

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural (ETSIAMN)

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



ENCAPSULACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN SISTEMAS INTELIGENTES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADOS EN PUERTAS MOLECULARES

ALUMNA: Nuria Martínez Romera

TUTORES ACADÉMICOS: Édgar Pérez Esteve
Isabel Fernández Segovia

TUTOR EXPERIMENTAL: Héctor Gómez Llorente

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, JULIO DE 2019



ENCAPSULACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN SISTEMAS INTELIGENTES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADOS EN PUERTAS MOLECULARES

RESUMEN

Los aminoácidos constituyen los elementos básicos de las estructuras proteicas. Muchos de ellos son clave en diferentes procesos biológicos, por lo que administrarlos en las dosis adecuadas es vital para lograr un óptimo estado de salud. Para administrar estos compuestos en las dosis adecuadas y sin degradación, en los últimos años se ha recurrido a la encapsulación. La encapsulación y liberación controlada presenta en ocasiones problemas de eficiencia relacionados con la polaridad y carga de los mismos. En este contexto, el presente trabajo tiene por objetivo comparar los perfiles de liberación de varios sistemas inteligentes de liberación controlada basados en el uso de puertas moleculares. Para lograr este objetivo se ha sintetizado un material mesoporoso del tipo MCM-41, y seguidamente se han funcionalizado con diferentes proporciones de amina para dar lugar a partículas con cargas superficiales desde valores negativos a positivos. Seguidamente, se han cargado las diferentes partículas con lisina mediante la técnica de impregnación. Finalmente, los sólidos resultantes se han funcionalizado con diferentes moléculas orgánicas que actúan como puerta molecular. La cinética de liberación de los aminoácidos desde cada uno de los sistemas se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados indican que la funcionalización con aminas previa al cargado de la lisina juega un papel importante en el comportamiento de la liberación. Por otra parte, para la mayoría de los sistemas, se consigue una mayor liberación en condiciones de liberación que simulan las del intestino delgado. Sin embargo, en ninguno de los sistemas se ha conseguido una liberación cero en condiciones que simulan las del estómago, por lo que partiendo de estos resultados habrá que seguir optimizando las síntesis químicas de los diferentes sistemas de liberación.

Palabras claves: Encapsulación, mesoporoso, aminoácido, puerta molecular, liberación controlada.

ALUMNA: Nuria Martínez Romera

TUTORES ACADÉMICOS: Édgar Pérez Esteve e Isabel Fernández Segovia

TUTOR EXPERIMENTAL: Héctor Gómez Llorente

Valencia, Julio de 2019

ABSTRACT

Amino acids are the basic elements of protein structures. Many of them are key in different biological processes, so administering them in the appropriate doses is vital to achieve an optimal state of health. To administer these compounds in the appropriate doses and without degradation, researchers have resorted to encapsulation in recent years. Encapsulation and controlled release sometimes present efficiency problems related to their polarity and charge. In this context, the present work aims to compare the release profiles of several intelligent controlled release systems based on the use of molecular gates. To achieve this goal, a MCM-41-type mesoporous material has been synthesized, and then functionalized with different proportions of amine to give rise to particles with surface charges from negative to positive values. Next, the different particles were loaded with Lysine by the impregnation technique. Finally, the resulting solids have been functionalized with different organic molecules that act as molecular gates. The amino acid release kinetics of each of the systems has been then evaluated by high performance liquid chromatography. The results indicate that functionalization with amines prior to the lysine loading step plays an important role in the release behavior. On the other hand, for most systems, greater release is achieved under release conditions simulating those of the small intestine. However, in none of the systems a zero release been achieved under conditions that simulate those of the stomach. So, starting from these results, a process of optimization of the chemical synthesis of different delivery systems should be done.

Keywords: encapsulation, mesoporous, amino acid, molecular gate, controlled release.

RESUM

Els aminoàcids constitueixen els elements bàsics de les estructures proteiques. Molts d'ells són clau en diferents processos biològics, per la qual cosa administrar-los en les dosis adequades és vital per a aconseguir un òptim estat de salut. Per a administrar estos compostos en les dosis adequades i sense degradació, en els últims anys s'ha recorregut a l'encapsulació. L'encapsulació i alliberament controlat presenta de vegades problemes d'eficiència relacionats amb la polaritat i càrrega dels mateixos. En este context, el present treball té per objectiu comparar els perfils d'alliberament de diversos sistemes intel·ligents d'alliberació controlada basats en l'ús de portes moleculars. Per a aconseguir este objectiu s'ha sintetitzat un material mesoporó del tipus MCM-41, i a continuació s'ha funcionalitzat amb diferents proporcions d'amina per a donar lloc a partícules amb càrregues superficials des de valors negatius a positius. A continuació, s'han carregat les les diferents partícules amb lisina per mitjà de la tècnica d'impregnació. Finalment, els sòlids resultants s'han funcionalitzat amb diferents molècules orgàniques que actuen com a porta molecular. La cinètica d'alliberament dels aminoàcids des de cada un dels sistemes es va avaluar per mitjà de cromatografia líquida d'alta resolució. Els resultats indiquen que la funcionalització amb amines prèvia al carregat amb lisina juga un paper important en el comportament de l'alliberament. D'altra banda, per a la majoria dels sistemes, s'aconsegueix un major alliberament en condicions d'alliberament que simulen les de l'intestí prim. No obstant això, en cap dels sistemes s'ha aconseguit un alliberament zero en condicions que simulen les de l'estómac, per la qual cosa partint d'aquests resultats caldrà seguir optimitzant les síntesis químiques dels diferents sistemes d'alliberament.

Paraules clau: Encapsulació, mesoporós, aminoàcid, porta molecular, alliberació controlada.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a toda mi familia y en especial a mis padres, por haberme ofrecido un constante apoyo, unido de todo tipo de consejos y frases esperanzadoras, ya que sin todo ello habría sido muy difícil llevar a cabo este proyecto de forma tan positiva.

También agradecer a toda la gente que he conocido durante la carrera, las grandes experiencias que me han aportado.

Seguidamente, agradecer a mi tutor experimental Héctor Gómez Llorente el enorme trabajo y esfuerzo que ha puesto sobre este proyecto. Tanto por involucrarse en él como por hacerme entender a la perfección todo el proceso que estábamos llevando a cabo. Además de participar activamente en la orientación necesaria para documentar el proyecto y ofrecerme siempre su mejor punto de vista.

Por último, y no menos importantes, deseo asimismo expresar mi gratitud a mis tutores académicos Édgar Pérez Esteve e Isabel Fernández Segovia, tanto por la oportunidad de poder realizar este trabajo como por su interés en la investigación necesaria para llevarlo a su fin.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Materia prima y reactivos.....	14
2.2. Instrumental.....	14
2.3. Estudio de la solubilidad de los aminoácidos.....	14
2.4. Preparación de los sistemas de liberación controlada.....	14
2.4.1. Síntesis de partículas MCM-41.....	14
2.4.2. Funcionalización con aminas.....	15
2.4.3. Cargado en partículas mesoporosas.....	15
2.4.4. Anclaje de puertas moleculares.....	16
2.5. Caracterización de los sistemas de liberación controlada.....	18
2.5.1. Difracción de rayos X.....	18
2.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	18
2.5.3. Análisis del potencial zeta (ζ).....	18
2.6. Obtención de la cinética de liberación de Rodamina B o lisina en sistemas de liberación controlada susceptibles a cambios de pH.....	18
2.7. Obtención de la cinética de liberación de lisina en sistemas de liberación controlada susceptibles a cambios en la concentración de sales biliares.....	19
2.8. Cuantificación de los aminoácidos por HPLC.....	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Selección del aminoácido objeto de estudio y de su máxima solubilidad.....	21
3.2. Selección de las condiciones de separación cromatográfica y detección de los aminoácidos.....	21
3.3. Caracterización de los soportes de partida para la preparación de los diferentes sistemas de liberación controlada.....	23
3.4. Caracterización de los sistemas de liberación controlada.....	26
3.4.1. Puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina.....	26
3.4.2. Puerta molecular quitosano (CS).....	28
3.4.3. Puerta molecular Ácido Oleico.....	30
3.4.4. Puerta molecular Lisozima.....	31
3.5. Estudio de las cinéticas de liberación de los diferentes sistemas de liberación controlada.....	32
3.5.1. Puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina.....	32
3.5.2. Puerta molecular quitosano.....	33

3.5.3.	Puerta molecular Lisozima	35
3.5.4.	Puerta molecular ácido oleico	36
4.	CONCLUSIONES	37
5.	REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aminoácido utilizado en el estudio de cargado y liberación: Lisina (Lys). Se muestra su punto isoeléctrico, grupo funcional y características conformacionales según [Bischoff y Schlüter \(2012\)](#). **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Valores de las áreas correspondientes al aminoácido Lisina a una concentración de 100 ppm (a) y al tampón PBS pH 7,5 sin aminoácido(b).	22
Figura 2: Valores de las áreas correspondientes a las diferentes concentraciones (10 ppm(a), 50 ppm (b), 100 ppm(c), 250 ppm (d) y 500 ppm (d)) de Lisina en PBS a pH7,5.	23
Figura 3: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41, i) antes de calcinar, ii) después de calcinar (0), iii) tras la funcionalización A, iv) tras la funcionalización B, v) desnuda y cargada con aminoácido y vi) funcionalizada con APTES (B) y cargada con aminoácido	24
Figura 4: Caracterización de la forma y la porosidad de la partícula MCM-41 tanto desnuda como funcionalizada, por medio de la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM).	25
Figura 5: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) en MCM-41 tanto desnuda (0) como con funcionalizada (A y B); a pH (4.5, 7.5 y 9.5).	25
Figura 6: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 cargados con aminoácido tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados (B) con la puerta N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina anclada a la superficie.....	27
Figura 7: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 cargadas con aminoácido (0 y B) antes y después del anclado de la N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina (N3).....	27
Figura 8: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 con la puerta molecular quitosano (CS) anclada al sólido desnudo (i, iii) o funcionalizado con aminas (ii y iv) a través de grupos Isocianato (i y ii) o Fosfonato (iii y iv).....	28
Figura 9: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 0 (i) y B (ii) con los grupos funcionales (Fosfonato e Isocianato) a pH 4,5.	28
Figura 10: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 0 (i) y B (ii) con los diferentes grupos funcionales (Fosfonato (a) e Isocianato (b)) tras en anclado de diferentes cantidades de quitosano	30
Figura 11: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados B, con la puerta molecular Ácido Oleico anclada.....	30
Figura 12: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 (0 y B) con la puerta molecular Ácido Oleico anclada.....	31
Figura 13: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados con la máxima concentración de APTES (B), ambos con la puerta molecular Lisozima anclada.....	31
Figura 14: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 (0 y B) con la puerta molecular Lisozima anclada.....	32
Figura 15: Valores de concentración de Lisina (Lys) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) con la puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina anclada; a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 minutos).	33
Figura 16: Valores de emisión de Rodamina B (RhB) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 (0, A y B ancladas con quitosano, previamente funcionalizadas con los grupos funcionales Isocianato (a) y Fosfonato (b); a diferentes tiempos de liberación (5 minutos, 180 min, 300 minutos, 1440minutos y 2880 minutos).	34
Figura 17: Valores de cantidad de Lisina (Lys) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) funcionalizadas con Isocianato, con la puerta molecular Quitosano anclada; a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 min).	35
Figura 18: Valores de lisina liberada (Lys) a pH 2 y pH 7,5 desde las en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) con la puerta molecular Lisozima anclada covalentemente a pH 7 (a), anclada	

covalentemente con etanol (b) y anclada electroestáticamente con etanol (c); a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 minutos). 36

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas esenciales que constituyen el 50% del peso seco de las células, por lo que son muy abundantes en el organismo (Whitford, D., 2003). Se consideran biomoléculas de alto peso molecular que al hidrolizarse se descomponen en compuestos orgánicos más sencillos y de menor peso denominados aminoácidos (McDonald, P et al., 2002).

Por tanto, las proteínas son cadenas lineales de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos o enlaces amida que unen un grupo amino con un grupo carboxilo perteneciente a otro aminoácido. Tienen la capacidad de plegarse y adquirir estructuras tridimensionales que les permiten realizar una gran multitud de funciones, muy diversas entre ellas. Pueden ser funciones estructurales, enzimáticas, reguladoras, transportadoras, de movimiento o de defensa.

Todas las proteínas de cualquier especie biológica se forman a partir de 20 α -aminoácidos, los cuales están formados por un grupo amino (-NH₂), un grupo carboxilo o ácido (-COOH), un átomo de hidrógeno (-H) y un grupo químico variable (-R), todos ellos unidos a un átomo de carbono α . El grupo -R es el que los diferencia unos de otros (Whitford, D., 2003). Además de los 20 aminoácidos estándar que son comunes a todas las proteínas, se han detectado otros aminoácidos que solo se encuentran en ciertas proteínas específicas. Generalmente los aminoácidos se clasifican según su grupo R en: alifáticos no polares, aromáticos relativamente apolares, polares sin carga, ácidos (cadenas laterales cargadas negativamente) y básicos (cadenas laterales cargadas positivamente) (Cobo Dols, M. et al., 2006).

Una vez ingeridas las proteínas a partir de la dieta, se comienzan a hidrolizar por la acción de la pepsina en el estómago, la cual en un medio ácido divide esas proteínas en péptidos más pequeños. Posteriormente, en el intestino delgado, se someten a hidrólisis por la acción de enzimas pancreáticas e intestinales, resultando en última instancia los aminoácidos (Wang et al., 2018).

Según la capacidad de una especie para sintetizar los aminoácidos a partir de otros, éstos se pueden dividir en dos grupos: no esenciales y esenciales. Los aminoácidos no esenciales o dispensables (alanina, arginina, ácido aspártico, asparragina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina) se sintetizan a partir de otros aminoácidos o metabolitos por medio de rutas metabólicas sencillas, como la transaminación, pero también hay algunos que se sintetizan por rutas más complejas (McDonald, P et al., 2002). Los aminoácidos esenciales o indispensables (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) contienen un esqueleto hidrocarbonato que el organismo no es capaz de sintetizar y, por tanto, la única opción de obtenerlos es mediante una fuente externa proteica (Hartmann y Meisel, 2007).

El destino de estos aminoácidos puede ser tanto para obtener energía como para emplearlos en la síntesis de nuevas proteínas, que es un proceso que tiene lugar en todas las células del organismo. Con el fin de lograr esto último, es necesario que estén presentes todos los aminoácidos que son requeridos para la formación proteica. Si no ocurre lo anterior, el destino será la obtención energética (FitzGerald, RJ, y Meisel, H., 2003). El objetivo de asegurar que todos los aminoácidos participan en la reacción de síntesis, y por lo tanto forman proteínas, lleva a la industria y al mundo de la investigación a la necesidad de suplementarlos en los diferentes alimentos. Sin embargo, los aminoácidos incorporados en el alimento son libres, es decir, no forman parte de la composición estructural de alimento. Por el contrario, el resto de los

aminoácidos necesarios, son llamados complejos, ya que forman parte de la estructura proteica del alimento. Por lo tanto, estos últimos necesitarán el proceso de digestión para que las proteínas sean transformadas en aminoácidos y así poder ser absorbidos en el intestino delgado. Todo lo anterior, provoca una falta de compás en la absorción intestinal y posterior reacción de síntesis proteica entre los aminoácidos libres y complejos, ya que los primeros se absorberán más rápido por no necesitar el proceso de digestión.

Este motivo explica la necesidad de mejorar la suplementación de los alimentos mediante la técnica de encapsulación y liberación sostenida y controlada, mostrando así la alternativa a la formulación tradicional basada en la adición de aminoácidos libres en alimentos (Charnay, Clarence, et al. 2004). Para lograrlo, actualmente se está investigando el desarrollo de la técnica de microencapsulación, ya que permitiría la eliminación de la falta de compás anteriormente mencionada entre los aminoácidos libres, y los complejos, que son propios del alimento. Por lo que se obtendría una mejora en la absorción de estos en el tejido diana (en este caso el intestino delgado), realizando así una optimización de recursos en la síntesis proteica a partir de aminoácidos (Thies, 2003).

Un sistema de liberación controlada es aquel sistema que permite la difusión al medio diana, bajo un estímulo determinado, las partículas encapsuladas en la matriz (en este caso MSP tipo MCM-41) (Pérez-Esteve et al., 2015a). En el comienzo del desarrollo de sistemas de encapsulación se estudiaron aquellos basados en hidratos de carbono, proteínas y lípidos. En primer lugar, los sistemas de entrega basados en carbohidratos incluyen el uso de celulosa de almidón, pectina, goma guar, chitosan, alginato, dextrina y ciclodextrinas. Son los más adecuados por ser biocompatibles, biodegradables y por poseer un alto potencial de modificación para alcanzar las propiedades requeridas (Fathi, Mozafari, y Mohebbi, 2012). Los métodos de liberación basados en lípidos incluyen emulsiones, liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos y portadores de lípidos estructurados. Son aquellos que tienen una mayor eficiencia de encapsulación y una baja toxicidad (Fathi, Martin y McClements, 2014). Por último, los métodos de liberación basados en proteínas incluyen caseínas, proteínas de suero, gelatina, miosina de carne o pescado, zeína de maíz, gluten de trigo, proteína de soja, proteína de cacahuete, y proteína de semilla de algodón. Éstos se emplean por su capacidad para formar hidrogeles, por tener un alto valor nutricional y por ser reconocidos como seguros (Wang et al., 2012). A pesar de estas propiedades, estos sistemas de tipo orgánico tienen una serie de inconvenientes como la baja estabilidad de la estructura durante el procesamiento y almacenamiento de la comida, baja capacidad de controlar la velocidad de liberación y bajo efecto en la protección de la sustancia encapsulada durante su paso a través del estómago.

Actualmente, los métodos que están apareciendo como alternativa a los sistemas orgánicos y sus inconvenientes, son los métodos basados en polialcoholes, poliamidas, celulosas o materiales inorgánicos mesoporosos. Estos últimos, son por ejemplo partículas de sílice mesoporosa (MSP), empleándose para la encapsulación las llamadas M41S (Beck et al., 1992), entre las que se incluye la familia de partículas MCM-41 (hexagonal) (Ma et al., 2014). En primer lugar, este tipo de partículas presentan una serie de características como la alta estabilidad, la biocompatibilidad, la no toxicidad aparente, gran capacidad de carga, la posibilidad de incluir puertas moleculares en la superficie externa, la posibilidad de modular la entrega de la molécula encapsulada en respuesta a un estímulo externo y la capacidad para proteger su carga contra la degradación ambiental. Además, gracias a su composición inorgánica contienen una estructura que es muy estable y resistente a los ataques físicos y bioquímicos (Pérez-Esteve et al., 2016). En segundo lugar, estas estructuras están compuestas por dióxido de silicio (SiO₂) cuya disposición espacial permite crear poros entre 2 y 50 nm (Zhao,

2006). En tercer lugar, las propiedades con las que cuentan son la alta capacidad de carga, alta superficie específica (700 -1000 m²/g), volúmenes de poro específicos (0,6-1 cm³/g) y tamaño de poro grande (2-10 nm) (Colilla, González y Vallet-Regí, 2013), paredes gruesas (entre 1,5 y 3 nm) y son fáciles de funcionalizar (Pérez-Esteve et al., 2015a). Por último, debido a lo anterior las MSP son partículas que cada vez tienen más aplicaciones, ya que no solo sirven para la liberación controlada de fármacos en aplicaciones biomédicas, sino que también sirven para liberar nutrientes, antioxidantes, antimicrobianos, péptidos, aromas y enzimas en aplicaciones alimentarias (Veith, Hughes, y Pratsinis, 2004).

Respecto al cargado de los aminoácidos en las partículas MCM-41, se encuentran diversos métodos. El uso de uno u otro está condicionado principalmente por la solubilidad de la molécula, la estabilidad térmica y el coste que supone (Pérez-Esteve et al., 2016). Se diferencian varios sistemas de cargado: co-condensación de un solo paso, inmersión, impregnación, impregnación a humedad incipiente, fusión en caliente y utilización de fluidos supercríticos de CO₂. De todos ellos, se ha trabajado en anteriores estudios con la técnica de inmersión e impregnación para encapsular partículas de diversa naturaleza, resultando ser óptima para el cargado la técnica de impregnación (Pérez-Esteve et al., 2015b). Brevemente, la técnica de impregnación consiste en añadir una solución de aminoácidos a una capa delgada de partículas mesoporosas tipo MCM-41, para que por acción capilar penetre en los poros mientras se evapora el disolvente. La principal ventaja es que se puede controlar fácilmente la cantidad de aminoácidos que se cargan, por unidad de superficie. Además, se es recomendable para cargar moléculas muy caras ya que la eficiencia en la encapsulación es alta. Por último, añadir que, este método se resuelve mediante una alta uniformidad en el cargado y una alta facilidad de crear una superficie cristalina en la superficie del soporte (Salonen et al, 2008; Santos, 2014). La desventaja más importante es que el exceso de aminoácidos, que queda en la superficie externa de las partículas, impide el suministro de moléculas activas poco solubles, ya que la lenta disolución de las moléculas de la superficie externa impide que pueda acceder el medio de liberación a los poros (Riikonen, 2012).

Otro de los factores que afecta a la eficiencia de cargado es la carga superficial de la partícula y la del aminoácido en el medio donde se realiza el cargado. Las partículas MCM-41 contienen una alta densidad de grupos silanol (SiO⁻), confiriéndole una gran carga negativa a pH mayor a 2. Esta carga tan negativa provoca que moléculas muy cargadas puedan no entrar en los poros por repulsión electrostática, o no tener tendencia a salir de las mismas por fuertes atracciones electrostáticas. Una solución fácil para modificar esta elevada carga superficial negativa es funcionalizar, es decir, modificar químicamente la superficie añadiendo moléculas orgánicas que aportan grupos funcionales orgánicos, entre los que se encuentran: grupos de ácido sulfónico por la postoxidación del grupo mercapto, grupos carboxílicos por la hidrólisis de los grupos ciano, grupos ácido-fosfóricos por la hidrólisis de los dietilestersilanos y grupos epóxido que reaccionan con los grupos amino de las moléculas enzimáticas a través de la reacción de apertura del anillo (Chia-Hung Lee et al., 2009). Lo anterior consigue el objetivo de este enunciado, poder proporcionar, gracias a la incorporación de un grupo reactivo a la MSP, la capacidad de anclar otros grupos funcionales en su superficie por puentes de hidrógeno, atracción electrostática, o unión covalente (Chia-Hung Lee et al., 2009).

La incorporación de moléculas orgánicas en la superficie de las MSP, a través de los grupos funcionales anteriormente mencionados, permite no sólo modificar la carga superficial de las partículas, sino también crear materiales de entrega de la carga almacenada en el soporte inorgánico, mediante la aplicación de estímulos externos seleccionados (Ruiz-Rico et al., 2016). Esto abre la posibilidad de diseñar mecanismos

sensibles al estímulo con control espaciotemporal de la liberación de carga, que comúnmente se conocen como puertas moleculares (Argyo et al., 2014). Estas no solo responden a estímulos externos, sino que también son capaces de modificar las propiedades de las moléculas ancladas, como por ejemplo la polaridad, el tamaño, la conformación, la interacción con otras especies o la hidrólisis del enlace. Entre los diferentes estímulos se encuentran el pH (Casasús et al., 2004), el potencial redox (Hernández et al., 2004), la temperatura (De la Torre et al., 2014), y las biomoléculas (enzimas, anticuerpos, nucleótidos, etc.) (Bernardos et al., 2009). Sin embargo, no todas las puertas moleculares se pueden emplear en aplicaciones alimentarias, los requisitos que deben de cumplir para ser utilizadas son: que la molécula sea capaz de anclarse de forma covalente o electrostáticamente a la superficie de la MSP sin alterarse hasta que el estímulo esté presente, que la puerta molecular sea lo suficientemente grande como para bloquear los poros, que la molécula sea capaz de responder a un estímulo presente en el tracto gastrointestinal, y por último, que la molécula que actúa como una puerta molecular sea compatible con la matriz del alimento, evitando problemas de solubilidad, precipitación o separación de fases (Pérez-Esteve et al., 2016).

Teniendo en cuenta las anteriores premisas, para este trabajo se han seleccionado 3 moléculas que podrían actuar como puerta molecular, permitiendo la liberación del aminoácido encapsulado o inhibición de la misma, en respuesta al pH del entorno (pH ácido en el estómago, pH neutro en el intestino). Estas moléculas son la (N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina) (N3) (Pérez-Esteve et al., 2015a), el quitosano (Zhao et al., 2014), y la lisozima (Xue et al., 2012). A su vez, se ha seleccionado una molécula que actúe frente a la presencia de surfactantes (ej. sales biliares que se encuentran sólo en el intestino delgado). Esta molécula es el ácido oleico (Poyatos-Racionero et al., 2017).

El N3 es una poliamina derivada del 3-[2-(2-aminoetilamino) etilamino] propil-trimetoxisilano, utilizada como sistemas de liberación controlada sensible al pH (Pérez-Esteve et al., 2015a). Sus características son en primer lugar, capacidad de permitir o inhibir la liberación de la molécula encapsulada en función de las fuerzas electrostáticas o uniones por puentes de hidrógeno que se crean en un determinado rango de pH; en segundo lugar, operatividad en solución acuosa ya que las poliaminas se pueden transformar en grupos poliamonio mediante estímulos externos, en este caso cambio de pH; y, por último, el estudio de la unión covalentemente de la partícula N3 con la superficie externa de los poros (Bernardos et al., 2008). En este contexto, el mecanismo de apertura/cierre de la puerta molecular viene definido por la interacción o repulsión de las aminas. A pH ácido (estómago), las aminas se encuentran protonadas creando repulsiones entre los poliamonios que se sitúan en la parte externa del poro, provocando una conformación rígida y el impedimento en la liberación de las partículas cargadas en la MSP (Pérez-Esteve et al., 2015a, Bernardos et al., 2008). Además, las aminas protonadas pueden crear uniones electrostáticas con aniones presentes en el medio, ayudando al bloqueo de los poros de la MCM-41. En cambio, a pH neutro (intestino) las poliaminas están menos protonadas, las repulsiones electrostáticas son menores y las interacciones con los aniones son más débiles. En este caso, el acceso a los poros no está impedido, por lo que la molécula encapsulada puede liberarse con facilidad.

El quitosano, componente principal del exoesqueleto de crustáceos e insectos, es un biopolímero natural derivado de la desacetilación de la quitina (Pérez Cordero et al., 2014), muy versátil, que contiene propiedades excelentes, como la no toxicidad, la biocompatibilidad, biodegradabilidad, el uso como antimicrobiano y fácil de obtener de la naturaleza en comparación con otras macromoléculas, biopolímeros y polielectrolitos (Hu, X et al., 2014). Es una molécula con carga que responde a estímulos de pH.

Utilizada como puerta molecular, permite la liberación/inhibición de la liberación en función del pH del medio. A pH ácido, los polímeros se compactan y bloquean la liberación de la partícula cargada en las MSP. Por el contrario, a pH básico las moléculas se liberan por extensión de las cadenas de polímeros (Zhao et al., 2014).

La lisozima (Hen egg lysozyme) es una enzima globular de pequeño tamaño de forma esférica (Kubiak and Mulheran, 2009) estabilizada con cuatro puentes disulfuro con carga neta positiva tanto a pH 7 (+7,5 e) como a pH 2 (+17 e) (Posee et al., 1990). Su radio hidrodinámico, proporcional al tamaño de la proteína, es de 1,9 nm a pH 4,5, incrementándose a 2,3 nm a pH 2. Su actuación como puerta molecular radica en la absorción física de la proteína en la MSP y en el cambio conformacional reversible que se produce a diferentes valores de pH. En este contexto, en un medio básico las moléculas de lisozima se encogen creando un espacio libre entre la proteína y el poro de la MSP, esto permite el intercambio molecular desde el medio al poro, y viceversa. Por contra, en medio ácido las moléculas se encuentran unidas entre ellas, gracias a las interacciones electrostáticas producidas, prohibiendo el intercambio entre el medio y el poro de la MSP (Xue et al., 2012).

Por último, el ácido oleico, está presente de forma natural en los alimentos, por ejemplo, en el aceite de oliva. El carácter hidrófobo del compuesto hace del ácido un compuesto que crea una capa impermeable evitando la interacción entre sustancias polares y no polares (puerta cerrada). En medio de un surfactante (por ejemplo la bilis presente en el intestino delgado) que actúa como emulsionante, el ácido oleico cambia su conformación y permite así la liberación al medio de la carga (Poyatos-Racionero et al., 2017).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo de este trabajo es desarrollar sistemas inteligentes de encapsulación y de liberación controlada basados en el uso de MCM-41 funcionalizadas con moléculas orgánicas que respondan a estímulos digestivos para liberar de manera controlada la mayor cantidad posible de lisina en presencia de estímulos propios del intestino delgado (pH neutro y presencia de sales biliares). Para ello se utilizarán partículas MCM-41 tanto desnudas (superficie negativa) como funcionalizadas con diferentes proporciones de aminas (superficies positivas) como soporte para la encapsulación, se cargarán con lisina mediante la técnica de impregnación, y se realizará una segunda modificación superficial para anclar sobre la superficie tanto triaminas, como quitosano, lisozima o ácido oleico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y reactivos

Los reactivos y disolventes Rodamina B, Lisina, trietanolamina (TEA), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), hexadeciltrimetilamonio bromuro (CTAB), ácido clorhídrico (HCl), acetonitrilo (ACN), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), ácido 4-(2-hydroxiethyl) piperacina-1-etanosulfónico (HEPES), dihidrógeno monosódico ortofosfato (NaH_2PO_4), hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), 3-(Triethoxisilil) propil isocianato (Isocianato), etil 2-aminotiazol-4-carboxilato (carboxilato), 3-(Trihidroxisilil) propil metil fosfonato (Fosfonato), ácido cis-9-octadecenoico (ácido oleico), N1-(3-Trimethoxisililpropil) dietilentriamina (N3), quitosano y ácido trifluoroacético (TFA) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Por otra parte, los reactivos hidróxido de sodio (NaOH), ácido acético y el disolvente alcohol etílico (etanol) fueron proporcionados por Scharlab (Barcelona, España).

2.2. Instrumental

El instrumental empleado fue: vaso de precipitado, frasco schott, matraz de balón de fondo redondo, balanza analítica, pipetas, micropipetas, placa calefactora, termómetro, probetas, botella de teflón, embudo Büchner, papel de filtro, erlenmeyer, bomba de vacío, baños por ultrasonido, estufa, navecillas, vidrio de reloj, tiras de pH, pHmetro, mufla, centrifuga, falcon de plástico, filtros de jeringa, viales, cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) modelo 1260 Infinity II de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EUA), columna Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 100 mm, 4 μm (Agilent Technologies), difractómetro de rayos X modelo Bruker D8 (Bruker, Coventry, UK), microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo JEOL JEM-1010 (JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, Francia) y Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania).

2.3. Estudio de la solubilidad de los aminoácidos

Con el objetivo de establecer la concentración máxima a la que se podían preparar las soluciones de cargado por impregnación se realizaron estudios de solubilidad de la lisina en las condiciones de cargado (tampón HEPES). Diferentes cantidades de lisina se añadieron sobre HEPES y se estudió la solubilidad de manera visual.

2.4. Preparación de los sistemas de liberación controlada

2.4.1. Síntesis de partículas MCM-41

Para poder obtener micropartículas MCM-41 se utilizó una técnica conocida por el nombre de “ruta de los antranos”, protocolo que se encuentra descrito por [Bernardos *et al.* \(2008\)](#).

Para ello, se mezcló 52,43 gramos de TEAH3 con 0,98 gramos de NaOH disuelto en 2 mL de agua destilada, calentándose hasta alcanzar 120 °C. Seguidamente, la temperatura se bajó a 70° C, entonces se añadió en agitación vigorosa 0,045 mol de derivado silatrano (22 mL de TEOS). La solución fue calentada en agitación hasta 118 °C, cuando es añadido 9,36 g de CTAB, compuesto que actúa como agente director de la estructura. Siguiendo bajo agitación vigorosa, la temperatura desciende a 70 °C y se

vierten 180 mL de agua, momento en el cual se forma la suspensión blanca característica. Con el fin de completar la reacción, la mezcla fue pasada a un teflón que se introduce en una estufa a 100 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, la fase sólida formada se recogió mediante filtración a través de un filtro de celulosa de 0,45 µm y se lavó a vacío con agua destilada con el fin de equilibrar su pH desde básico hasta neutro. Finalmente, el sólido obtenido se secó a 70 °C durante 8 horas y, por último, se eliminó la parte orgánica calcinando la mezcla a 550 °C durante 5 horas en una mufla dando lugar al sólido desnudo (**0**).

2.4.2. Funcionalización con aminas

Con el objetivo de modificar la carga superficial de la partícula, la partícula sintetizada (**0**), se funcionalizó con dos concentraciones de 3-aminopropil trialcóxisilano (APTES). Para ello, 1 gramo de partícula se suspendió en 50 mL de acetonitrilo (ACN). En función del grado de funcionalización, se añadió a la suspensión 0,25 mL de APTES (**A**) y 40 mL de APTES (**B**). Posteriormente, se agitó durante 5 horas y media. Seguidamente, la solución se lavó a vacío con agua destilada con el fin de eliminar el exceso de APTES que no ha quedado anclado. Por último, los materiales mesoporosos se introdujeron en una estufa a 40 °C durante 24 horas.

2.4.3. Cargado en partículas mesoporosas

Las partículas mesoporosas se cargaron con dos tipos de moléculas: rodamina B y lisina. El cargado con rodamina B, un compuesto fluoróforo, se realizó con el objetivo de estudiar de manera rápida si la ruta de síntesis empleada para desarrollar un sistema de liberación controlada, no utilizado previamente en el grupo de investigación, era efectivo (desarrollo de la puerta quitosano). En el resto de los casos, se realizó cargado con lisina.

2.4.3.1. Rodamina B

El cargado de la rodamina B (RhB) en los poros de las partículas MCM-41, tanto desnudas como funcionalizadas, se realizó de la siguiente manera: 38 gramos de RhB se suspendieron en 7,5 mL de agua desionizada y a continuación se añadieron 100 mg de partícula desnuda o funcionalizada (A, B). Después, se agitaron las diferentes condiciones a 300 rpm durante 24 horas.

2.4.3.2. Aminoácidos

El cargado de los aminoácidos en el interior de las partículas MCM-41 se realizó por el método de impregnación. Para ello, en primer lugar se preparó una disolución de 40.000 ppm de lisina en una disolución tamponada (HEPES) a pH 4,5. Esta concentración de aminoácido vino determinada por la concentración establecida en el estudio de solubilidad. En segundo lugar, se añadió gota a gota 1 mL de la disolución de lisina en HEPES sobre 100 mg de los sólidos MCM-41 (**0**, **A** y **B**). Por último, se mezcló la solución con los sólidos MCM-41 para favorecer la impregnación, y se dejó secar en estufa a 37 °C durante 24 horas. La operación se repitió cada día hasta alcanzar los 5 ciclos de impregnación.

2.4.4. Anclaje de puertas moleculares

2.4.4.1. N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina

Con el fin de anclar de manera covalente el N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina para crear el primer tipo de sistemas de liberación controlada, se pesaron 50 mg de cada uno de los tipos de partícula (0, A y B) cargados con lisina mediante 5 ciclos de impregnación. A continuación, esta cantidad de sólido se suspendió en 5 mL de etanol y se añadió 0,215 mL de N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina. Después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y 30 minutos. Finalizado este tiempo, los sólidos obtenidos se lavaron con 150 mL de PBS pH2 (condición de puerta cerrada), y se recogió la partícula mediante centrifugación. Por último, se secó a 37°C en estufa overnight. (Pérez-Esteve et al., 2015a)

2.4.4.2. Quitosano

En cuanto a la puerta Quitosano, por una parte, para realizar el estudio con Rodamina, se tuvo que conocer primero que reactivo era el más apto para la funcionalización. Para ello, se probaron dos tipos de grupos funcionales: Isocianato y Fosfonato. Dependiendo de la condición, se añadió en agitación 210 µL de isocianato o 320 µL de fosfonato. Una vez realizado, se dejaron en agitación a 300 rpm durante 24h. La suspensión se centrifugó y el sólido precipitado se secó durante 24 h a 40 °C.

De forma paralela, se creó una solución de quitosano. Para ello, 150 mg de quitosano alto peso molecular se suspendió en una disolución de 153 µL de ácido acético 98 % en 15 mL de agua desionizada. La solución se dejó overnight a 50 °C.

Una vez funcionalizada la partícula con cada grupo funcional, se lleva a cabo la unión de la puerta molecular. Brevemente, 50 mg de las partícula (0, A, B) y grupos funcionales (Isocianato y Fosfonato) con 9,5 mg de EDC en 5 mL de buffer acetato a pH 5, dejándolo en agitación. Transcurrido una hora, se añadió 1 mL de disolución de quitosano, se agitó durante dos horas y se centrifugó a 9500 rpm durante 10 minutos. El sólido depositado se resuspendió con 10 mL de acetato pH 5, centrifugándolo nuevamente. La operación se repitió hasta que el líquido sobrenadante fue transparente. Por último, el pellet se secó en estufa a 40 °C durante 24 horas.

Por otra parte, para anclar covalentemente la puerta quitosano para el estudio con Lisina, se suspendió, en primer lugar, 50 mg de partícula (0, A y B) en 5 mL de etanol y 160 µL de Fosfonato, y paralelamente 50 mg de partícula (0, A y B) en 5 mL de etanol y 105 µL de Isocianato; se dejó agitando overnight, se centrifugó durante 10 minutos a 9000 rpm y el sólido precipitado se secó en estufa a 37 °C durante 24 horas. En segundo lugar, se preparó una disolución de quitosano. Para ello, 150 mg de quitosano de alto peso molecular se suspendieron en una disolución de 153 µL de ácido acético 98 % en 15 mL de agua desionizada, dejando la solución overnight a 50 °C.

En tercer lugar, se procedió al anclaje del quitosano, para lo cual se mezcló 50 mg de sólido seco (0, A, B) y funcionalizado (Isocianato y Fosfonato) con 9,5 mg de EDC y 5 mL de etanol en agitación. Tras una hora, se añadió 1 mL de solución de quitosano y se agitó durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 9000 rpm, y se realizó un ciclo de lavado, para lo cual se suspendió el sólido precipitado en 10 mL de tampón (PBS) a pH 2 (condición de puerta cerrada), centrifugándose tras la resuspensión. Finalmente, el sólido precipitado se secó en estufa a 37 °C durante 24 horas.

2.4.4.3. Ácido Oleico

El anclaje del ácido oleico consta de dos fases ([Poyatos-Racionero et al., 2017](#)). En primer lugar, se funcionalizó la partícula con APTES, para lo cual se pesaron 50 mg de partícula (0, A y B), mezclándose posteriormente cada condición con 7,5 mL de etanol y con 0,73 mL de APTES. Seguidamente, se dejó agitando durante 5 horas y 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 9000 rpm. Después se efectuaron dos lavados, para lo cual el sólido precipitado se resuspendió en 5 mL de etanol. Por último, la partícula se secó en estufa a 37 °C durante 24 horas. En segundo lugar, se preparó una disolución de 10 mL de etanol, 1 mL de ácido oleico y 16 mg de EDC, agitándose 30 min. Posteriormente, 50 mg de partícula (0, A, B) funcionalizada con APTES, se añadió a la solución, dejándolo en agitación overnight. Por último, se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min y se efectuó un ciclo de lavado, para lo cual el sólido precipitado se resuspendió en etanol:agua (2:1), se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se secó a 37 °C durante 24 horas.

2.4.4.4. Lisozima

El protocolo de unión de la MSP y la lisozima se realizó de 3 formas diferentes: unión covalente utilizando una solución acuosa tamponada (PBS) a pH 7, unión covalente utilizando etanol y, por último, el protocolo de unión electroestática al sólido en etanol basándose en los protocolos descritos por [Xue et al. \(2012\)](#).

Para el primer caso, en primer lugar 150 mg de partícula (MCM-41), cargada con aminoácido, tanto desnuda (0) como funcionalizada (A y B) se suspendieron en 11,25 mL de acetona y se añadió 0,876 mL de APTES. Se dejó en agitación 5 horas y 30 min, se centrifugó y se lavó con acetona dos veces con el fin de eliminar el APTES no pegado a la partícula. Por último, se dejó secar a 37 °C. En segundo lugar, 75 mg de lisozima y 8 mg de EDC se añadieron a 2,5 mL de buffer fosfato (50 mM) ajustado previamente a pH 7. La mezcla se dejó en agitación durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 25 mg de partícula, agitándose a 4°C durante 20 min, y centrifugándose posteriormente (9000 rpm).

Con el fin de llevar a cabo el segundo ensayo, en primer lugar 150 mg de partícula (MCM-41), cargada con aminoácido, tanto desnuda (0) como funcionalizada (A y B) se suspendieron en 11,25 mL de acetona y se añadió 0,876 mL de APTES. La mezcla se dejó en agitación 5 horas y 30 min. A continuación, se centrifugó y se lavó con acetona dos veces con el fin de eliminar el APTES no pegado a la partícula. Por último, se dejó secar a 37 °C. En segundo lugar, 75 mg de lisozima y 8 mg de EDC se añadieron a 2,5 mL de etanol, dejando en agitación 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 25 mg de partícula, agitándose a 4°C durante 20 min, y centrifugándose posteriormente (9000 rpm).

En el último caso, primeramente, se preparó una solución de 14 mL de etanol en la que se añadió 36 mg de lisozima, dejándose en agitación 30 min. Transcurrido el tiempo, se añadió 20 mg de partícula (0, A y B), se agitó durante 24 horas, se centrifugó a 9000 rpm, y el sólido precipitado se lavó una vez con 5 mL de tampón fosfato 50 mM pH 2. La mezcla se centrifugó, se eliminó el sobrenadante.

2.5. Caracterización de los sistemas de liberación controlada

2.5.1. Difracción de rayos X

La caracterización del tipo de material sintetizado, así como la determinación del efecto de la funcionalización sobre la ordenación de la partícula, se realizó por difracción de rayos X. Para la realización de la técnica analítica, en primer lugar, la muestra se molturó. En segundo lugar, se introdujo en un porta muestras, en este caso un disco de aluminio, cubriendo de forma homogénea toda la superficie. La obtención del difractograma se realizó en un difractómetro Bruker D8 (Bruker, Coventry, UK), utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$.

2.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Por un lado, se empleó la microscopia electrónica de transmisión (TEM). El modelo utilizado fue JEOL JEM-1010 (JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, Francia). Permitió comprobar que las partículas de óxido de silicio tenían la porosidad típica de las partículas de la familia MCM-41. Para ello, una punta de espátula de partícula se suspendió en un disolvente orgánico, en este caso diclorometano. A continuación, se sonicó durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos para favorecer la desagregación de las partículas. Tras esto, se depositó la disolución gota a gota sobre una rejilla filmada de carbono, se secó a temperatura ambiente, y por último se introdujo en el microscopio.

Para determinar el efecto de la funcionalización sobre la morfología de las partículas, éstas se observaron con microscopio de barrido de emisión de campo (FESEM) Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania). Para ello, las partículas de depositaron sobre una portamuestras que contenía una cinta a doble cara de carbono. Esta cinta además de tener una función adhesiva, tiene la capacidad de disipar los electrones que llegan a la muestra. Las fotografías se obtuvieron trabajando en el modo de electrones secundarios

2.5.3. Análisis del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta (potencial ζ) se determinó utilizando Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se dispersaron en el medio tampón, en este caso PBS, a una concentración de 1 mg/mL. Antes de cada medición, las muestras fueron sonicadas durante 1 minuto para evitar la agregación. El potencial zeta se calculó a partir de los valores de movilidad de partículas aplicando el modelo de Smoluchowski. Las mediciones se realizaron a 25 °C por triplicado.

2.6. Obtención de la cinética de liberación de Rodamina B o lisina en sistemas de liberación controlada susceptibles a cambios de pH

Las cinéticas de liberación de la rodamina o aminoácidos contenidos en los sólidos 0, A y B funcionalizados con aminas (N3), quitosano o lisozima fueron obtenidas poniendo en contacto los diferentes sólidos con fluidos que simulan la digestión: tampón PBS ajustado a pH 2 (estómago) y tampón PBS ajustado a pH 7.5 (intestino) (Pérez Esteve et al., 2016). Para ello, 5 mg de sólido se suspendieron en 10 mL de tampón. A tiempo 5, 180, 300, 1440 y 2880 minutos de contacto entre la partícula y la solución se extrajo 1 mL y se filtró a través de un filtro de teflón de 0,45 mm. La rodamina liberada

a cada uno de los tiempos se determinó a través de la media de la fluorescencia que presentaba la muestra. Para ello, 300 mL de las alícuotas filtradas se cargaron en una placa de 96 pocillos, y luego se midió la emisión de la rodamina B a 572 nm (tras la excitación a 555 nm) utilizando un fluorímetro Jasco FP-8200. La cantidad de lisina liberada a cada uno de los tiempos se determinó utilizando cromatografía líquida de alta resolución y detector evaporativo de dispersión de luz (ver sección 2.8).

Por un lado, para controlar las cinéticas de liberación de los aminoácidos con las puertas moleculares quitosano y N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentiamina ancladas, en primer lugar, se pesó 10 mg de partícula cargada y se suspendió en 25 mL de PBS a pH 2 (condición puerta cerrada) o PBS a pH 7,5 (condición de puerta abierta), En segundo lugar, se dejó en agitación y a tiempo 5, 90, 180, 270 y 570 minutos se extrajo 1 mL y se filtró. En último lugar, se analizaron las muestras midiendo la absorbancia y de manera proporcional se obtuvo la concentración de aminoácido liberado.

Por otro lado, para controlar la liberación de aminoácido con la puerta molecular Lisozima, se resuspendió el sólido precipitado obtenido tras la centrifugación en 7,5 mL de solución tamponada a pH 2 o a pH 7,5, en función de las condiciones del ensayo.

2.7. Obtención de la cinética de liberación de lisina en sistemas de liberación controlada susceptibles a cambios en la concentración de sales biliares

Las cinéticas de liberación de la rodamina o aminoácidos contenidos en los sólidos 0, A y B funcionalizados ácido oleico fueron obtenidas poniendo en contacto los diferentes sólidos con fluidos que simulan la digestión: agua desionizada y agua desionizada con CTAB 10^{-2} M (simulando surfactante tipo sales biliares del intestino) (Poyatos-Racionero et al., 2017). En este trabajo no se trabajó directamente con sales biliares debido a la dificultad de desarrollar un método cromatográfico que separara el aminoácido de una matriz tan compleja de compuestos químicos como es la bilis. Para ello, 5 mg de sólido se suspendieron en 10 mL de agua desionizada o agua desionizada con CTAB. A tiempo 5, 180, 300, 1440 y 2880 minutos de contacto entre la partícula y la solución, se extrajo 1 mL de fluido, y se filtró a través de un filtro de teflón de 0,45 mm. La cantidad de lisina liberada a cada uno de los tiempos se determinó utilizando cromatografía líquida de alta resolución y detector evaporativo de dispersión de luz (ver sección 2.8).

2.8. Cuantificación de los aminoácidos por HPLC

La cuantificación de lisina liberada a cada uno de los tiempos de ensayo fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución y un detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD). El modelo que se utilizó fue 1260 Infinity II de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EUA), que estaba compuesto por un módulo desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático con compartimento termostatzado de columnas integrado y un detector evaporativo de luz dispersada (ELSD modelo 380). La columna empleada fue una Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 100 mm, 4 μ m (Agilent Technologies).

Para el análisis de los aminoácidos las condiciones cromatográficas que se emplearon fueron adaptadas de Yan et al. (2007). Éstas fueron: 20 μ L de volumen de inyección, una temperatura de 30 °C para la columna y un caudal de 1 mL·min⁻¹. La fase móvil se preparó mezclando acetonitrilo (fase A) con agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,7% (v/v) (fase B). El gradiente que se empleó fue el siguiente: 0-2

min, 100% B; 2-5 min, 100-85% de B; 5-7 min, 85-70% de B; 7-8 min, 70% B y seguidamente se volvió a las condiciones iniciales.

Las condiciones seleccionadas para el detector ELSD fueron: una temperatura de evaporación de 100°C, una temperatura de nebulización de 80°C y un caudal de gas de 1.2 SLM (Standard Liter per Minute).

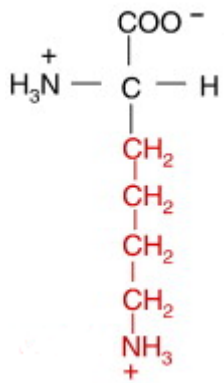
Para la adquisición de datos se utilizó el software OpenLAB CDS LC ChemStation (rev.C.01.07, Agilent Technologies).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección del aminoácido objeto de estudio y de su máxima solubilidad

De todos los aminoácidos esenciales encontrados en bibliografía (Hartmann y Meisel, 2007). Se seleccionó uno de ellos, con el fin de reducir el número de variables de estudio. Concretamente, se estudió el aminoácido lisina por ser uno de los más limitantes en cuanto a síntesis proteica se refiere (Robinson et al., 1980). La estructura, grupo funcional y punto isoeléctrico del aminoácido elegido según datos de Bischoff y Schlüter (2012) se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Aminoácido utilizado en el estudio de cargado y liberación: Lisina (Lys). Se muestra su punto isoeléctrico, grupo funcional y características conformacionales según Bischoff y Schlüter (2012).

	Lys
Punto isoeléctrico	9.74
Grupo funcional	Básico
Características conformacionales	

Una vez seleccionado el aminoácido se procedió a estudiar su máxima solubilidad en tampón HEPES, ya que es el medio utilizado para realizar el cargado por impregnación de los aminoácidos. Tras diferentes concentraciones estudiadas, se determinó que 40.000 mg de lisina/L era una concentración donde la lisina todavía se solubilizaba y por otra parte estaba suficientemente concentrada como para cargar al máximo los poros del material MCM-41 tras diversos ciclos de impregnación.

3.2. Selección de las condiciones de separación cromatográfica y detección de los aminoácidos

Una vez seleccionado el aminoácido de interés, y establecidas las condiciones que se emplearán para el cargado, se procedió a poner a punto el método para la separación y cuantificación de la cantidad de lisina liberada por cada uno de los sistemas de liberación que se preparen a lo largo de este trabajo.

Con el fin de poder detectar los aminoácidos por medio de un HPLC con detector UV-VIS, que mide la absorción de la radiación en aquellos compuestos que contienen grupos cromóforos, es necesario derivatizarlos antes de entrar en la columna

(precolumna) o después de pasar por ella, pero siempre antes de que entre en el detector, ya que los aminoácidos no contienen compuestos cromóforos. La derivatización consiste en transformar los aminoácidos en compuestos químicos similares, pero con propiedades diferentes que les permitan ser más sensibles para su detección (Reuhs et al., 2010). Este proceso dificulta el análisis, ya que se alargan mucho los tiempos, la respuesta es lenta, se reduce la sensibilidad y la precisión, y los picos se ensanchan. Sin embargo, han aparecido nuevas técnicas, que sin necesidad de derivatizar, se pueden detectar estos compuestos, en este caso aminoácidos, de forma rápida y sencilla. Una alternativa se basa en la utilización de detectores evaporativos de dispersión de luz (ELSD), que permiten detectar compuestos de baja volatilidad sin depender de las propiedades químicas del analito. Por tanto, esta técnica se basa en la detección de la luz dispersada por los aminoácidos a través de la nebulización y evaporación de la fase móvil, de forma que todos los analitos que sean menos volátiles que la fase móvil, se detectan. Las ventajas de este detector son la respuesta universal que ofrece, cumpliendo siempre la anterior premisa (Mathews et al., 2004).

Una vez seleccionado este método cromatográfico, se procedió a la selección de las condiciones de separación cromatográficas. Éstas fueron adaptadas de las descritas por Yan et al. (2007).

La **Figura 1.** muestra el cromatograma típico de la lisina, donde se puede observar que el tiempo de retención del aminoácido es 3,2 min, y del tampón PBS (**Figura 1. b**) empleado en la mayoría de estudios de liberación. El tiempo de retención de este segundo analito es de 2,5 min. Por tanto, se puede concluir que estas condiciones son adecuadas para separar ambos analitos.



Figura 1: Valores de las áreas correspondientes al aminoácido Lisina a una concentración de 100 ppm (a) y al tampón PBS pH 7,5 sin aminoácido(b).

Una vez demostrada la capacidad del método HPLC para separar ambos analitos, se procedió a determinar si la respuesta del HPLC dependía de la concentración de aminoácido presente en medio y a estudiar el rango de respuesta lineal. Para ello se pincharon en el equipo concentraciones de lisina en HEPES (10, 50, 100, 250 y 500 mg/L).

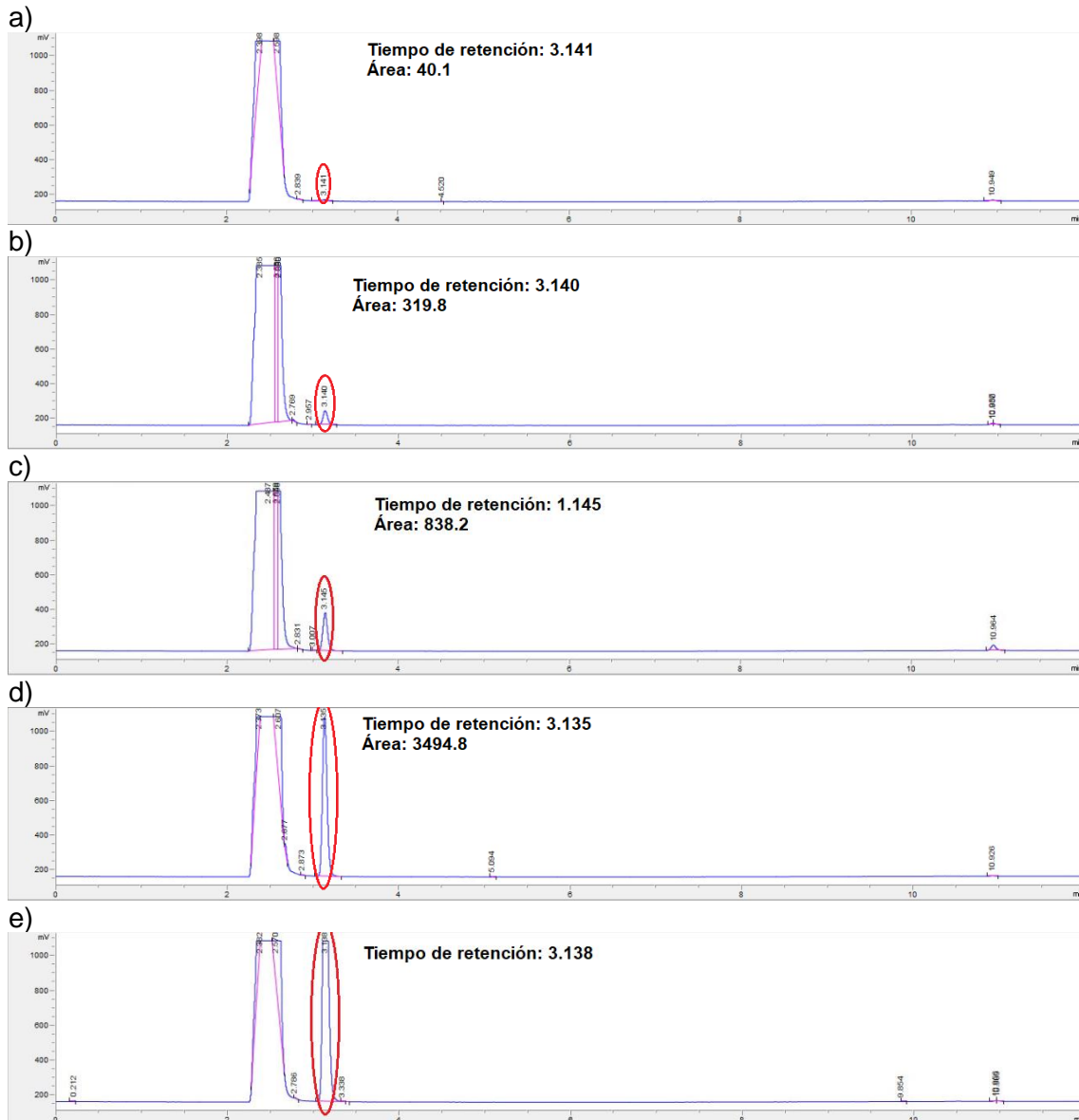


Figura 2: Valores de las áreas correspondientes a las diferentes concentraciones (10 ppm(a), 50 ppm (b), 100 ppm(c), 250 ppm (d) y 500 ppm (d)) de Lisina en PBS a pH7,5.

Como puede observarse en la **Figura 2.**, las áreas crecieron progresivamente al hacerlo la concentración. Destacar que a concentraciones superiores a 250 ppm los picos cromatográficos se encontraban saturados, resultando imposible su cuantificación. Debido a lo anterior, cuando en alguna de las liberaciones se contó con concentraciones superiores a 250 mg/L hubo que diluir la muestra.

3.3. Caracterización de los soportes de partida para la preparación de los diferentes sistemas de liberación controlada

Una vez determinadas las condiciones que permiten detectar y cuantificar el aminoácido a estudiar (Lisina) por medio de la técnica HPLC-ELSD, se procedió a sintetizar el material mesoporoso de óxido de silicio del tipo MCM-41. Una vez sintetizado, el material MCM-41 se funcionalizó con dos proporciones de amina para cambiar la carga superficial de la partícula y así estudiar el efecto de la carga superficial

sobre la eficacia de encapsulación y liberación. Cada uno de los tres materiales (0, A y B) se cargaron con lisina mediante la técnica de la impregnación, utilizando 5 ciclos.

Una vez obtenidos los sólidos cargados, se caracterizaron con tres técnicas estándar, con el fin de determinar si los procesos de síntesis habían conducido a obtener los soportes esperados.

La primera de ellas fue una caracterización por difracción de rayos X en polvo (XRD). Esta técnica permite caracterizar el tipo de estructura ante la que nos encontramos. En la **Figura 3**, se puede observar los patrones de difracción de rayos X de polvo de la MCM-41 i) desnuda sin calcinar, ii) desnuda calcinada (0), iii) tras una funcionalización con APTES (A), iv) tras otra funcionalización con APTES (B), v) sin funcionalizar y cargada con aminoácido y vi) funcionalizada con APTES (B) y cargada con aminoácido.

Como se puede observar, el material sin calcinar (i) presentó cuatro picos característicos del orden hexagonal del material MCM-41, registrados como reflexiones de Bragg (1 0 0), (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) (Pérez-Esteve et al., 2015a). En el material calcinado (ii) se observó un desplazamiento hacia la derecha de la reflexión (1 0 0), debido a la contracción de la celda por la condensación de los silanoles durante la calcinación. Tras la funcionalización A (iii) o B (iv) con aminas se divisó una pérdida de los picos característicos (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) debido a una disminución del contraste causado por el llenado de poros de aminas. Lo mismo sucedió con el material desnudo cargado con Lisina (v) y con el material funcionalizado con APTES (B) cargado con el aminoácido (vi). Sin embargo, el mantenimiento el pico (1 0 0) indica que todas las partículas mantienen la porosidad típica MCM-41, y que por tanto los procesos de funcionalización y cargado del aminoácido no modifican o alteran la porosidad típica del material MCM-41 de partida.

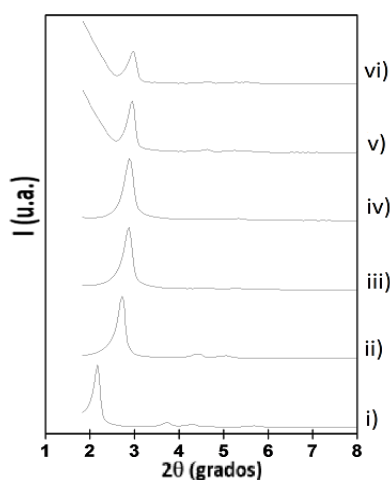


Figura 3: Diffractogramas XRD de los sólidos MCM-41, i) antes de calcinar, ii) después de calcinar (0), iii) tras la funcionalización A, iv) tras la funcionalización B, v) desnuda y cargada con aminoácido y vi) funcionalizada con APTES (B) y cargada con aminoácido

La segunda técnica empleada fue la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), a partir de las cuales se obtuvieron las imágenes mostradas en la **Figura 4**. Como se puede observar, las partículas sin funcionalizar tienen la morfología y porosidad característica de las partículas MCM-41. Las partículas MCM-41 pertenecen a la familia de las MSP llamadas M41S, es un tipo de partícula hexagonal con un sistema de poros uniforme (Pérez-Esteve et al., 2016). Esta matriz posee multitud de ventajas, en primer lugar cuenta con propiedades de sistemas nanoestructurados como son la alta superficie específica (700 -1000 m²/g), y volúmenes de poro específicos (0,6-1 cm³/g), en segundo lugar, posee

tamaño de poro grande (2-10 nm) (Colilla, González y Vallet-Regí, 2013), aunque por composición pueden llegar a formar poros de entre 2 y 50 nm (Zhao, 2006), y en tercer lugar registran un tamaño micro, que impide atravesar las mucosas del tracto digestivo, por tanto, se podrá eliminar en las heces tras la digestión (Pérez-Esteve et al., 2015b).

Comparando estas imágenes con las de la MCM-41 funcionalizada (B) se llegó a la conclusión de que la funcionalización con 3-aminopropiltriethoxisilano no afecta ni a la morfología ni a la porosidad de las partículas.

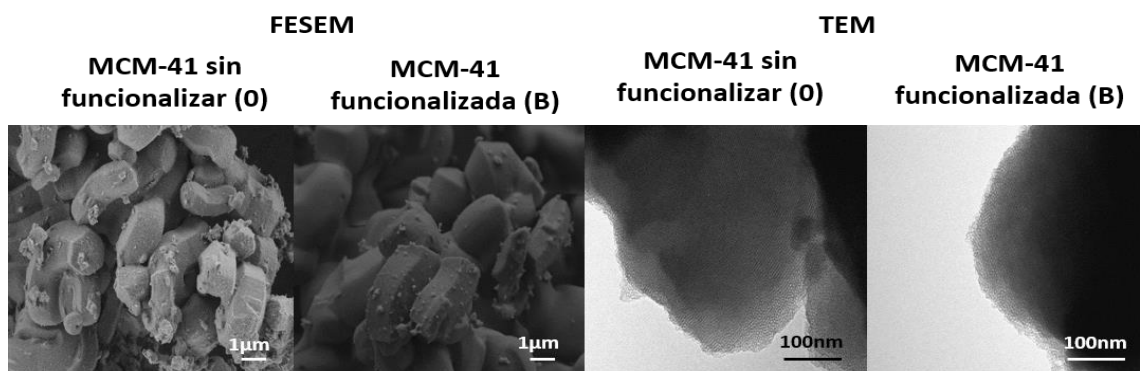


Figura 4: Caracterización de la forma y la porosidad de la partícula MCM-41 tanto desnuda como funcionalizada, por medio de la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La tercera y última técnica de caracterización que se empleó fue la determinación del potencial zeta (Z) de las partículas (0, A y B) a diferentes pH (4,5, 7,5 y 9,5). Esta técnica permitió cuantificar las cargas que tenían las MSP desnudas y funcionalizadas con aminas a pH ácido, neutro y básico.

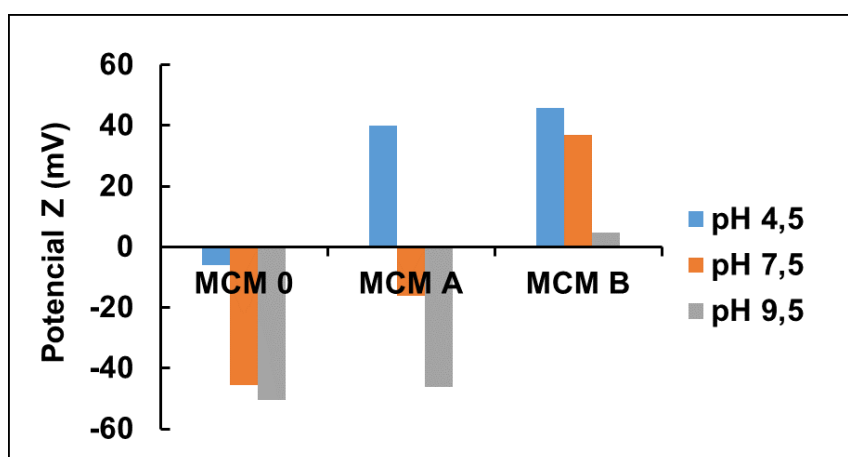


Figura 5: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) en MCM-41 tanto desnuda (0) como con funcionalizada (A y B); a pH (4.5, 7.5 y 9.5).

En la **Figura 5.** se observa como varían los valores del potencial Z de las mesoporosas desde valores muy negativos (-40 mV) a valores muy positivos (+40 mV), en función del grado de funcionalización y del pH en el que se encuentre la MSP.

Por un lado, las MSP desnudas presentan valores negativos a cualquiera de los tres pH. Además, cuanto más básico el pH del medio, y por tanto más lejano al del punto isoeléctrico de la sílice (pH = 2), los valores van siendo cada vez más negativos por el aumento de los grupos SiOH desprotonados que existen en el medio. Por tanto, se puede afirmar que la MCM-41 sin funcionalizar se encuentra cargada negativamente por encima del punto isoeléctrico (pH 2-3) (Pérez-Esteve et al., 2016).

Por otro lado, las MSP funcionalizadas presentan diferencias significativas, ya que a mayor concentración de aminas más positiva es la partícula. A pH 4,5 tanto los sólidos A como los B presentan un valor positivo de potencial zeta, es decir, con la mínima funcionalización aportada (A) se consigue, no solo virar valores negativos a positivos, sino que la carga positiva alcanzada sea máxima. A pH 7,5, la MCM-41 con la mínima funcionalización (A) no consigue cambiar el potencial de negativo a positivo, sin embargo, la de mayor grado de funcionalización (B) sí y en gran medida. A pH 9,5, a medida que aumenta la concentración de amina la carga es cada vez menos electronegativa hasta que en la funcionalización tipo B, la carga vira a positivo. Por tanto, las partículas funcionalizadas (B) poseen cargas positivas en los diferentes valores de pH estudiados (4,5, 7,5 y 9,5). Los diferentes valores de potencial Z medidos permiten no solo caracterizar las partículas, sino que además es utilizado como método de confirmación de que el pegado de las aminas a la superficie de la MSP es afirmativo.

3.4. Caracterización de los sistemas de liberación controlada

Tras analizar los soportes de partida se procedió a la caracterización de los sólidos (0 y B), cargados con aminoácidos, y funcionalizados con las diferentes puertas moleculares. Esto permite obtener, por un lado, la caracterización de las partículas, y por otro, la confirmación de que el anclaje es adecuado. Para ello, se utilizaron dos técnicas ya mencionadas anteriormente: la difracción de rayos X y el análisis del potencial Z. Para esta sección se han omitido los sólidos preparados a partir de la MCM-41 funcionalizada con la menor cantidad de APTES, ya que es una situación intermedia entre los sólidos desnudos (A) y altamente funcionalizados (B).

3.4.1. Puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina

3.4.1.1. Difracción de rayos X

En la **Figura 6.** se muestran los difractogramas de la partícula MCM-41 desnuda (i) y funcionalizada con APTES (ii) impregnada con lisina tras el anclaje del N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina sobre la superficie de ambos tipos de partícula. Tanto los sólidos desnudos (i) como los sólidos funcionalizados B (ii) presentan el pico característico de la partícula (1 0 0), que nos informa de que la porosidad típica de la partícula se ha mantenido. No obstante, las reflexiones (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) desaparecieron por la disminución de contraste entre poro/pared provocado por la ocupación del espacio de la MSP por la puerta molecular, por el APTES empleado en la funcionalización, y por el cargado de la MSP con aminoácido. El resultado confirma que hay elementos en mayor o menor medida en el interior de la MSP o en su superficie que ocupan el espacio disponible en la MSP.

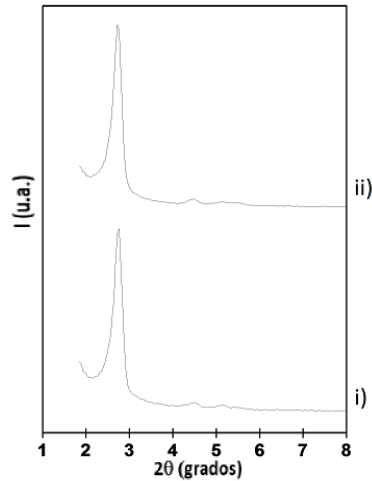


Figura 6: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 cargados con aminoácido tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados (B) con la puerta N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina anclada a la superficie.

3.4.1.2. Potencial zeta (Z)

Con el fin de determinar la eficacia de la funcionalización de los sólidos 0 y B cargados con aminoácidos con la N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina (N3), se procedió a determinar el potencial zeta de los materiales antes y después del anclaje de la N3.

Tal y como muestra la **Figura 7.**, la puerta molecular influía de manera significativa sobre las cargas de las partículas. Tanto las partículas desnudas cargadas con aminoácido (0) como funcionalizadas (B) experimentan un aumento de cargas positivas con la adición de la puerta. En el caso de la partícula desnuda, la puerta molecular no hace virar el signo de la carga, por el contrario, en el caso de la partícula funcionalizada, si experimenta el cambio desde valores negativos a valores positivos. Se demuestra, por tanto, que el anclaje es afirmativo.

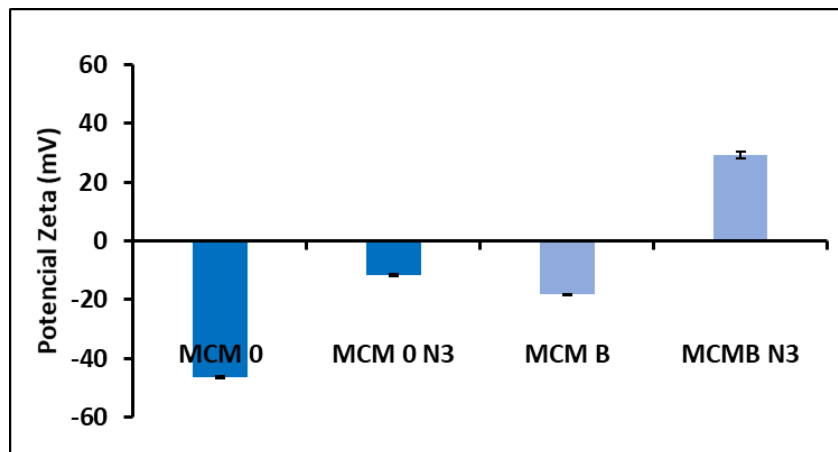


Figura 7: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 cargadas con aminoácido (0 y B) antes y después del anclaje de la N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina (N3).

3.4.2. Puerta molecular quitosano (CS)

3.4.2.1. Difracción de rayos X

La figura 7 muestra los difractogramas obtenidos de las partículas MCM-41 tras anclar quitosano de alto peso molecular a través de un grupo funcional Isocianato o Fosfonato a la partícula desnuda (0) o funcionalizada con N3 (B).

Como en los casos anteriores, la **Figura 8.** muestra que tras el cargado y anclado del quitosano se mantiene la estructura de la MCM-41, ya que la reflexión (1 0 0) no se perdió en ningún caso.

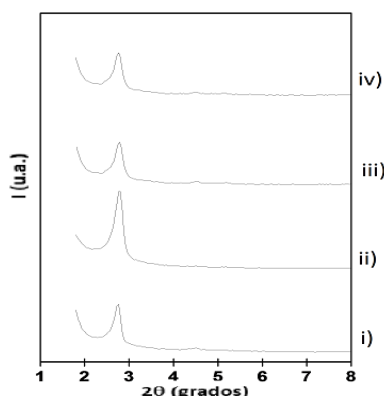


Figura 8: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 con la puerta molecular quitosano (CS) anclada al sólido desnudo (i, iii) o funcionalizado con aminas (ii y iv) a través de grupos Isocianato (i y ii) o Fosfonato (iii y iv).

3.4.2.2. Potencial zeta (Z)

Con el fin de conocer si la puerta quitosano se anclaba correctamente, primero fue preciso estudiar el pegado de los grupos funcionales (Isocianato y Fosfonato) a las MSP. Para ello se caracterizaron las diferentes MSP mediante el potencial zeta de las partículas MCM-41 (0 y B) con los diferentes grupos funcionales (Fosfonato e Isocianato) a pH 4,5.

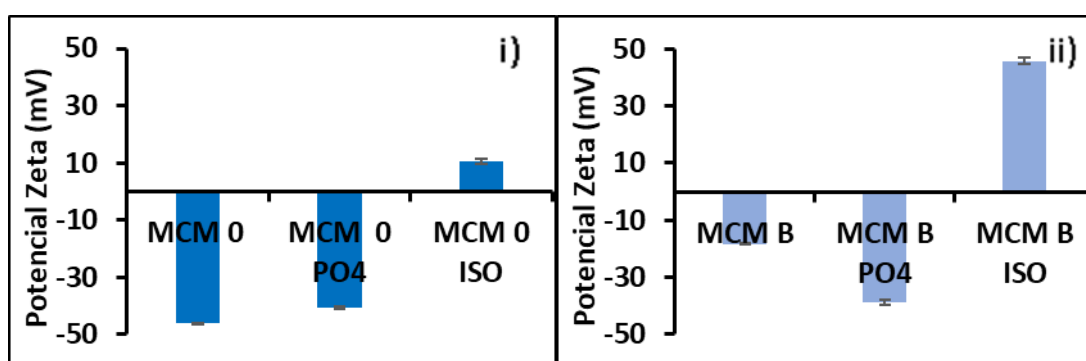


Figura 9: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 0 (i) y B (ii) con los grupos funcionales (Fosfonato e Isocianato) a pH 4,5.

Como se muestra en la **Figura 9.**, tanto los sólidos desnudos (0) como los sólidos funcionalizados (B) presentan variaciones significativas en su potencial zeta debido a la segunda funcionalización de las MSP con los grupos funcionales. Por un lado, la funcionalización con grupo Fosfonato mantuvo el potencial zeta de las partículas en valores negativos, siendo la variación más significativa en el caso de los sólidos B. La funcionalización con el grupo funcional isocianato provocó un cambio en el potencial

zeta de las partículas, desde valores negativos a valores positivos en ambos casos (partículas 0 y partículas B).

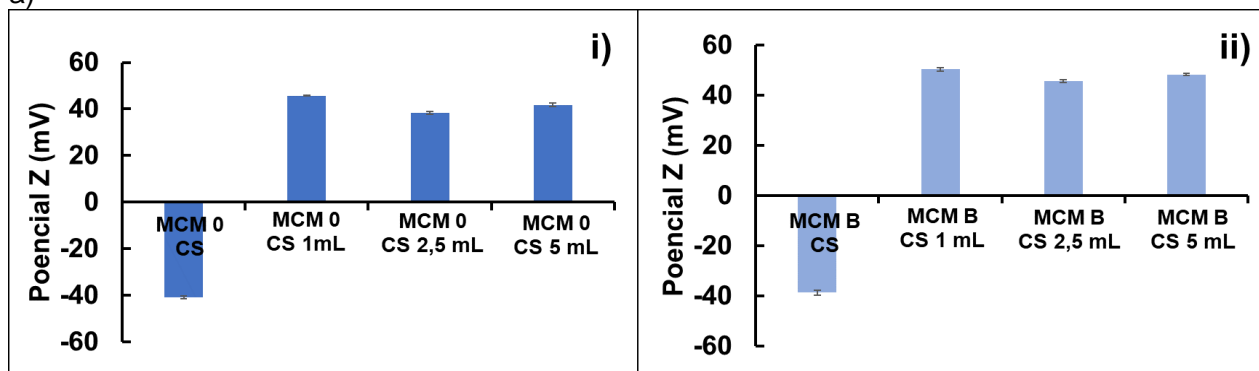
Unido a lo anterior, las **Figuras 10 a.** y **10 b.** muestran el cambio de potencial en la superficie de la MSP tanto en partículas desnudas (0) como funcionalizadas (B) tras dejarlas reaccionando con diferentes cantidades (1, 2,5 y 5 mL) de quitosano (CS) de alto peso molecular.

Por una parte, la **Figura 10 a.** muestra como la adición de CS a partículas con el grupo funcional fosfonato hizo virar las cargas superficiales de valores negativos (sin quitosano) a positivos (con quitosano) . El potencial zeta no varió significativamente entre diferentes cantidades de quitosano, aunque los valores de potencial zeta fueron más positivos cuando se anclaron sobre partículas previamente funcionalizadas con APTES (B).

Por otra parte, en la **Figura 10 b.** también se observó un cambio de carga de negativo a positivo tras la funcionalización a través de grupo Isocianato. En este caso, puesto que se partía de potenciales zetas positivos tanto en las partículas 0 como B funcionalizadas con isocianato, el cambio no resultó tan evidente. Aun así, en las partículas 0 se observa como a mayor cantidad de quitosano, más positivo es el potencial zeta.

De esta manera, a través del cambio en el potencial zeta en cada uno de los pasos de funcionalización de la partícula, se puede concluir que las reacciones químicas propuestas para el anclado del quitosano han sido efectivas. Por otra parte, puesto que en la mayoría de los casos no se observaron diferencias entre añadir 1 y 5 mL de solución de quitosano en ácido acético en el potencial zeta, se eligió la cantidad de 1 mL, ya que los sólidos resultantes se secaban más rápidamente y se molturaban más fácilmente.

a)



b)

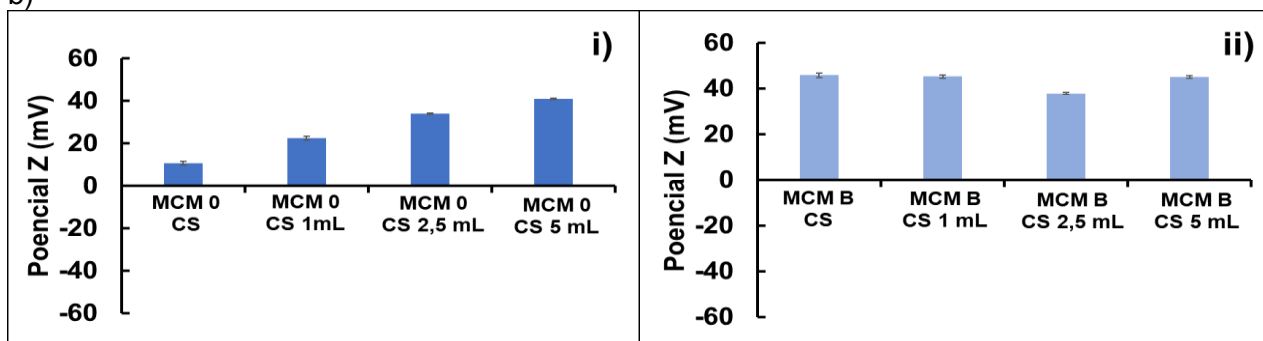


Figura 10: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 0 (i) y B (ii) con los diferentes grupos funcionales (Fosfonato (a) e Isocianato (b)) tras en anclado de diferentes cantidades de quitosano

3.4.3. Puerta molecular Ácido Oleico

3.4.3.1. Difracción de rayos X

En la **Figura 11**, se muestran los difractogramas de los sistemas de encapsulación basados en MCM41 -desnuda (0) (i) y funcionalizada (B) (ii)- impregnada con lisina y recubierta de una capa de ácido oleico unido covalentemente a la superficie del sólido a través de enlaces con grupos funcional amino. Por una parte, se pudo observar que, pese a la pérdida de contraste, la reflexión típica (1 0 0) no se perdió. Por lo tanto, el anclado del oleico para actuar como puerta molecular no la porosidad característica de la partícula, en este caso MCM-41.

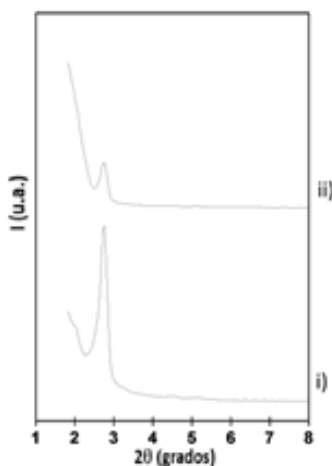


Figura 11: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados B, con la puerta molecular Ácido Oleico anclada.

3.4.3.2. Potencial zeta (Z)

Por medio del potencial zeta se pudo comprobar la eficacia del pegado del ácido oleico a través de grupos amino sobre la partícula. Tal y como se observa en la **Figura 12**., el ácido oleico (cargado negativamente a pH neutro) mantiene la superficie de la MSP en valores negativos, pese a que éste se ancla a través de grupos aminos. De esta manera, se confirma la eficacia de la reacción química de anclado de ácido oleico sobre la superficie.

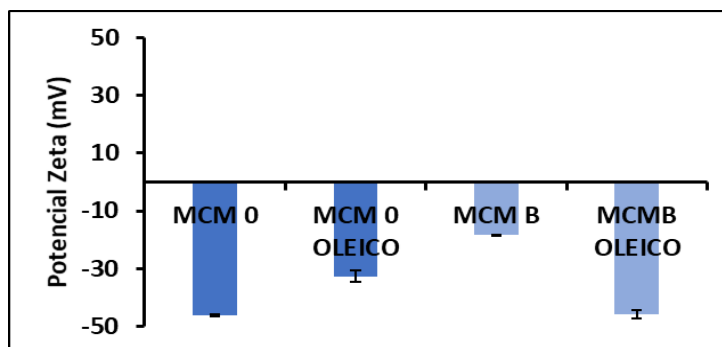


Figura 12: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 (0 y B) con la puerta molecular Ácido Oleico anclada.

3.4.4. Puerta molecular Lisozima

3.4.4.1. Difracción de rayos X

Al realizar la difracción de rayos X a los sólidos MCM-41, cargados con aminoácido, con la puerta molecular lisozima anclada, se obtuvieron los diferentes difractogramas que se muestran en la **Figura 13.**, donde i) son los sólidos preparados partiendo de MCM-41 desnuda (0) y ii) partiendo de sólidos funcionalizados con APTES (B). En ambos se pudo encontrar la reflexión característica (1 0 0) de la MCM-41, que corrobora que la porosidad no se vio afectada por el proceso de anclado de la puerta molecular. También se pudo observar que las reflexiones (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) habían desaparecido, lo que significó la pérdida de contraste entre el poro y la pared de la MSP, por la colmatación de los primeros por el aminoácido, el APTES y la puerta molecular.

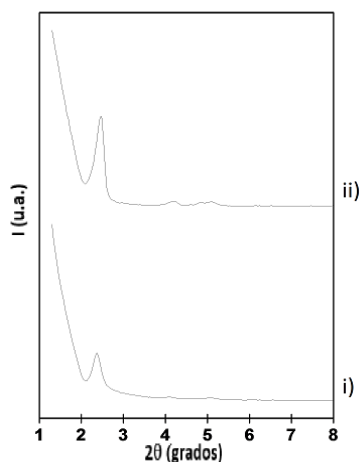


Figura 13: Difractogramas XRD de los sólidos MCM-41 tanto i) desnudos (0) como ii) funcionalizados con la máxima concentración de APTES (B), ambos con la puerta molecular Lisozima anclada.

3.4.4.2. Potencial zeta (Z)

Por último, con la ayuda de nuevo del análisis del potencial zeta se pudo concluir que la lisozima se ancló correctamente sobre la superficie tanto de partículas desnudas (0) como funcionalizadas con APTES (B). En ambos casos, se puede observar que tras en anclado de la lisozima, el potencial zeta tiende a valores cercanos -30 mV.

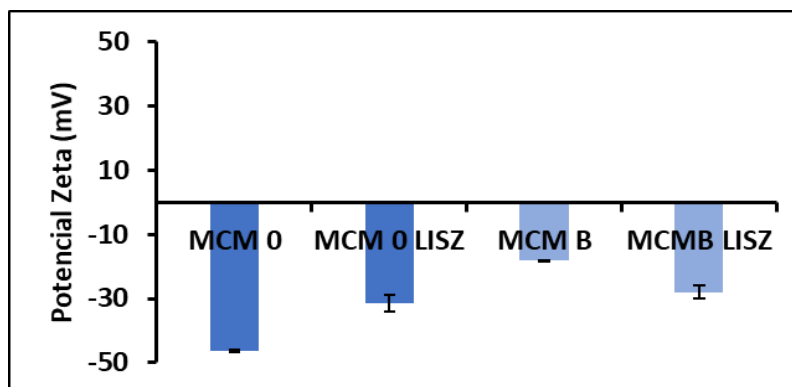


Figura 14: Valores del potencial zeta en milivoltios (mV) de las partículas MCM-41 (0 y B) con la puerta molecular Lisozima anclada.

Como conclusión a los diferentes apartados de caracterización de sólidos, tanto los utilizados como soporte (3.1), como los utilizados como sistemas de liberación controlada (3.2) se puede decir que se han sintetizado de manera satisfactoria, y que la funcionalización tanto con APTES, como con el anclado posterior de grupos funcionales, han modificado la carga superficial de la MCM-41, sin modificar la porosidad de las partículas.

3.5. Estudio de las cinéticas de liberación de los diferentes sistemas de liberación controlada

Una vez se comprobó, por medio de la caracterización con rayos X y potencial zeta, que las diferentes rutas de síntesis conducían a la obtención de sistemas híbridos orgánico-inorgánicos sin modificar la porosidad del material MCM-41, se procedió a estudiar su capacidad para modular la liberación de la lisozima encapsulada en su interior. Para una mejor comprensión de los resultados, tal y como se ha realizado en el apartado anterior, esta sección se ha dividido en apartados según el tipo de puerta molecular utilizada.

3.5.1. Puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina

A través de la ejecución del protocolo de liberación ya explicado, y gracias al empleo del equipo cromatográfico se determinaron los perfiles de liberación de la lisina desde los sólidos que utilizan N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina como puerta molecular. Como puede observarse en la figura 17, el perfil de liberación del aminoácido depende tanto del medio donde se realiza la liberación (pH=2 o pH=7), pero sobre todo de la cantidad de APTES anclado a la superficie del sólido antes de la impregnación con aminoácido.

Como se observa en la **Figura 15. i**, cuando el material es muy negativo (ausencia de APTES), no existe diferencia entre el perfil de liberación a pH ácido o neutro. De esta manera, la puerta molecular no está contribuyendo a modular la liberación en función del pH del medio. Cuando se añade una pequeña cantidad de APTES, empieza a observarse una diferencia entre la cantidad de aminoácido liberado en función del pH del medio. Esta diferencia es máxima cuando se emplea una mayor cantidad de APTES para la funcionalización del material de partida (B). En este caso, mientras que a pH ácido el sólido libera 2,5 mg de lisina/100 mg de sólido; a pH 7.5 (intestino) libera alrededor de 3 mg de lisina/100 mg de sólido. En cualquier caso, en ninguno de los tres

casos se ha conseguido una liberación nula a pH 2 ni un perfil de liberación controlada, ya que en los primeros 5 minutos la gran mayoría de aminoácido fue liberado.

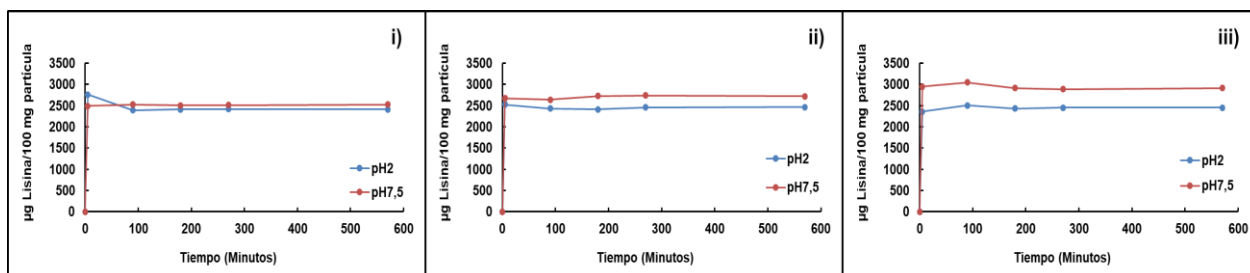


Figura 15: Valores de concentración de Lisina (Lys) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) con la puerta molecular N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina anclada; a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 minutos).

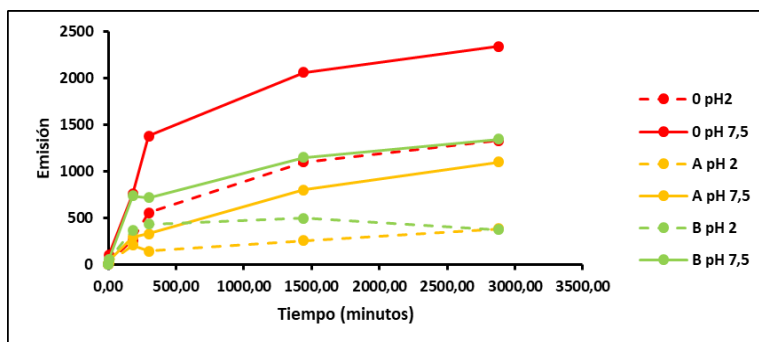
Estos resultados son muy diferentes a los obtenidos por Pérez-Esteve *et al.* (2015a) en un trabajo de encapsulación con ácido fólico. Estos autores, utilizando el mismo tipo de puerta pudieron obtener una liberación cero de la vitamina a pH ácido y una liberación sostenida de la misma a lo largo de 2h.

3.5.2. Puerta molecular quitosano

En un nuevo intento por conseguir un sistema de liberación controlada capaz de inhibir la liberación de la lisina a pH ácido, y liberarla a pH neutro de manera controlada se propuso trabajar con quitosano como puerta molecular. Puesto que nunca se había trabajado con anterioridad en el grupo de investigación con esta puerta, en un primer momento se procedió a optimizar las condiciones de síntesis de los sólidos, trabajando con rodamina como cargo. La utilización de rodamina en vez de aminoácido durante la fase de puesta a punto de un sistema de liberación controlada posee numerosas ventajas como son la simplicidad y la rapidez del análisis, ya que para ello se utiliza el fluorímetro que proporciona resultados menos costosos en cuanto al protocolo a seguir, y en un tiempo menor en comparación con la utilización del equipo HPLC para la cuantificación de aminoácidos. De ahí que la rodamina se emplee en trabajos previos con el fin de demostrar que el ensayo es afirmativo.

Dicho lo anterior, el colorante se cargó en las partículas desnudas (0) y funcionalizadas (A y B), tanto donde el grupo funcional de anclado del quitosano era el Isocianato (i) como el Fosfonato (ii). Los estudios de liberación se llevaron a cabo en condiciones de puerta cerrada -pH 2 (gráficas con línea discontinua)- y en condiciones de puerta abierta -pH 7,5 (gráficas con línea continua)-.

a)



b)

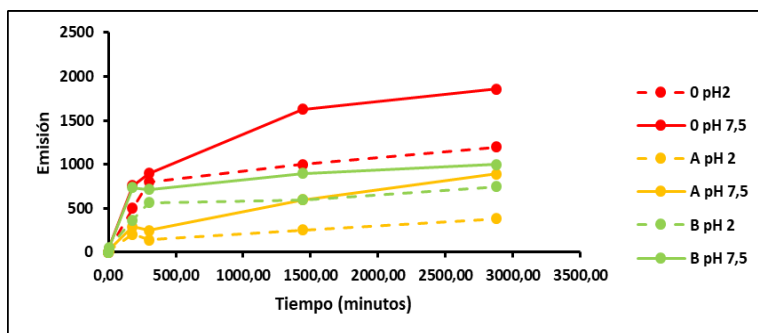


Figura 16: Valores de emisión de Rodamina B (RhB) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 (0, A y B ancladas con quitosano, previamente funcionalizadas con los grupos funcionales Isocianato (a) y Fosfonato (b); a diferentes tiempos de liberación (5 minutos, 180 min, 300 minutos, 1440 minutos y 2880 minutos).

Como se puede observar en la **Figura 16**, dependió del pH al que se realizó la liberación varió la cantidad de rodamina liberada. A pH 2 siempre se obtuvo una menor liberación que a pH 7,5 confirmando que las moléculas de quitosano son un tipo de polímero que puede conducir a dar lugar a sistemas de liberación controlada basados en cambios en el pH del medio.

Si comparamos el efecto de la funcionalización de la partícula, podemos ver que la máxima liberación se produce siempre cuando la partícula está desnuda. En partícula funcionalizada con APTES, no existen grandes diferencias entre funcionalizar con más o con menos cantidad de amina. Esto pudo ser debido al mayor cargado de rodamina en la MSP cuando esta se encuentra sin funcionalizar, debido al mayor espacio de poro, y una mayor atracción electrostática, llegando a la conclusión de que cuanto más carga, más libera.

Si comparamos el efecto de la molécula utilizada para en anclaje del sólido (gráficas a y b), observamos grandes diferencias entre utilizar Fosfonato o Isocianato. Aunque el perfil de liberación es bastante similar, no lo es la escala. De esta manera, cuando se utiliza el Isocianato como grupo funcional para anclar el quitosano, se consigue retener mucha más cantidad de rodamina que cuando se utiliza el Fosfonato.

Una vez demostrado el funcionamiento de la puerta quitosano con el colorante rodamina, se empezó a trabajar con sólidos impregnados de aminoácido. La **Figura 17**. muestra las cinéticas de liberación de lisina desde los diferentes sólidos conteniendo quitosano como puerta molecular a pH 2 (condición de puerta cerrada) y pH 7,5 (condición de puerta abierta). A partir de la figura se pudo llegar a la conclusión que en ninguno de los sólidos (i, ii, iii) se muestra una clara influencia de la funcionalización, ya que a mayor cantidad de APTES no existe una mayor liberación de Lisina. Lo que sí que se observa, es que en los sólidos preparados a partir de MCM-41 0 y B, existe una mayor liberación a pH 7.5, tal y como ocurría en la liberación de la rodamina. Pese a esta pequeña diferencia, no se pudo conseguir ni una liberación cero a pH 2, ni una liberación sostenida a pH 7.5.

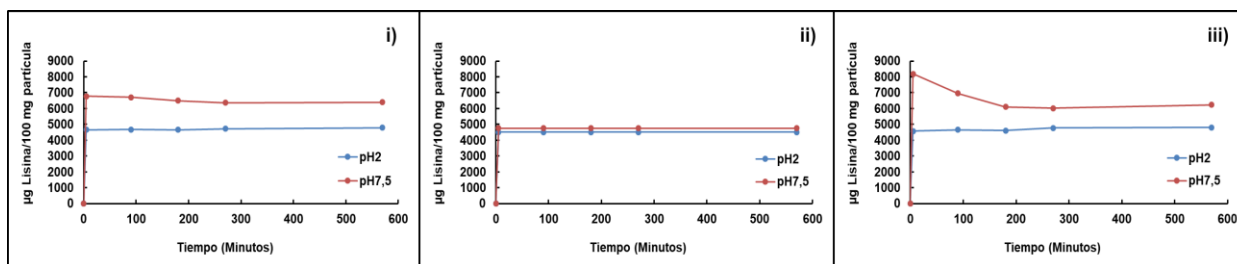


Figura 17: Valores de cantidad de Lisina (Lys) a pH 2 y pH 7,5; en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) funcionalizadas con Isocianato, con la puerta molecular Quitosano anclada; a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 min).

3.5.3. Puerta molecular Lisozima

La **Figura 18 a.** muestra la cantidad de aminoácido liberado en función del pH del medio de liberación cuando la enzima lisozima se ha anclado covalentemente a través del grupo amino del APTES, en un medio acuoso de PBS pH a pH 7,5. Los resultados muestran como la funcionalización en el cargado de los aminoácidos proporciona una mayor diferenciación de la cantidad liberada de aminoácido en función del pH del medio. Mientras que en el sistema de liberación preparado a partir del material desnudo (0) no existen diferencias en cuanto a la liberación en función del pH del medio, sí que existen cuando se parte de los sólidos A y B. En estos casos, la liberación a pH 7,5 es mayor que a pH 2. Por lo tanto, la acción de puerta molecular, frente a estímulo pH, se ve favorecida por la funcionalización (ii, iii) de la partícula previa al cargado de aminoácido, en contraposición con el resultado arrojado por la partícula desnuda (i) (Xue et al., 2012). En estos casos, pese a que no se consigue una liberación cero a pH 2, la liberación a pH 7,5 es prácticamente el doble que a pH 2.

En la **Figura 18 b.** se observa como cuando la lisozima se pega en un medio solvente de alcohol se consiguen liberaciones similares en comparación con los sistemas descritos anteriormente.

Para finalizar, la **Figura 18 c.** muestra los perfiles de liberación de la lisina cuando se empleó lisozima como puerta molecular, esta vez unida electrostáticamente sobre la superficie del sólido. En este sistema, se puede observar que la liberación a pH 2 es menor que la liberación a pH 7,5 tanto cuando se parte de partícula desnuda (0), como cuando se parte de partícula funcionalizada con cantidades crecientes de APTES (A) y (B). En cualquier caso, la unión únicamente electrostática sólo se produce en el sólido 0 (Xue et al., 2012), ya que cuando se utiliza el sólido A y B, existen cantidades de APTES en la superficie que pueden causar algún tipo de unión covalente además de electrostática.

a)

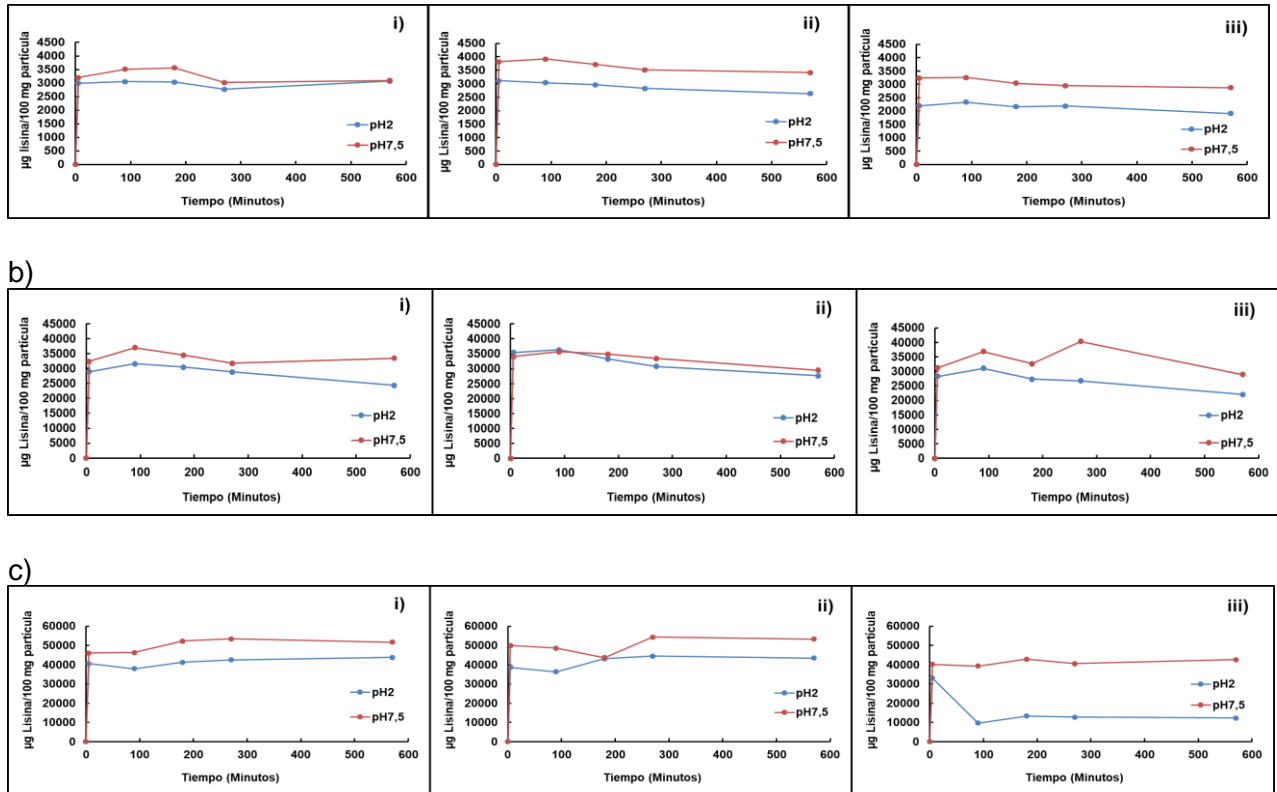


Figura 18: Valores de lisina liberada (Lys) a pH 2 y pH 7,5 desde las en partículas MCM-41 0 (i), A (ii) y B (iii) con la puerta molecular Lisozima anclada covalentemente a pH 7 (a), anclada covalentemente con etanol (b) y anclada electroestáticamente con etanol (c); a diferentes tiempos (5 minutos, 90 minutos, 180 minutos, 270 minutos y 570 minutos).

3.5.4. Puerta molecular ácido oleico

Cuando se realizó la cuantificación de la lisozima liberada a los diferentes tiempos por los sistemas de liberación controlada basados en la utilización de ácido oleico como puerta molecular, la concentración de lisina se halló por debajo del límite de detección en cada uno de los tres sólidos preparados. Esto puede deberse a que pese el sistema oleico es capaz de retener perfectamente compuestos como la rodamina (Poyatos-Racionero et al., 2017), no es capaz de retener otro tipo de moléculas como los aminoácidos, los cuales abandonarían el interior de los poros durante las etapas de lavado del sólido.

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han preparado 21 sistemas de encapsulación de lisina basados en el empleo de MCM-41 como soporte para la encapsulación. Como variables de estudio se han empleado el grado de funcionalización del material MCM-41 con APTES previo a al cargado de lisozima por impregnación, el tipo de puerta orgánica utilizada como puerta molecular (N1-(3-Trimetoxisililpropil) dietilentriamina, quitosano, lisozima y ácido oleico), y condiciones de síntesis específicas en función del tipo de molécula orgánica (tipo de grupo funcional para el anclado, o tipo de pegado (covalente o electrostático). Los resultados de liberación de la lisina en condiciones de puerta cerrada (PBS ajustado a pH 2 o agua en ausencia de surfactante) y abierta (PBS ajustado a PH 7,5 o agua con presencia de surfactante) han permitido establecer que a un pH ácido se libera menor cantidad de Lisina que a un pH neutro para la mayoría de los sólidos con apertura dependiente del pH (amina, lisozima y quitosano). En la mayoría de los casos, además, cuando se parte de soporte MCM-41 sin funcionalizar, se alcanza menor diferencia en la cinética de liberación que cuando se utilizan soportes funcionalizados con aminas. Este hecho pone de manifiesto la importancia de funcionalizar con aminas para transformar la carga superficial de los sólidos antes de la impregnación con el aminoácido. Sin embargo, pese a estas tendencias en el comportamiento, en ninguno de los casos se ha conseguido una liberación cero del aminoácido a pH 2, ni una liberación sostenida del aminoácido en el tiempo a pH 7,5. Por tanto, habrá que seguir probando nuevas condiciones de síntesis para que los poros queden completamente estancos a la salida del aminoácido hasta que se den las condiciones de apertura de la puerta molecular. Por su parte, la utilización del ácido como oleico como puerta molecular no consiguió cerrar herméticamente el sistema, y todo el aminoácido cargado salió probablemente durante la etapa de lavado, por lo que no se detectó aminoácido en ninguna de las alícuotas del estudio de liberación. Posibles soluciones que resuelvan este problema podrían ser sustituir la funcionalización con APTES por otro tipo de molécula orgánica que tenga una menor afinidad por el aminoácido, permitiendo de esta forma que se libere mucha más cantidad; o probar con otras moléculas orgánicas que actúen como puerta molecular frente a otros estímulos (ejemplo, cadenas de almidón que actúan como puerta molecular frente a la presencia de enzimas).

5. REFERENCIAS

- Ahmadi Nasab, N., Hassani Kumleh, H., Beygzadeh, M., Teimourian, S., & Kazemzad, M. (2018). Delivery of curcumin by a pH-responsive chitosan mesoporous silica nanoparticle for cancer treatment. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(1), 75-81.
- Argyo, C., Weiss, V., Brauchle, C., & Bein, T. (2014) Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery, *Chemistry of Materials*, 26(1), 435-451.
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., ... & Higgins, J. B. (1992). A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834-10843.
- Bernardos, A., Aznar, E., Coll, C., Martínez-Mañez, R., Barat, J. M., Marcos, M. D., ... & Soto, J. (2008). Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings. *Journal of Controlled Release*, 131(3), 181-189.
- Bernardos, A., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., Sancenon, F., Soto, J., ... & Amorós, P. (2009). Enzyme-responsive controlled release using mesoporous

- silica supports capped with lactose. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(32), 5884-5887.
- Bischoff, R., y Schlüter, H. (2012). Aminoácidos: química, funcionalidad y modificaciones postraduccionales no enzimáticas seleccionadas. *Journal of proteomics*, 75 (8), 2275-2296.
- Casasús, R., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Ros-Lis, J. V., Soto, J., Villaescusa, L. A., ... & Latorre, J. (2004). Toward the development of ionically controlled nanoscopic molecular gates. *Journal of the American Chemical Society*, 126(28), 8612-8613.
- Charnay, C., Bégu, S., Tourné-Péteilh, C., Nicole, L., Lerner, D. A., & Devoisselle, J. M. (2004). Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(3), 533-540.
- Colilla, M., González, B., and Vallet-Regí, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices. *Biomaterials Science*, 1(2), 114–134.
- Cordero, A. P., Sierra, J. R., Ruiz, J. R., Alvarez, I. A., & Alvarez, Y. A. (2014). Antibacterial activity of chitosan acid solutions obtained from shrimp exoskeleton. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 104-110.
- de la Torre, C., Agostini, A., Mondragón, L., Orzáez, M., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., ... & Pérez-Payá, E. (2014). Temperature-controlled release by changes in the secondary structure of peptides anchored onto mesoporous silica supports. *Chemical Communications*, 50(24), 3184-3186.
- Dols, M. C., López, M. D., Plaza, C. R., Miranda, E. P., Calle, S. G., Chamorro, E. V., ... & Calderón, V. G. (2006). Specific alterations in the serum amino acid profile of patients with lung cancer and head and neck cancer. *Oncología*, 29(7), 283-290.
- Fathi, M., Martin, A., and McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 39(1), 18–39.
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.
- FitzGerald, R.J, y Meisel, H. (2003). Hidrolizados de proteína de leche y péptidos bioactivos. *Advanced dairy chemistry-1 Proteins*, 675-698.
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.
- Hernández, R., Tseng, H. R., Wong, J. W., Stoddart, J. F., and Zink, J. I. (2004). An operational supramolecular nanovalve. *Journal of the American Chemical Society*, 126(11), 3370–3371.
- Hu, X., Wang, Y., & Peng, B. (2014). Chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocarriers for controlled drug release. *Chemistry—An Asian Journal*, 9(1), 319-327.
- Kubiak, K., & Mulheran, P. A. (2009). Molecular dynamics simulations of hen egg white lysozyme adsorption at a charged solid surface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(36), 12189-12200.
- Lee, C. H., Lin, T. S., & Mou, C. Y. (2009). Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano today*, 4(2), 165-179.
- Ma, Z., Bai, J., Wang, Y., & Jiang, X. (2014). Impact of shape and pore size of mesoporous silica nanoparticles on serum protein adsorption and RBCs hemolysis. *ACS applied materials & interfaces*, 6(4), 2431-2438.
- Mathews, B. T., Higginson, P. D., Lyons, R., Mitchell, J. C., Sach, N. W., Snowden, M. J., ... & Wright, A. G. (2004). Improving quantitative measurements for the evaporative light scattering detector. *Chromatographia*, 60(11-12), 625-633.
- McDonald, P. (2002). *Animal nutrition*. Pearson education.

- Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., Coll, C., Acosta, C., Bernardos, A., Amorós, P., & Barat, J. M. (2015a). Modulation of folic acid bioaccessibility by encapsulation in pH-responsive gated mesoporous silica particles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 202, 124-132.
- Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2016). Mesoporous Silica Particles as Encapsulation and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals. In *Nanotechnology in Nutraceuticals* (pp. 419-460). CRC Press.
- Posse, E., Viñals, A. L., de Arcuri, B. F., Farías, R. N., & Morero, R. D. (1990). Lysozyme induced fusion of negatively charged phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1024(2), 390-394.
- Poyatos-Racionero, Elisa; Pérez-Esteve, Édgar; Bernardos Bau, Andrea; Marcos Martínez, María Dolores; Barat Baviera, José Manuel; Martínez-Máñez, Ramón (2017). Mesoporous Silica Particles Functionalized With Oleic Acid For The Controlled Delivery In Small Intestine EN XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ 2017).
- Reuhs, B. L., & Rounds, M. A. (2010). High-performance liquid chromatography. In *Food analysis* (pp. 499-512). Springer, Boston, MA.
- Riikonen, J. (2012). Modification, characterization and applications of mesoporous siliconbased drug carriers. *Solid State: Processes and Analysis*, 45.
- Robinson, E.H., Wilson, R.P. and Poe, W.E. (1980) Re-evaluation of the lysine requirement and lysine utilization by fingerling channel catfish. *Journal of Nutrition* 110, 2313–2316.
- Ruiz-Rico, M., Daubenschütz, H., Pérez-Esteve, É., Marcos, M. D., Amorós, P., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2016). Protective effect of mesoporous silica particles on encapsulated folates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 105, 9-17.
- Salonen, J., Kaukonen, A. M., Hirvonen, J., and Lehto, V. P. (2008). Mesoporous silicon in drug delivery applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 632–653.
- Thies, C. (2003). Microcapsules.
- Veith, S. R., Hughes, E., and Pratsinis, S. E. (2004). Restricted diffusion and release of aroma molecules from sol-gel-made porous silica particles. *Journal of Controlled Release*, 99(2), 315–327.
- Wang, X., Ye, A., Lin, Q., Han, J., & Singh, H. (2018). Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *Journal of dairy science*, 101(8), 6842-6852.
- Wang, Y., Bamdad, F., Song, Y., and Chen, L. (2012). Hydrogel particles and other novel proteinbased methods for food ingredient and nutraceutical delivery systems. *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 412–450.
- Whitford, D. (2003) Proteins: structure and function. John Wiley & Sons.
- Xue, M., & Findenegg, G. H. (2012). Lysozyme as a pH-responsive valve for the controlled release of guest molecules from mesoporous silica. *Langmuir*, 28(50), 17578-17584.
- Xue, M., & Findenegg, G. H. (2012). Lysozyme as a pH-responsive valve for the controlled release of guest molecules from mesoporous silica. *Langmuir*, 28(50), 17578-17584.
- Zhao, P., Liu, H., Deng, H., Xiao, L., Qin, C., Du, Y., & Shi, X. (2014). A study of chitosan hydrogel with embedded mesoporous silica nanoparticles loaded by ibuprofen as a dual stimuli-responsive drug release system for surface coating of titanium implants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 657-663.
- Zhao, X. S. (2006). Novel porous materials for emerging applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 623–625.