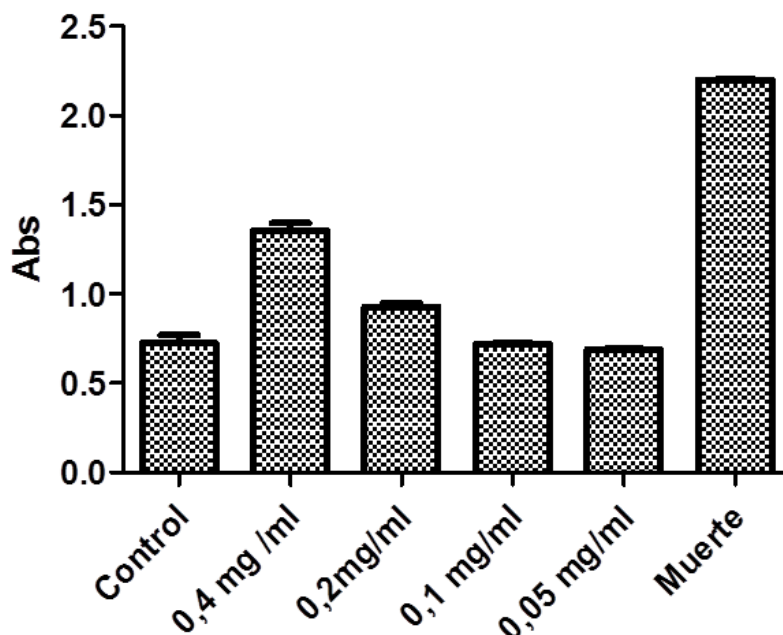


Figura 7.46. Ensayo LDH para determinar la citotoxicidad del NC (MNCN1_{HP}) a distintas concentraciones.

7.3.4. Estudio por RMI del NC MNCN1_{HP}

La imagen por resonancia magnética T₂ y T₂* se llevó a cabo a 9.4 T (BrukerBiospec) sobre un set de halos de agar cargados a diferentes concentraciones de NPs (0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 y 0.005 mM de Fe),

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

como se muestra en la figura 7.47, presentando un buen contraste T_2 y T_2^* para concentraciones de NPs mayores a 5nM.

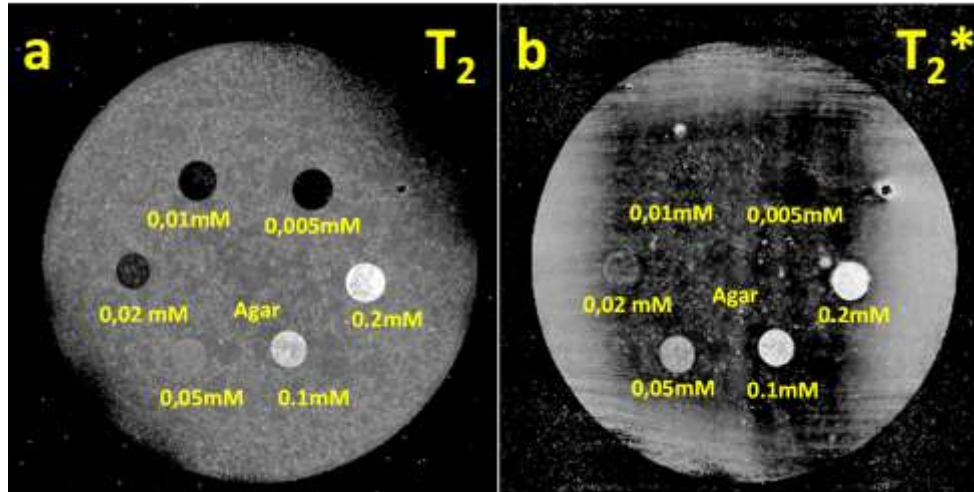


Figure 7.47. Halos de agar a diferentes concentraciones de NPs. (a) Imagen ponderada de MR T_2 y (b) Imagen ponderada de MR T_2^* .

Al igual que los datos analizados en el apartado 7.2.3, se puede decir que el valor obtenido para este material resulta ser bueno, considerando que sólo posee alrededor de un 5% en peso de Fe, lo que implica que la magnetita presente en el NC se encuentra en una posición y situación favorecedora, que le permite brindar una buena respuesta por MRI, obteniéndose un valor de $r_2 = 113.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, figura 7.48.

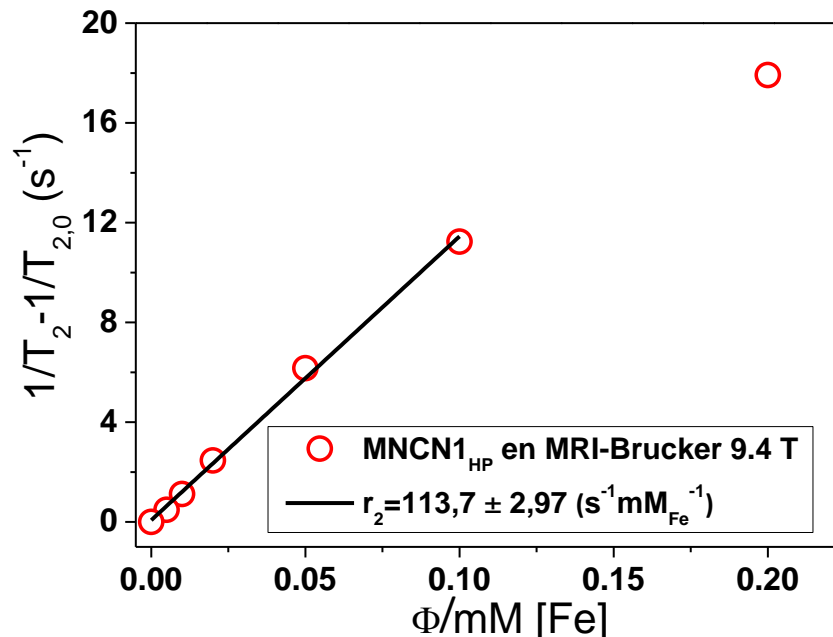


Figura 7.48. Capacidad de relajación calculada a partir de T_2 (MRI) realizada a 9.4T sobre halos de agar cargados con diferentes concentraciones de NPs MNCN1_{HP} en agua.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

7.4. HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Para poder conocer y comparar la capacidad de estos materiales como dispositivos para hipertermia, es necesario obtener el valor de la tasa de calentamiento específica para cada material (SAR).

Para demostrar como el valor del SAR se ve afectado al funcionalizar o recubrir las nanopartículas superparamagnéticas de magnetita, se compararon tres materiales, magnetita desnuda, Fe_3O_4 funcionalizada con PAA y estructuras moncore-shell de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, todas ellas dispersas en medio acuoso, figura 7.49. Se observa que la magnetita desnuda presenta una excelente difusión térmica, correspondientemente al valor de SAR más elevado 115 W/g, seguido del material funcionalizado con PAA con un valor de 20 W/g, el cual disminuyó drásticamente debido a la presencia del PAA, sin embargo la capa de SiO_2 provoca que estas estructuras no presenten respuesta térmica, al actuar como aislante térmico. De esta forma será más fácil interpretar el comportamiento de los nanocomposites magnéticos de sílice mesoporosa.

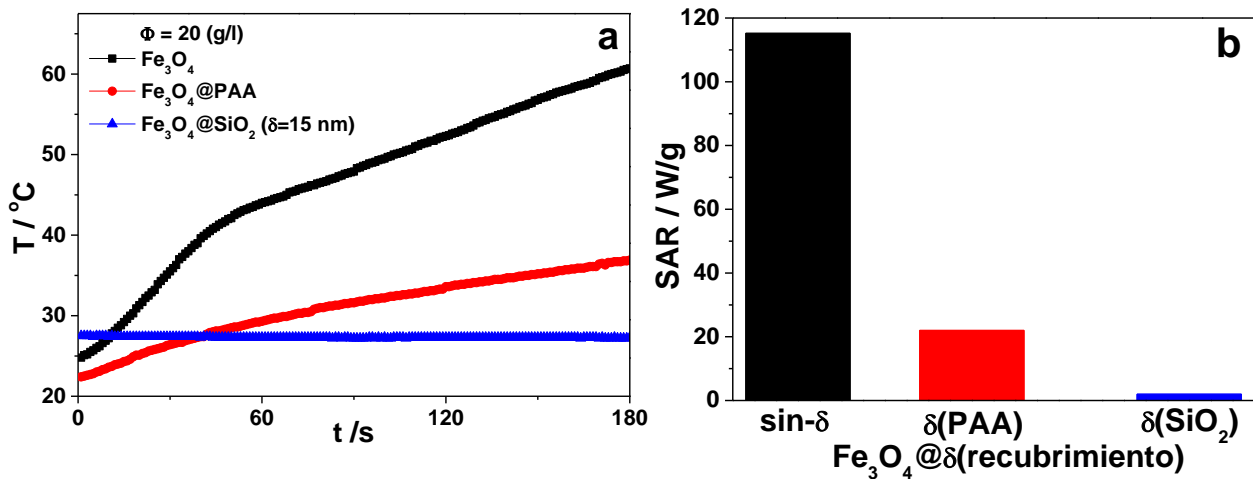


Figura 7.49. a) Calentamiento de NPs de magnetita expuesta a un campo de $H=30$ mT y frecuencia $f=293$ kHz. b) SAR (specific absorption rate) tasa de calentamiento específica, correspondiente a la curva de a)

El SAR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$SAR = \frac{\rho_{sol} c_{sol}}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Donde ρ_{sol} es la densidad gravimétrica del agua, c_{sol} la capacidad calorífica específica del agua, Φ la concentración de masa de magnetita por volumen de disolución (mg/mL), los valores utilizados para cada parámetro correspondientes al medio acuoso, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7.7. Valores de los parámetros del H₂O utilizados para calcular el SAR de cada material.

Parámetros	H ₂ O, $\Phi=20$ (g l ⁻¹)
ρ (g l ⁻¹)	1000
η (mPa s ⁻¹)	1
C (J g ⁻¹ K ⁻¹)	4.190

A continuación se presentan las curvas de calentamiento de los nanocompuestos magnéticos expuestos a un campo de H=30 mT y frecuencia f=293kHz. En la figura 7.50 se observa que los NCs que presentan una respuesta térmica, son los que poseen magnetita anclada externamente¹⁸⁰, mientras que los nanosistemas donde la magnetita se sintetizó en el interior de los canales del material SBA-15, muestran una respuesta nula debido a la capacidad de las cerámicas mesoporosas como materiales superaislantes¹⁸¹, lo que impide que el calor difunda al exterior.

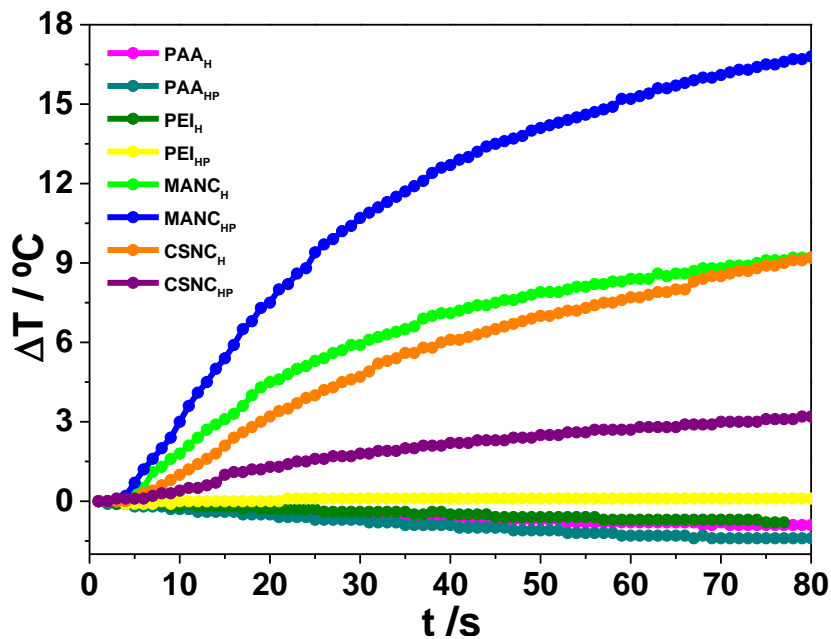


Figura 7.50. Calentamiento de los NCs magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄@PAA_PEI y SBA-15/Fe₃O₄@C) expuestos a un campo de H=30 mT y frecuencia f=293kHz.

La figura 7.51 representa las curvas de calentamiento de todos los NCs diseñados a partir de SBA-15 y Fe₃O₄ recubierta con SiO₂, en los cuales se incluyen los materiales funcionalizados con diversos grupos

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

amino. Se observa un comportamiento muy similar entre los NCs LMNC y MNCN, debido a que todos estos materiales se sintetizaron utilizando una dilución 1:5 de una dispersión de magnetita en ciclohexano, presentando una respuesta térmica baja, al incrementar la cantidad de magnetita presente en los NCs la respuesta térmica es mayor aunque moderada, aún cuando la magnetita se encuentra anclada en la superficie exterior de la sílice mesoporosa.

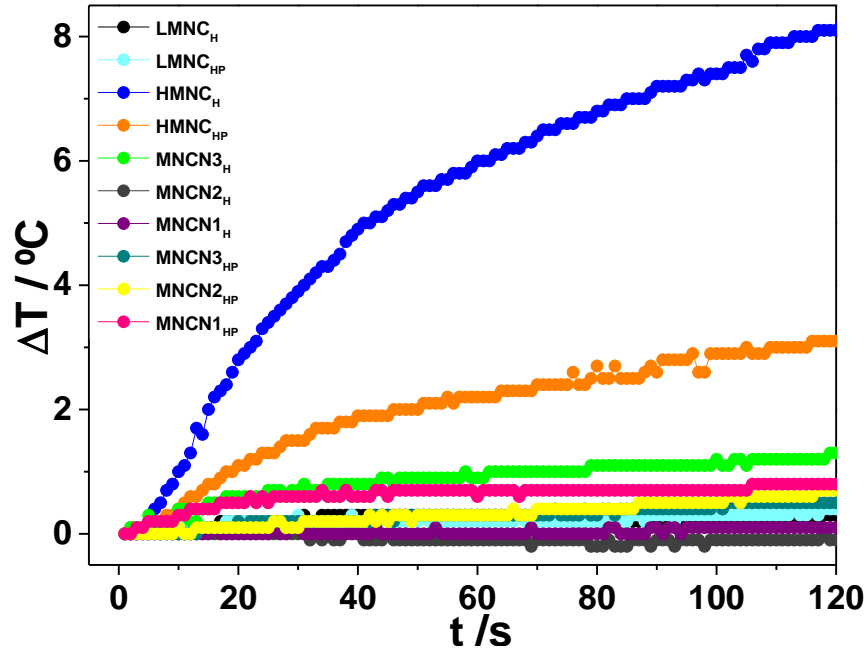


Figura 7.51. Calentamiento de los NCs magnéticos (SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ y SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂ funcionalizado con NH₂) expuestos a un campo de H=30 mT y frecuencia f=293kHz.

Para poder calcular el SAR de los nanocomposites desarrollados a partir de la sílice mesoporosa ordenada y magnetita, la ecuación del SAR se tiene que modificar para adaptarse a los parámetros que mejor describen estos sistemas, la nueva ecuación se presenta a continuación:

$$SAR = \frac{P}{m_{NP}} = \frac{Q/\Delta t}{m_{NP}} = \frac{m_{NP}c_{NP} + m_{si-mesop}c_{si-mesop}}{m_{NP}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_0$$

En la que la capacidad calorífica efectiva de la sílice mesoporosa, $c_{si-mesop}$, se ha estimado siguiendo una relación¹⁸⁰ dada por la porosidad, ε , la capacidad calorífica del aire c_{aire} y de la sílica masiva c_{silica} :

$$c_{si-mesop} = \varepsilon c_{aire} + (1 - \varepsilon)c_{silica}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tomando una porosidad de $\varepsilon = 0.8$, $c_{aire} = 1.005 (J/gK)$ y $c_{silica} = 0.746 (J/gK)$ se obtiene un valor efectivo para la sílica mesoporosa de $c_{si-mesop} = 0.95 (J/gK)$, valor que se ha usado en el cálculo del SAR de todos los NCs magnéticos que presentan respuesta térmica, aunque ésta sea mínima, figura 7.52.

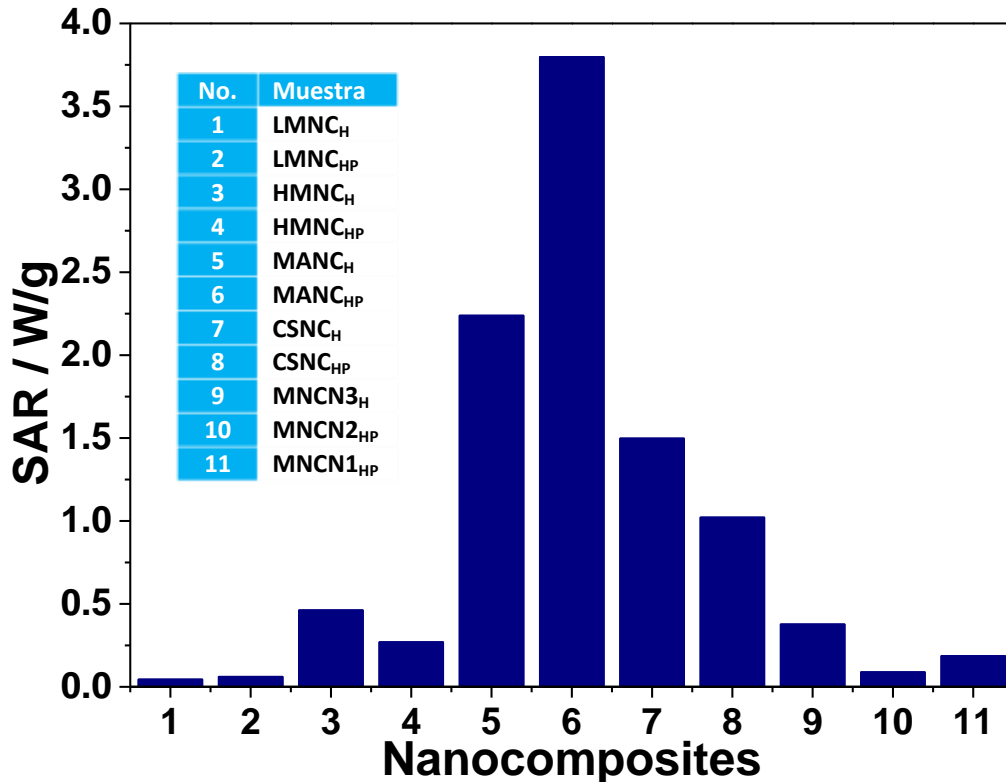


Figura 7.52. Tasa de calentamiento específica (SAR) correspondiente a las curvas de calentamiento 7.49 y 7.50 de los nanocomposites magnéticos.

El estudio de hipertermia magnética de los nanocomposites magnéticos se llevó a cabo a partir de las muestras sólidas en polvo, lo que puede cambiar la manera en la que responden los materiales al ser sometidos a un campo alterno. En estas condiciones de los dos mecanismos de relajación que se espera contribuyan al calentamiento por hipertermia magnética, sólo la relajación de Néel puede darse, ya que las NPs de magnetita para todas las muestras se encuentran firmemente ancladas a la superficie interna o externa del material mesoporoso. De esta manera, la rotación física completa de la partícula bajo la acción de un campo magnético externo alterno, no puede darse y se pierde la contribución al calentamiento de la relajación de Brown, lo que en parte explica los valores tan bajos de SAR obtenido para todas las muestras. En la figura 7.52, se presentan los materiales que muestran una tasa de calentamiento específica diferente de cero, por lo tanto, aunque moderada pero poseen una respuesta térmica.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APLICACIONES BIOMÉDICAS

De las imágenes MET/MEB de los materiales MANC (SBA-15/Fe₃O₄@C), se observa una morfología general constituida por filamentos alargados y cilindros curvados donde toda la magnetita (multi-core) se deposita en forma de agregados sobre las superficie de la sílice mesoporosa distribuida de manera no homogénea. El SAR obtenido para estos materiales, se encuentra entre [2-4] (W/g) mucho menor a los observados en medio acuoso, primero porque la medición en sólido no permite que puedan darse interacciones que en un medio acuoso estarían presentes y, en segundo, aunque la magnetita se haya dispersa a lo largo de la superficie externa, la presencia de filamentos o cilindros de SBA-15 en las proximidades de estos cúmulos, produce un efecto aislante, impidiendo la difusión efectiva del calor bajo la acción de un campo magnético alterno.

En concordancia con lo anterior, los materiales CSNC poseen la misma composición química que los MANC (SBA-15/Fe₃O₄@C), sin embargo, aunque parten de los mismos precursores de sílice mesoporosa, la mayoría de la magnetita ya no se encuentra en forma de cúmulos, sino formando una segunda nanoestructura tipo core-shell (Fe₃O₄)_n@C que se encuentra anclada a la superficie del SBA-15, de allí que el SAR obtenido para estos materiales [0.5-1] (W/g), sea menor que los correspondientes en MANC, dado que los únicos que contribuyen a la respuesta térmica son de aquellos cúmulos que no alcanzaron a formar la estructura core-shell. También esta tasa se ve afectada por la capa gruesa de C, que funciona a su vez como aislante térmico de las NPs de magnetita.

En cuanto a las muestras LMNC, HMNC y MNCN basadas en SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂, su SAR o tasa de calentamiento específica es aún más baja que en los casos anteriores, aunque la magnetita también se encuentra anclada a la superficie externa de la sílice mesoporosa, la diferencia es que se unen formando una monocapa de nanopartículas en forma de semi-core-shell entre la sílice mesoporosa y el recubrimiento de sílice amorfo (figura 7.53.), como se aprecia en la imágenes de MET/MEB. De esta forma, su movimiento queda aún más restringido que en los sistemas multicore. Además la difusión del calor es completamente distinta ya que el contacto entre las NPs y la sílice mesoporosa es mucho más directa, lo que le impide con mayor eficiencia difundir el calor.



Figura 7.53. Arreglo semi-core-shell de los NCs (SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂). NPs de magnetita totalmente rodeadas de material aislante, por un lado los filamentos de SBA-15 y por otro el recubrimiento de SiO₂ amorfa, lo cual restringe la difusión del calor hacia el exterior.

8. CONCLUSIONES

8.1. SBA-15 SINTETIZADO A BAJA TEMPERATURA

- 1) La síntesis del material mesoporo SBA-15 a baja temperatura permitió conservar la disposición hexagonal ordenada que presentan estos sistemas. La temperatura es un parámetro esencial en la síntesis de los materiales mesoporosos de sílice tipo SBA-15, ligeras modificaciones pueden dar origen a estructuras ordenadas o desordenadas de distintos tamaños y morfologías.
- 2) La funcionalización de las cerámicas mesoporosas con grupos nucleofílicos por el método de co-condensación, modificó su estructura y morfología. El porcentaje de funcionalización depende directamente del método empleado y del agente funcionalizante, razón por la cual se obtuvieron valores bajos en los materiales modificados con el grupo etilendiamino, dado que su presencia durante el proceso de síntesis del SBA-15, alteró las interacciones entre el surfactante y el precursor de sílice.
- 3) La funcionalización del SBA-15 por el método de co-condensación a bajas temperaturas dio origen principalmente a estructuras mesoporosas amorfas capaces de administrar fármacos o almacenar moléculas de interés biomédico, en comparación con los vidrios bioactivos convencionales que carecen de mesoporos.
- 4) La adición de NaCl en la fase inicial del proceso de síntesis del SBA-15, favoreció la formación de estructuras amorfas con morfologías similares a los biovidrios. El NaCl actuó como un modificador de la red de sílice rompiendo la estructura reticular de la misma y disminuyendo la condensación de los trialcoxisilanos hidrolizados.

8.2. NANOCOMPOSITES MAGNÉTICOS SBA-15/Fe₃O₄

- 5) Las disoluciones ácidas empleadas en el proceso de síntesis de las cerámicas mesoporosas ordenadas de sílice tipo SBA-15, jugaron un papel importante en la obtención de materiales con diversas propiedades y características, en función de la aplicación deseada.

- 6) Los materiales SBA-15 obtenidos con distintas morfologías, distribuciones de poro uniforme y elevadas áreas superficiales, fueron la clave para obtener NCs magnéticos multifuncionales e innovadores con mejores propiedades y prometedoras aplicaciones. El SBA-15 se utilizó como matriz de soporte tanto para llevar a cabo la síntesis de NPs de magnetita en el interior de sus poros, como para facilitar el anclaje covalente de las NPs a su superficie externa.
- 7) La caracterización fisicoquímica mostró que los NCs magnéticos poseen una distribución ordenada de poros con grandes áreas superficiales reactivas, excelentes diámetros de poro y respuesta superparamagnética (SPM). La mejor respuesta SPM la presentaron aquellos materiales que poseen NPs de magnetita anclada en el exterior de la matriz mesoporosa, incluso mejor que muchos de los NCs SBA-15/Fe₃O₄ reportados en la literatura.
- 8) El diseño y desarrollo innovador de los materiales SBA-15/Fe₃O₄@SiO₂ y SBA-15/Fe₃O₄@C, conjuntaron en un solo material, las propiedades destacables tanto del SBA-15 como de la magnetita. El diámetro de poro de los NCs, fue mayor que el de sus cerámicas precursoras, brindándoles mayor acceso y facilidad para albergar un gran número de moléculas de interés biomédico como fármacos, proteínas, genes, anticuerpos, entre otras, aún en las zonas más internas de los poros.

8.3. NANOCOMPOSITES MAGNÉTICOS FUNCIONALIZADOS SBA-15@GLICEROL/Fe₃O₄@SiO₂@NH₂

- 9) El método vanguardista presentado por primera vez de la síntesis de los nanocomposites SBA-15@glicerol/Fe₃O₄@SiO₂@NH₂, permitió un alto porcentaje de funcionalización de la superficie externa de los materiales mesoporosos, aún con grupos orgánicos de difícil incorporación como las aminas. De esta forma, fue posible funcionalizar las cerámicas en el mismo proceso de anclaje de las NPs magnéticas.

8.4. ANDAMIOS 3D

- 10) Se desarrolló un método que permitió crear *andamios* 3D con la finalidad de obtener implantes con una estructura porosa adecuada para su empleo en regeneración ósea.

- 11) Para la obtención de dispositivos para ingeniería de tejido óseo con una apropiada resistencia a la degradación, buena biocompatibilidad y mejores propiedades mecánicas. Por un lado, fue necesario combinar polisacáridos naturales con cargas opuestas para propiciar una mayor atracción entre ellos, promoviendo el entrecruzamiento a través de sus grupos funcionales NH_2 y OH , mediante la acción de la molécula BBDE. Y por otro, aún más importante, fue incorporar los NCs magnéticos a la formulación de los *andamios*, brindando gran cohesión y soporte; ya que al ser estructuras sólidas bien definidas e insolubles que presentan tanto orden (SBA-15) como cristalinidad (Fe_3O_4) y que además, poseen un gran número de grupos funcionales superficiales, favorecieron las interacciones internas de los *andamios*, reforzando su estructura e incremento sus propiedades.
- 12) El análisis de las microestructuras de los *andamios* indicaron la formación de poros menores a 10 nm hasta mayores de 200 μm . En comparación con otros andamios realizados (FF, USC) con la misma base polimérica e HA como componente mineral, donde sólo se obtuvieron poros por encima de 70 μm , se puede concluir, que el desarrollo de nuevos andamios 3D favorecerá que un gran número de procesos biológicos y químicos tengan lugar en los diversos tamaños y geometrías de sus poros, promoviendo la regeneración ósea.
- 13) La presencia de las cerámicas mesoporosas o los NCs magnéticos en la estructura del andamio 3D, proporcionó rugosidad y topografía al material final, brindando infinitos puntos de anclaje que facilitarán la adhesión y proliferación celular.
- 14) Los estudios de carga y liberación de simvastatina a partir de los *andamios* elaborados, mostraron una elevada capacidad de carga debida a la presencia del material SBA-15. Así como, una liberación controlada y prolongada que duró entre 700 y 1400 h, comparada con las 16 horas del proceso de liberación de ciprofloxacino a partir del andamio con HA.
- 15) En general, la obtención exitosa de *andamios* 3D a partir de cerámicas mesoporosas de sílice y de nanocompuestos magnéticos implicó el desarrollo de nuevos biomateriales de última generación aptos para aplicarse como andamios en ingeniería de tejido óseo que ostenten características de biocompatibilidad, bioactividad, biodegradabilidad, que en conjunto posean buenas propiedades mecánicas, y que además funcionan eficientemente como sistemas de

liberación controlada, evadiendo los problemas asociados con la aplicación de fármacos en prótesis o implantes.

8.5. NPs CORE-SHELL (Fe_3O_4) $_n$ @C

- 16) La poli-L-lisina evitó que las NPMs (Fe_3O_4) $_n$ @C se agregaran al estar en contacto con el medio de cultivo y durante el proceso de incubación con MSCs. Ayudó a las células a internalizar las NPs aún a altas concentraciones, por lo que, las células se marcaron de manera eficiente con azul de prusia.

- 17) A diferencia de la mayoría de los sistemas de NPs magnéticas aplicadas al campo biomédico, las estructuras core-shell (Fe_3O_4) $_n$ @C desarrolladas presentaron enormes ventajas, debido a que poseen múltiples núcleos de magnetita, lo que incrementó su respuesta magnética, además de estar recubiertas por una capa de carbono funcionalizada con grupos carboxílicos que impidió que las NPs se agregaran. Por otro lado las estructuras presentaron un tamaño ideal siendo internalizadas adecuadamente sin causar toxicidad o muerte celular, o evitando su eliminación a través del sistema inmunológico. También se comprobó su excelente capacidad como agente de contraste en RMI, dando una respuesta mayor que los materiales comerciales.

8.6. NCs MNCN1_{HP} (SBA-15@GLICEROL/ Fe_3O_4 @ NH_2 Y CH_3) PARA SU APLICACIÓN EN CEREBRO

- 18) El tamaño, la morfología y la funcionalización de este NC, permitió su eficiente inyección en ratas macho por diversas vías (intravenosa, intraarterial e intraparenquimal) sin provocar ninguna respuesta adversa o toxicidad. Convirtiéndolo en un material ideal para aplicaciones donde la única forma o la más sencilla de acceder al lugar de la lesión, trauma... sea a través de una inyección.

- 19) Mediante la inyección intraparenquimal se observó la capacidad del material MNCN1_{HP} como agente de contraste en cerebro, la cual se corroboró mediante halos de agar, donde se obtuvo un valor de r_2 adecuado a la cantidad de Fe presente en el NC.

20) El NC MNCN1_{HP} mostró mediante el ensayo LDH, una excelente biocompatibilidad con las células endoteliales, sólo presentó citotoxicidad a muy altas concentraciones de NPs. Su morfología y características facilitaron la completa internalización de estos nanosistemas, aún en altas concentraciones, resultado ser más eficientes en el proceso de marcaje celular con azul de Prusia que las estructuras core-shell, por lo tanto, son excelentes candidatos para diversas aplicaciones biomédicas que requieren de la detección de partículas.

8.7. HIPERTERMIA MAGNÉTICA

21) Los materiales desarrollados presentan un SAR bajo debido a que las NPs de magnetita se encuentran ancladas covalentemente a la superficie de micropartículas de SBA-15, lo que impide que la relajación de Brown pueda contribuir al calentamiento.

22) Las micropartículas de SBA-15 actuaron como superaislantes térmicos, impidiendo la difusión del calor generado por las NPs de magnetita, con el consiguiente resultado de un SAR bajo para la mayoría de los NCs. El recubrimiento (SiO₂ o carbono) y la funcionalización (PAA y PEI) de la magnetita también contribuyó al aislamiento del calor generado en el proceso de hipertermia magnética.

23) Los NCs desarrollados, dada su buena respuesta magnética y escasa actividad termomagnética son muy deseables para aplicaciones donde se busquen materiales que no produzcan aumentos de temperatura, debido a que el calentamiento produce efectos dañinos en las células, tejidos u órganos, como el cerebro.

9. PERSPECTIVAS A FUTURO

- 1) Se podrán obtener distintos materiales mesoporosos ordenados de sílice tipo SBA-15 con características y propiedades que dependerán de las aplicaciones deseadas.
- 2) Se podrán elaborar NCs que contengan diferentes concentraciones de NPs de magnetita para saber a que concentraciones son más eficientes.
- 3) En un futuro se pueden sintetizar nanocomposites magnéticos bifuncionales o trifuncionales, mediante la modificación orgánica tanto de la superficie interna, con algún grupo específico para captar una molécula a ser liberada de forma controlada; como de la superficie externa con otros grupos que promuevan la adhesión y proliferación celular tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*.
- 4) En un futuro se plantea realizar estudios de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de los andamios 3D desarrollados, para corroborar que la presencia de poros de tamaño micrométrico y nanométrico favorecerá la circulación de sustancias y acelerará el proceso de remodelación, favoreciendo la formación del hueso.
- 5) Por los resultados obtenidos de las estructuras core-shell $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_n@C$, se pueden probar distintos tamaños de sistemas core-shell para observar cuales presentan los mejores resultados, además de estar consideradas buenas candidatas para estudios *in vitro* - *in vivo* más extensos.
- 6) En un futuro se podría estudiar la hipertermia magnética de los NCs dispersos en medios acuosos (sangre, matriz extracelular, entre otros...), ya que la superficie magnéticamente activa recubierta por magnetita, dejaría de estar apantallada por todo la masa de partículas de SBA-15 y tendría una mejor difusión del calor al medio.
- 7) Para obtener una mejor respuesta por hipertermia se podría incrementar el tamaño de las NPs, procurando obtener NPs monodispersas aproximadamente de 20 nm, lo que mejoraría la eficiencia termomagnética de los NCs y preservaría el superparamagnetismo del material.
- 8) En un futuro se pueden anclar anticuerpos y grupos fluoróforos a los nanocomposites magnéticos.
- 9) También se podría realizar espectroscopia Mossbauer para determinar con exactitud la fase de hierro que se está obteniendo.

10. REFERENCIAS

1. Hernando-Grande, A. **Nanotecnología y Nanopartículas Magnéticas: la Física Actual en Lucha Contra la Enfermedad.** *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*. 2 (101), pp. 321-327, 2007.
2. Ramos, M., Castillo, C. **Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas.** *Ide@s CONCYTEG*. 6 (72), pp. 629-646, 2011.
3. Langer R. and Vacanti J. P. **Tissue Engineering.** *Science*. 260 (5110), pp. 920-926, 1993
4. Falke G.F. y Atala A. **Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular.** *Arch Argent Pediatr*. 98(2), pp. 103-105, 2000.
5. Yang S., Leong K. F., Du Z. and Chua C. K. **The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques.** *Tissue Eng*. 8(1), pp. 1-11, 2002.
6. Hardingham T., Tew S. and Murdoch A. **Tissue engineering: chondrocytes and cartilage.** *Arthritis Res*. 4(3), pp. S63-S68, 2002.
7. Skalak R. and Fox C. F. **Tissue engineering.** *Granlibakken, Lake Tahoe: Proc workshop; New York: Liss*, 1988.
8. Vallet-Regí M., Colilla M. and González B. **Medical Applications of Organic-Inorganic Hybrid Materials Within the Field of Silica-Based Bioceramic.** *Chem. Soc. Rev.* DOI:10.1039/C0CS00025F, 2011.
9. Williams D.F., Black J., Doherty P.J. **Second consensus conference on definitions in biomaterials. In: Biomaterials Tissue Interfaces.** *Elsevier*. pp. 525-33, 1992.
10. Vallet-Regí, M. y Ruiz-Hernández, E. **Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine** *Adv. Mater*. 23 (2011), pp. 5177–5218.
11. Vallet-Regí M., Munuera L. **Biomateriales: Aquí y ahora.** *Dykinson*. Madrid 2000.
12. Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. **Biomaterials developments for bone tissue engineering.** *Biomaterials*. 21 (2000), pp. 2347-59.
13. Arcos, D., Vallet-Regí, M. **Bioceramics for drug delivery.** *Acta Materialia*. 61 (2013), pp. 890–911.
14. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. **Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales.** *Ergon*. Madrid 1999.
15. Mirales Marrero R. y Puig Cunillera M. **Biomecánica Clínica del Aparato Locomotor.** *Masson*. Barcelona 2000.
16. Böstman O., Pihlajamäki H. **Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation. A review.** *Biomaterials*. 21 (2000), pp. 2615-21.
17. Ranjithkumar, R., Sakthivel G., Dhakshinamoorthy S., Swaminathan S. y Uma-Maheswari K.. **Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration.** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. <http://www.tandfonline.com/loi/tbsp20>. 2014.
18. O'Brien F. **Biomaterials and scaffolds for tissue engineering.** *Materials Today*. 14(3), 2011.
19. Falke, G. F. y Atala A. **Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular.** *Arch. Argent. Pediatr*. 98(2) pp 103-115, 2000.
20. Rajendra K. S. y Hae-Won K. **Inorganic Nanobiomaterial Drug Carriers for Medicine.** *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 6 (10), pp 296-309, 2013.
21. Soicher M. A., Christiansen, B. A., Stover S. M. Leach K. J., Yellowley, C. E., Griffiths, L. G. y Fyhrie. D. P. **Remineralized bone matrix as a scaffold for bone tissue engineering.** *Wiley Online Library*. DOI: 10.1002/jbm.a.35118. 2014.
22. Dietmar W. Hutmacher. **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.** *Biomaterials*. 21(2000), pp. 2529-2543.
23. Koh, L. B., Islam, M. M., Mitra, D., Noel, C. W., Merrett K., Odorcic, S., Fagerholm P., Jackson, W. B., Liedberg, B., Phopase, J. y Griffith, M. **Epoxy Cross-Linked Collagen and Collagen-Laminin Peptide Hydrogels as Corneal Substitutes.** *J. Funct. Biomater*. 4(2013), pp. 162-177.
24. Ozin G., Arsenault A. **Nanochemistry, A Chemical Approach to Nanomaterials.** *Royal Society of Chemistry*. London 2005.
25. **R&D Status and Trends in Nanoparticles, Nanostructured Materials and Nanodevices.** *WTEC Panel Report on Nanostructure Science and Technology*. <http://www.nano.gov>.

26. IUPAC. **Manual of Symbols and Terminology**. *Pure App. Chem.* 31, 1978.
27. Vallet-Regí, M. et al. **A New Property of MCM-41: Drug Delivery System**. *Chem. Mater.* 13 (2000), pp. 308-311.
28. Xiaying, S. **Mesoporous Silica Nanoparticles for Applications in Drug Delivery and Catalysis**. *Iowa State University*. USA 2012.
29. Vadia, N., Rajput, S. **Mesoporous Material, MCM-41: A New Drug Carrier**. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2 (4), 2011.
30. Zhao D.Y., Feng J.L., Huo Q.S., Melosh N., Fredricksson G.H., Chmelka B.F., Stucky G.D. **Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores**. *Science.* 279 (1998), pp. 548-552.
31. Bagshaw S.A., Prouzet E., Pinnavaia T.J. **Templating of mesoporous molecular-sieves by non-ionic polyethylene oxide surfactants**. *Science.* 269 (1995), pp. 1242-1244.
32. Ryoo R., Kim J.M., Ko C.H., Shin C.H. **Disordered molecular sieve with branched mesoporous channel network**. *J. Phys. Chem.* 100 (1996), pp. 17718-17721.
33. Inagaki S., Koiwai A., Suzuki N., Fukushima Y., Kuroda K. **Syntheses of highly ordered mesoporous materials, FSM-16, derived from kanemite**. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 69 (1996). Pp. 1449-1457.
34. Salager, J.-L. y Fernández, A. **Surfactantes**. *Universidad de los Andes*. Chile 2004.
35. Huo Q., Margolese D.I., Stucky G.D. **Surfactant control of phases in the sintesis of mesoporous silica-based materials**. *Chem. Mater.* 8 (1996), pp. 1147-1160.
36. Katime, I., Quintana, J. R. y Villacampa, M. **Micelas**. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 4(2), pp. 123-151, 2003.
37. [pixabay.com/es/micelas-liposomas 35724/http://www.wikillerato.org/La_membrana_plasm%C3%A1tica.html]
38. Emma M. Johansson. **Controlling the Pore Size and Morphology of Mesoporous Silica**. *Linköpings Universitet. Licentiate Thesis.* 2010.
39. Soler-Illia, G. **Nanotecnología. El desafío del siglo XXI**. *Eudeba.* 2009.
40. Zhang, Z., Cabrera, M. I. **Modifying the Hierarchical Porosity of SBA-15 via Mild-Detemplation Followed by Secondary Treatments**. *The Journal of Physical Chemistry.* 118 (2014), pp. 28689-28698.
41. Thielemann J. P., Girgsdies, F., Schlögl, R., Hess, C. **Pore Structure and Surface Area of Silica SBA-15: Influence of Washing and Scale-Up**. *Beilstein Journal of Nanotechnology.* 2 (2011), pp. 110-118.
42. Hoffmann F., Cornelius M., Morell J., Fröba M. **Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials**. *Angew. Chem. Int.* 45 (2006), pp. 3216-3251.
43. Davidson, A. **Modifying the walls of mesoporous silicas prepared by supramolecular-templating**. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 7 (2002), pp. 92-106.
44. Imperor-Clerc, M., Davidson, P. & Davidson, A. **Existence of a microporous corona around the mesopores of silica-based SBA-15 materials templated by triblock copolymers**. *Journal of the American Chemical Society.* 122 (2000), pp. 11925-11933.
45. Huo Q., Margolese D. I., Ciesla U., Feng P., Gier T. E., Sieger P., Leon R., Petroff P. M., SchEth F., Stucky G. D. **Generalized synthesis of periodic surfactant inorganic composite materials**. *Nature.* 368 (1994), pp. 317- 321.
46. Zhao D.Y., Feng J., Kim J., Hang Y., Stucky G.D. **Triblock-copolymer directed synthesis of large-pore mesoporous silica fibers**. *Chem. Mater.* 120 (1998), pp. 602.
47. Vallet-Regí M. y Doadrio A. **Liberación de fármacos en matrices biocerámicas avances y perspectivas**. *Real Academia de Farmacia*. Monografía XIX 2006.
48. Yang C., Wang Y., Zibrowius B., Schüth F. **Formation of cyanide-functionalized SBA-15 and its transformation to carboxylate-functionalized SBA-15**. *Chem. Phys.* 6 (2004), pp. 2491-2467.
49. Colilla M., Izquierdo-Barba I., Sánchez-Salcedo S., Fierro J.L.G., Hueso J.L., Vallet-Regí M. **Synthesis and Characterization of Zwitterionic SBA-15 Nanostructured Materials**. *Chem. Mater.* 22 (2010), pp. 6459-6466.
50. Nieto A., Balas F., Colilla M., Manzano M. and Vallet-Regí M. **Functionalization Degree of SBA-15 as key Factor to Modulate Alendronate Dosage**. *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008), pp. 4-13.

51. Liu J., Feng X.D., Fryxell G.E., Wang L.Q., Kim A.Y., Gong M.L. **Hybrid mesoporous materials with functionalized monolayers.** *Adv. Mater.* 10 (1998), pp. 161-165.
52. 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., McCullen S.B., Higgins J.B., Schlenker J.L. **A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates.** *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), pp. 10834-10843.
53. María Verónica Lombardo. **Síntesis y propiedades de sílice mesoporosa híbrida y su uso en recuperación secundaria de iones divalentes.** *Universidad Nacional de San Martín Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental. Tesis de Doctorado.* Argentina 2013.
54. Francisco Pérez Herrero. **Materiales mesoporosos funcionalizados con grupos amino altamente selectivos para la captura de CO₂.** *Universidad Rey Juan Carlos. PFC.* España 2009.
55. Yenny M. Guerrero S. **Síntesis de materiales mesoporosos tipo SBA-15 y su modificación mediante incorporación de 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS).** *Universidad de los Andes. Tesis de maestría.* Chile 2008.
56. Vallet-Regí M., Ruíz-Gonzalez L., Izquierdo-Barba I., Gonzalez-Calbet J.M. **Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications.** *J. Mater. Chem.* 16 (2006), pp. 26-31.
57. Xie, M., Shi, H., Li, Z., Shen, H., Ma, K., Li, B., Shen, S., Jin, Y. **A multifunctional mesoporous silica nanocomposite for targeted delivery, controlled release of doxorubicin and bioimaging.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 110 (2013), pp. 138–147.
58. Cicuéndez, M., Izquierdo-Barba I., Portolés M. T. y Vallet-Regí M. **Biocompatibility and levofloxacin delivery of mesoporous materials.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 84 (2013), pp. 115–124.
59. Manzano, M., Lamberti, G., Galdi, I., and Vallet-Regí M. **Anti-Osteoporotic Drug Release from Ordered Mesoporous Bioceramics: Experiments and Modeling.** *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4 (12), pp. 1193-1199, 2011.
60. Vallet-Regí M., Balas F., Arcos D. **Mesoporous Materials for Drug Delivery.** *Angew. Chem. Int.* 46 (2007), pp. 7548-7558.
61. Vallet-Regí M. **Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering.** *Chem. Eur. J.* 12 (2006), pp. 5934-5943.
62. Vallet-Regí M., Doadrio J.C., Doadrio A. L., Izquierdo-Barba I., Pérez-Pariente J. **Hexagonal ordered mesoporous materials in a matriz for the controlled Release of Amoxiciline.** *Solid State Ionics.* 172 (2004), pp. 435.
63. Doadrio A. L., Sousa E. M. B., Doadrio J. C., Pérez-Pariente J., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regí M. **Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery.** *J. Control Release.* 97 (2004), pp. 125.
64. Horcajada P., Rámila A., Ferey G. and Vallet-Regí M. **Influence of Superficial Organic Modification of MCM-41 Matrices on Drug Delivery Rate.** *Solid State Sci.* 8 (2006), pp. 1243-1249.
65. Doadrio J. C., Sousa E. M. B., Izquierdo-Barba I., Doadrio A. L., Pérez-Pariente J., Vallet-Regí M. **Functionalization of mesoporous material with long alkyl chains as a strategy for controlled drug delivery pattern.** *J. Mater. Chem.* 16 (2006), pp. 462.
66. Balas F., Manzano M., Horcajada P., Vallet-Regí M. **Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials.** *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), pp. 8116.
67. Tewodros Asefa and Zhimin Tao. **Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles.** *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012), pp. 2265–2284.
68. Ekkapongpisit, M., Giovia, A., Follo, C., Caputo, G. and Isidoro, C. **Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: effects of size and surface charge groups.** *International Journal of Nanomedicine.* 7 (2012), pp. 4147–4158.
69. Nieto A., Colilla M., Balas F., Vallet-Regí M. **Surface Electrochemistry of Mesoporous Silicas as Key Factor for the Design of Tailored Delivery Devices.** *Langmuir.* 26(7), pp. 5038-5049, 2010.
70. Vallet-Regí M., Manzano M., González-Calbet J.M. and Okunishid E. **Evidence of Drugs Confinement into Silica Mesoporous Matrices by Stem CS Corrected Microscopy.** *Chem. Commun.* 46(46), pp. 2956-2958, 2010.
71. Mohanraj, V. J. and Chen, Y. **Nanoparticles – A Review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 5 (1), pp. 561-573, 2006.
72. Marie-Anne Guitou. **Nanoparticules et santé: des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO₂.** *Pharmaceutical sciences.* 2014
73. Salata O. V. **Applications of nanoparticles in biology and medicine.** *Journal of Nanobiotechnology.* 2 (2004), pp. 3.

74. Abhilash M. **Potential applications of Nanoparticles.** *International Journal of Pharma and Bio Sciences* V1(1), 2010.
75. Y. Piñeiro, Z. Vargas, J. Rivas, M. Arturo López-Quintela. **Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Strategies in Biomedical Applications.** *Eur. J. Inorg. Chem.* 27 (2015), pp. 4495-4509.
76. Lu, A.-H., Salabas, E. L. and Schüth F. **Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection Functionalization, and Application.** *Angew. Chem. Int.* 46(2007), pp. 1222 – 1244.
77. Gubin, S. P., Koksharov, Y. A., Khomutov, G. B., and Yurkov G. Y. **Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties.** *Russian Chemical Reviews.* 74 (6), pp. 489-520, 2005.
78. Subir, K., Moskowitz, B. and Moskowitz, B. M. **Chapter 2: Ferrimagnetic Properties of Magnetite. Book: Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms, A New Biomagnetism.** *Plenum Press.* New York and London, 1995.
79. Pauthenet, R. **Variation thermique de l'aimantation spontanée des ferrites de nickel, cobalt, et manganese.** *C.R. Acad. Sci.* 230, pp. 1842-1844, 1950.
80. Roca, A.G. **Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina.** *Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España* 2009.
81. Bañobre-López, M., Piñeiro-Redondo, Y., Sandri, M., Tampieri, A., De Santis, R., Dediu, V. A. and Rivas, J. **Hyperthermia Induced in Magnetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering,** *IEEE Trans. on Mag.* 11 (50), ID 5400507.
82. Rosa Pujales Paradelo. **Preparación y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas Biocompatibles.** *Tesis de Maestría. Universidade Da Coruña.* España 2013.
83. Leslie-Pelecky, D.L. and Rieke, R.D. **Magnetic Properties of Nanostructured Materials.** *Chem. Mater.* 8 (8), pp. 1770-1783, 1996.
84. Raul Valenzuela. **Magnetic Ceramics.** *Chemistry of Solid State Materials. Book.* 2005.
85. Beatriz Salinas Rodríguez. **Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica.** *Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.* España 2014.
86. Sonia García Jimeno **Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas.** *Doctorado en Biotecnología. Universitat de Barcelona,* España 2012.
87. Sarahí Buendía Aceves. **Síntesis de Nanopartículas de Hierro con Propiedades Magnéticas Obtenidas vía Precursores Organometálicos.** *Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Maestría.* México 2009.
88. Trekker J., Leten C., Struys T., Lazenka V.V., Argibay B., Micholt L., Labrichs I., Van RoyW., LagaeL., Himmelreich U. **Sensitive in vivo cell detection using size-optimized superparamagnetic nanoparticles.** *Biomaterials.* 35 (5), pp. 1627-35, 2014.
89. Sofía Romero Vargas. **Efecto de diversos recubrimientos sobre las propiedades magnéticas de partículas superparamagnéticas de Fe₃O₄.** *Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CINVESTAV). Tesis de Doctorado en Tecnología Avanzada.* México 2011.
90. Couto, D., Freitas, M., Vilas-Boas, V., Dias, I., Porto, G., Lopez-Quintela M. A., Rivas, J., Freitas, P., Carvalho, F. and Fernandes, E. **Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxidenanoparticles with human neutrophils,** *Toxicology Letters.* 225 (2014), pp. 57– 65.
91. Xu, Y., Zhuang, L., Lin, H., Shen, H., Li, J.W. **Preparation and characterization of polyacrylic acid coated magnetite nanoparticles functionalized with amino acids.** *Thin Solid Films.* 544 (2013), pp. 368–373. 2013.
92. Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X., and Gu, H. **'Control of Aggregate Size of Polyethyleneimine-Coated Magnetic Nanoparticles for Magnetofection'.** *Nano Research.* 2 (2009). ID 365 372.
93. Steitz, B., Hofmann, H., Kamau, S. W., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., von Rechenberg, B., Hofmann-Amttenbrink, M. and Petri-Fink, A. **'Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction'.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 311 (2007), pp. 300–305.
94. William Víctor Trujillo Herrera. **Preparación y caracterización de nanopartículas de magnetita funcionalizados con ácido láurico, oleico y etilendiamino tetraacético para aplicaciones biomédicas y remediación ambiental.** *Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de Maestría.* Peru. 2013.
95. Dozier, D., Palchoudhury, S., Bao, Y. **Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Biological Coatings.** *Iron Oxide Nanoparticles Research, JOSHUA.* 7 (2010), pp. 16-18.
96. Hofmann-Amttenbrink, M., von Rechenberg, B., Hofmann, H. **Chapter 5. Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. Book. Nanostructured Materials for Biomedical Applications.** *Transworld Research Network.* 2009.

97. Gupta, A. K. and Gupta, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** *Biomaterials*. 26 (2005), pp. 3995–4021.
98. Liu, J., Wang, L., Wang, J., Zhang, L. **Simple solvothermal synthesis of hydrophobic magnetic monodispersed Fe₃O₄ nanoparticles.** *Mater. Research Bull.* 48(2), pp. 416-421, 2013.
99. Ishizaka, S., Horie, N., Satoh, K., Fukuda, Y., Nishida, N., Nagata, I. **Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke.** *Stroke*. 44(3), pp. 720-726, 2013.
100. Minagar, A., Alexander, J.S. **Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis.** *Mult Scler*. 9(6), pp. 540-549, 2003.
101. Liu, D.F., Qian, C., An, Y.L., Chang, D., Ju, S.H., Teng, G.J. **Magnetic resonance imaging of post-ischemic blood-brain barrier damage with PEGylated iron oxide nanoparticles.** *Nanoscale*. 6(24), pp. 15161-7, 2014.
102. Smolensky, E. D., Park, H.-Y. E., Berquó, T. S. and Pierre, V. C. **Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications—effect of anchoring group and ligand exchange protocol.** *Contrast Media Mol. Imaging*. 6 (2011), pp. 189–199.
103. Piñeiro, Y. y Rivas, J. **Herramientas multidisciplinares de la física, química y computación aplicadas a la neurociencia.** *Dpto. Física Aplicada, Fac. Física, USC*.
104. Bloch, F. **Nuclear Induction,** *Physical Review* 70 (1946), pp. 460-473.
105. Lauterbur, P. C. **Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance.** *Nature* 242, pp. 190 – 191, (16 March 1973).
106. Gupte, A. A., Shrivastava, D., Spaniol, M. A., Abosch A. **MRI-Related Heating near Deep Brain Stimulation Electrodes: More Data Are Needed.** *Stereotact Funct Neurosurg*. 89 (2011), pp. 131–140.
107. Mary Luz Mojica Piscioti. **Estudio del Proceso de Calentamiento de Nanopartículas magnéticas con Campos Magnéticos AC para su Utilización en tratamiento de Tumores por Hipertermia.** *Universidad Nacional de Cuyo. Tesis de Maestría.* Argentina, 2009.
108. Rosenholm, J. M., Zhang, J., Sun, W., Gu, H. **Large-pore mesoporous silica-coated magnetite core-shell nanocomposites and their relevance for biomedical applications.** *Microporous and Mesoporous Materials*. 145 (2011), pp. 14–20.
109. Wang, Y., Ren, J., Liu, X., Wang Y., Guo, Y., Guo, Y., Lu G. **Facile synthesis of ordered magnetic mesoporous γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanocomposites with diverse mesostructures.** *Journal of Colloid and Interface Science*. 326 (2008), pp. 158–165.
110. Li, W.-P., Liao, P.-Y., Su, C.-H. and Yeh, C.-S. **Formation of Oligonucleotide-Gated Silica Shell-Coated Fe₃O₄-Au Core-Shell Nanotrisoctahedra for Magnetically Targeted and Near-Infrared Light-Responsive Theranostic Platform.** *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014), pp. 10062–10075.
111. De Sousa, A., de Souza, K. C., da Silva Leite, P. M., de Sousa, R. G. and Martins Barros de Sousa, E. **Dual-Functional [SBA-15/Fe₃O₄/P(N-IPAAm)] Hybrid System as a Potential Nanoplatform for Biomedical Application.** *Journal of Nanomaterials*, Article ID 293624, 2014.
112. Huang, H., Ji, Y., Qiao, Z., Zhao, C., He, J. and Zhang, H. **Preparation, Characterization, and Application of Magnetic Fe-SBA-15 Mesoporous Silica Molecular Sieves.** *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. Article ID 323509. 2010.
113. Qia, Q., Zhang, T., Zheng, X., Wan, L. **Preparation and humidity sensing properties of Fe-doped mesoporous silica SBA-15.** *Sensors and Actuators B*. 135 (2008), pp. 255–261.
114. Hodgkins, R. P., Ahniyaz, A. and Parekh, K. **Maghemite Nanocrystal Impregnation by Hydrophobic Surface Modification of Mesoporous Silica.** *Langmuir* 23 (2007), pp. 8838-8844.
115. Zhang, J., Li, X., Rosenholm, J. M., Gu, H-C. **Synthesis and characterization of pore size-tunable magnetic mesoporous silica nanoparticles.** *Journal of Colloid and Interface Science*. 361 (2011), pp. 16–24.
116. Zhang, J., Sun, W., Bergman, L., Rosenholm, J. M., Lindén, M., Wu, G., Xu, H., Gu, H-C. **Magnetic mesoporous silica nanospheres as DNA/drug carrier.** *Materials Letters*. 67 (2012), pp. 379–382.
117. Sahoo, B., Devi, K. S. P., Dutta, S., Maiti, T. K., Pramanik, P., Dhara, D. **Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications.** *Journal of Colloid and Interface Science*. 431 (2014), pp. 31–41.
118. Hwang, Y.-K., Choi, J.-N., Cho, J.-H., Kwon, H. and Huh, S. **Fe₃O₄-Nanoparticle-Embedded Multifunctional Hollow Mesoporous Silica Capsules.** *Eur. J. Inorg. Chem.* pp. 3379–3383, 2012.
119. Lingling Qu, Shaolong Tie. **Mesoporous silica-coated superparamagnetic magnetite functionalized with CuO and its application as a desulfurizer.** *Microporous and Mesoporous Materials*. 117 (2009), pp. 402–405.

120. Huang, S., Yang, P., Cheng, Z., Li, C., Fan, Y., Kong, D. and Lin, J. **Synthesis and Characterization of Magnetic Fe_xO_y@SBA-15 Composites with Different Morphologies for Controlled Drug Release and Targeting.** *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008), pp. 7130-7137.
121. Del Campo, A., Sen, T., Lellouche, J.-P., Bruce I. J. **Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 293 (2005), pp. 33-40.
122. Garcia, C., Zhang, Y., DiSalvo, F. and Wiesner U. **Mesoporous Aluminosilicate Materials with Superparamagnetic γ -Fe₂O₃ Particles Embedded in the Walls.** *Angew. Chem. Int.* 42 (2003), pp. 1526–1530.
123. Sen, T., Bruce I. J. **Mesoporous silica–magnetite nanocomposites: Fabrication, characterisation and applications in biosciences.** *Microporous and Mesoporous Materials.* 120 (2009), pp. 246–251.
124. Wang, H., Chen, Q.-W., Yu, Y.-F., Cheng, K. and Sun Y.-B. **Size- and Solvent-Dependent Magnetically Responsive Optical Diffraction of Carbon-Encapsulated Superparamagnetic Colloidal Photonic Crystals.** *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011), pp. 11427–11434.
125. Wang, H., Sun, Y.-B., Chen, Q.-W., Yu Y.-F. and Cheng K. **Synthesis of carbon-encapsulated superparamagnetic colloidal nanoparticles with magnetic-responsive photonic crystal property.** *Dalton Trans.* 39 (2010), pp. 9565–9569.
126. Zheng, J., Liu, Z. Q., Zhao, X. S., Liu, M., Liu, X. and Chu, W. **One-step solvothermal synthesis of Fe₃O₄@C core-shell nanoparticles with tunable sizes.** *Nanotechnology.* 23 (2012), 165601 (8pp).
127. Colilla, M., Balas, F., Manzano, M. and Vallet-Regí, M. **Novel Method To Enlarge the Surface Area of SBA-15.** *Chem. Mater.* 19 (2007), pp. 3099-3101.
128. Wang, Yangang; Zhang, F., Wang, Yanqin; Ren, J., Li, C., Liu, X., Guo, Yun; Guo, Yanglong; Lu, G. **Synthesis of length controllable mesoporous SBA-15 rods.** *Materials Chemistry and Physics.* 115 (2009), pp. 649–655.
129. Scherrer, P. **“Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen”** *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* 26 (1918), pp. 98-100.
130. Brunauer, S., Emmett, P.H. and Teller, E. **Adsorption of gases in multimolecular layers.** *J. Am. Chem. Soc.* 1938; 60: 309.
131. Barret, E.P., Joyner, L.G. and Halenda P.P. **The determination of pore volume and area distributions in porous substances I. Computation from nitrogen isotherms.** *J. Am. Chem. Soc.* 1951; 73: 373.
132. Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J. and Sing, K. S. W. **Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report).** *Pure Appl. Chem.* 87(9-10), pp. 1051–1069, 2015.
133. Cristina Santa Marta Pastrana. **Secuencias Rápidas de Eco de Espín en Imagen por Resonancia Magnética.** *Universidad Politécnica de Madrid. Tesis de Licenciatura.* España. 2004
134. Rosensweig, R. E. **Heating magnetic fluid with alternating magnetic field.** *J Magn Magn Mater.* 25(2), pp.370-374, 2002.
135. Doadrio, A.L., Sánchez-Montero, J.M., Doadrio, J.C., Salinas, A.J., Vallet-Regí, M. **A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES.** *Microporous Mesoporous Mater.* 195 (2014), pp. 43–49.
136. Wu, C., Chang, J. **Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application.** *Interface Focus.* 2 (2012), pp. 292–306.
137. Su, J., Cao, L., Yu, B., Song, S., Liu, X., Wang, Z., Li, M. **Composite scaffolds of mesoporous bioactive glass and polyamide for bone repair.** *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012), pp. 2547–2555.
138. Rezabeigi, E., Wood-Adams, P.M., Drew, R.L. **Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process.** *Mater Sci Eng C.* 40 (2014), pp. 248–252.
139. Ma, J., Lin, H. Li, X., Bian, C., Xiang, D., Han, X., Wu, X., Qu, F. **Hierarchical porous bioactive glasses/PLGA-magnetic SBA-15 for dual-drug release.** *Materials Science and Engineering C.* 39 (2014), pp. 21–28.
140. Wang, X. Chen, M., Li, L., Jin, D., Jin, H. and Ge, H. **Magnetic properties of SBA-15 mesoporous nanocomposites with CoFe₂O₄ nanoparticles.** *Materials Letters.* 64 (2010), pp. 708–710.
141. Mondal, J., Sen, T., and Bhaumik, A. **Fe₃O₄@mesoporous SBA-15: a robust and magnetically recoverable catalyst for one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones via the Biginelli reaction.** *Dalton Trans.* 41 (2012), pp. 6173-6181.
142. Y. Sánchez-Vicente, C. Pando, M. Cortijo, A. Cabañas. **Chemical surface modification of mesoporous silica SBA-15 with a tertiary aminosilane using supercritical carbon dioxide.** *Microporous Mesoporous Mater* 193 (2014), pp. 145–153.
143. López-Noriega, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M. **Functionalizing mesoporous bioglasses for long-term anti-osteoporotic drug delivery.** *Chemistry.* 16 (2010), pp. 10879–1086 .

144. El Kadib, A., Hesemann, P., Molvinger, K., Brandner, J., Biolley, C., Gaveau, P., Moreau, J.J.E., Brunel, D. **Hybrid materials and periodic mesoporous organosilicas containing covalently bonded organic anion and cation featuring MCM-41 and SBA-15 structure.** *J Am Chem Soc.* 131 (2009), pp. 2882–2892.
145. Zhu, H. Hu, C., Zhang, F., Feng, X., Li, J., Liu, T., Chen, J., Zhang, J. **Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous SBA-15 bioactive glass.** *Mater Sci Eng C.* 42 (2014), pp. 22–30.
146. Van Grieken, R., Calleja, G., Stucky, G.D., Melero, J.A., García, R.A., Iglesias, J. **Supercritical fluid extraction of a non-ionic surfactant template from SBA-15 materials and consequences of the porous structure.** *Langmuir.* 19 (2003), pp. 3966.
147. Whitnall, W., Asefa, T., Ozin, G. A. **Hybrid Periodic Mesoporous Organosilicas.** *Advanced Functional Materials* 15 (2005), pp. 1696.
148. Grudzien, R.M., Grabicka, B.E., Felix, R., Jaroniec, M. **Polymer-templated organosilicas with hexagonally ordered mesopores: The effect of organosilane addition at different synthesis stages.** *Adsorption.* 13 (2007), pp. 323–329.
149. Colilla, M., Manzano, M., Izquierdo-Barba, I., Vallet-Regí, M., Boissière, C. Sanchez, C. **Advanced drug delivery vectors with tailored surface properties made of mesoporous binary oxides submicronic spheres.** *Chem Mater.* 22 (2010), pp. 1821–1830.
150. Pergher S. B. C., Corma A. y Fornés B. **Preparación y Propiedades de una Arcilla Montmorillonita Pilareada con Polihidroxidaciones de Aluminio.** *Química Nova.* 22(5), pp. 649-653, 1999.
151. Luna-Zaragoza, D., Romero-Guzmán, E. T. and Reyes-Gutiérrez, L. R. **Surface and Physicochemical Characterization of Phosphates Vivianite, $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ and Hydroxyapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$.** *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering.* 8 (8), pp. 591-609, 2009.
152. Johansson, E. M., Balle, M. A., Córdoba, J. M. and Odén, M. **Rapid Synthesis of SBA-15 Rods with Variable Lengths, Widths, and Tunable Large Pores.** *Langmuir.* 27 (2011), pp. 4994–4999.
153. Gómez, L., Pabón Gélves, E., López, B.L., Ramírez Vélez, A. **Methyl methacrylate adsorption on SBA-15 and SBA-16 mesoporous silicas and preparation of the PMMA/SBA-16 hybrid.** *DYNA.* 77 (2010), pp. 49–55.
154. Chokkalingam, V., Weidenhof, B., Krämer, M., Herminghaus, S., Seemann, R., Maier, W.F. **Template-free preparation of mesoporous silica spheres through optimized microfluidics.** *Chem phys chem.* 11 (2010), pp. 2091–2095.
155. Gascón, V., Díaz, I., Márquez-Álvarez, C., Blanco, R.M. **Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase.** *Molecules.* 19 (2014), pp. 7057–7071.
156. Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, C., Zhang, W. **Hybrid organic-inorganic monolithic enzymatic reactor with SBA-15 nanoparticles incorporated.** *Talanta.* 119 (2014), pp. 485–491.
157. Hartono, S.B., Yu, M., Gu, W., Yang, J., Strounina, E., Wang, X., Qiao, S., Yu, C. **Synthesis of multi-functional large pore mesoporous silica nanoparticles as gene carriers.** *Nanotechnology.* 25 (2014), ID 055701.
158. Alberto Escudero Belmonte. **Resonancia Magnética Nuclear Aplicada al Estado Sólido.** *Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 2004
159. Vasil'ev, S. G., Volkov, V. I., Tatarinova, E. A. and Muzafarov A. M. **A Solid-State NMR Investigation of MQ Silicone Copolymers.** *Appl Magn Reson.* 44 (2013), pp. 1015–1025.
160. Uhlig, F. and Marsmann, H. C. **^{29}Si NMR Some Practical Aspects.** *Gelest Inc, Germany.*
161. Chong, S.M., Zhao, X.S. **Functionalization of SBA-15 with APTES and characterization of functionalized materials.** *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003), pp. 12650–12657.
162. Vekas, L., Rasa, M., and Bica, D. **Physical properties of magnetic fluids and nanoparticles from magnetic magneto-rheological measurements.** *JCS.* 231 (2000), pp. 247-254.
163. Cotica, L.F., Santos, I.A., Giroto, E.M., Ferri, E.V. and Coelho, AA. **Surface spin disorder effects in magnetite and poly(thiophene)-coated magnetite nanoparticles.** *J. Appl. Phys.* 108 (2010), ID 064325.
164. Lemus Centes, J. F., Martínez Zimeri, L. A., Navarro, M. A., Posadas A. A. **Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón.** *Boletín Electrónico No. 07 Universidad Rafael Landívar.* Guatemala, 2007.
165. Gacén, J. y Gacén, I. **Quitina y Quitosano. Nuevos Materiales Textiles.** *Boletín INTERTEX No. 110, U.P.C.* España. 1996.
166. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M.A., del Canto-Pingarrón, M., Blanco-Jerez, L. **Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11 (2006), E151-7.

167. Valeria Del Carmen Velásquez Velásquez. **Estandarización del Proceso de Secado de Carragenina en la Empresa Extractos Naturales Gelymar S.A. Universidad Austral de Chile. Tesis de Licenciatura.** Chile 2007
168. De Bouille, K., Glogau, R., Kono, T., Nathan, M., Tezel, A. Roca-Martinez, J.-X. Paliwal, S. and Stroumpoulis, D. **A Review of the Metabolism of 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether–Crosslinked Hyaluronic Acid Dermal Fillers.** *Dermatol Surg.* 39 (12), pp. 1758–1766, 2013.
169. Sánchez-Sánchez, M.-P., Martín-Illana, A., Ruiz-Caro R., Bermejo, P., Abad, M.-J., Carro, R., Bedoya, L.-M., Tamayo, A., Rubio, J., Fernández-Ferreiro, A., Otero-Espinar, F. and Veiga M.-D. **Chitosan and Kappa-Carrageenan Vaginal Acyclovir Formulations for Prevention of Genital Herpes. In Vitro and Ex Vivo Evaluation.** *Mar. Drugs* 13 (2015), pp. 5976-5992.
170. Coffey, J. L., Whitehead, M. A., Nagesha, D. K., Mukherjee, P. Akkaraju, G. Totolici, M., Saffie, R. S., and Canham L. T. **Porous silicon-based scaffolds for tissue engineering and other biomedical applications.** *Phys. Stat. Sol. (a)*, 8 (202), pp. 1451–1455, 2005.
171. Ramiro-Gutiérrez, M. L., Will, J., Boccaccini, A. R., Díaz-Cuenca, A. **Reticulated bioactive scaffolds with improved textural properties for bone tissue engineering: Nanostructured surfaces and porosity.** *Journal of Biomedical Materials Research A.* 2013.
172. Cattalini, J. P., Boccaccini, A. R., Lucangioli, S. and Mouriño V. **Bisphosphonate-Based Strategies for Bone Tissue Engineering and Orthopedic Implants.** *Tissue Engineering Part B.* 5 (18), pp. 323-340, 2012.
173. Dra. Paula Antúnez. **Efectos de las estatinas en el hueso,** *Revista de la Sociedad de Medicina Interna de Buenos Aires.* 2004.
174. Pan García Melody. **Desarrollo de materiales biocompatibles para regeneración ósea. Estudios preliminares.** *Trabajo académicamente dirigido.* Santiago de Compostela, 2013.
175. Gimeno M.D. **Sustitutivos óseos en fracturas del radio distal.** *Patología del Aparato Locomotor.* 5 Supl. II, pp. 82-90, 2007. (art 1 Caeiro)
176. Lartigue, L., Hugounenq, P., Alloeyau, D., Clarke, S.P., Lévy, M., Bacri, J.C., Bazzi, R., Brougham, D.F., Wilhelm, C., Gazeau, F. **Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents.** *ACS Nano.* 6 (21), pp.10935-49, 2012. doi: 10.1021/nn304477s.
177. Schaller, G., Wahnström, A., Sanz-Velasco, P., Enoksson, and Johansson, C. **The effect of dipolar interactions in clusters of magnetic nanocrystals.** *Journal of Physics: Conference Series.* 200 (2010), 072085.
178. Rohrer M., Bauer H., Mintorovitch J., Requardt M., Weinmann H.J. **Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths.** *Invest Radiol.* 40(11), 715-24, 2005.
179. DAKO. **FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell.** *Nº de catálogo IS610.* <http://www.dako.com/es/ar49/p235226/download.pdf?objectId=116821002>
180. Machrafi, H. and Lebon, G. **Size and porosity effects on thermal conductivity of nanoporous material with an extension to nanoporous particles embedded in a host matrix.** *Physics Letters A.* 379 (2015), pp. 968–973.
181. Belmoujahid, Y., Bonne, M., Scudeller, Y., Schleich, D., Grohens, Y. and Lebeau, B. **SBA-15 mesoporous silica as a superinsulating material.** *Eur. Phys. J. Special Topics* 224 (2015), pp. 1775–1785.

11. ANEXO. ARTÍCULOS

DOI: 10.1109/TMAG.2016.2529699

IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS, VOL. 52, NO. 7, JULY 2016

2300604

Multicore Magnetic Fe₃O₄@C Beads With Enhanced Magnetic Response for MRI in Brain Biomedical Applications

Z. Vargas-Osorio¹, B. Argibay², Y. Piñeiro¹, C. Vázquez-Vázquez³, M. A. López-Quintela³,
M. A. Álvarez-Pérez⁴, T. Sobrino², F. Campos², J. Castillo², and J. Rivas¹

¹NANOMAG Laboratory, Applied Physics Department, Research Technological Institute, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain

²Neurosciences Research Laboratory, Health Research Institute of Santiago de Compostela, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela 15782, Spain

³NANOMAG Laboratory, Physical Chemistry Department, Research Technological Institute, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain

⁴Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

Por publicarse

Int. J. Nanotechnology, Vol. x, No. x, xxxx

1

Magnetic nanocomposites based on mesoporous silica for biomedical applications

Z. Vargas-Osorio*^{1,4}, Y. Piñeiro¹, C. Vázquez-Vázquez², C. Rodríguez-Abreu³, M. A. Álvarez-Pérez⁴, M. A. López-Quintela² and J. Rivas¹.

¹Departamento de Física Aplicada, [Facultade de Física](#), &

²Departamento de Química Física, [Facultade de Química](#),

[Universidade de Santiago de Compostela](#), E-15782, Santiago de

Compostela, España. ³ [International Nanotechnology Laboratory \(INL\)](#),

[Avda. Mestre José Veiga s/n, 4715, Braga, Portugal](#). ⁴ [Laboratorio de](#)

[Bioingeniería de Tejidos, DEPeI-Facultad de Odontología, UNAM,](#)

México D.F.

DOI: 10.1109/TMAG.2016.2516645

IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS, VOL. 52, NO. 7, JULY 2016

2300704

Relevant Parameters for Magnetic Hyperthermia in Biological Applications: Agglomeration, Concentration, and Viscosity

Y. Piñeiro¹, Z. Vargas-Osorio¹, M. Bañobre-López², Yu. V. Kolen'ko², M. A. López-Quintela¹, and J. Rivas¹

¹Laboratory of Magnetism and Nanotechnology, Applied Physics Department and Physical Chemistry Department, Research Technological Institute, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain

²International Iberian Nanotechnology Laboratory, Braga 4715-330, Portugal

DOI:10.1002/ejic.201500598 *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015, 4495–4509

MICROREVIEW

DOI:10.1002/ejic.201500598

Iron Oxide Based Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Strategies in Biological Applications

Yolanda Piñeiro,^{*,[a]} Zulema Vargas,^[a] José Rivas,^[a] and Manuel Arturo López-Quintela^[b]



Keywords: Nanoparticles / Iron / Magnetic properties / Medicinal chemistry / Antitumor agents / Hyperthermia

Phys. Status Solidi A 211, No. 5, 1062–1066 (2014) / DOI 10.1002/pssa.201300762

Part of Topical Section on
Nanoscaled Magnetism and Applications



The effects of spark plasma sintering consolidation on the ferromagnetic resonance spectra (FMR) of Ni–Zn ferrites

R. Ortega-Zempoalteca¹, Y. Flores-Arias¹, G. Vázquez-Victorio¹, T. Gaudisson², S. Ammar², Z. Vargas-Osorio¹, U. Acevedo-Salas¹, and R. Valenzuela^{*,1}

¹ Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

² Laboratoire ITODYS, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, CNRS-UMR-7086, 75205 Paris cedex, France

Received 27 November 2013, revised 23 December 2013, accepted 9 January 2014

Published online 10 February 2014

Keywords ferrite nanoparticles, ferromagnetic resonance (FMR), spark plasma sintering (SPS)

* Corresponding author: e-mail raulvale@yahoo.com, Phone: +52 55 5622 4653, Fax: +52 55 5616 1371

ACEPTADO

Y. Piñeiro, Z. Vargas-Osorio and J. Rivas. **Superparamagnetic biocompatible scaffold for bone tissue engineering.** *MRS Advances*. 2016.