

Resumen

La presente tesis doctoral, titulada “Microportadores inteligentes para la liberación controlada de sustancias de interés nutracéutico”, se centra en el diseño y evaluación de sistemas híbridos orgánico-inorgánicos para la protección y liberación controlada de compuestos bioactivos. Dichos sistemas están basados en (i) materiales de sílice, principalmente partículas mesoporosas, como soporte inorgánico para almacenar y proteger la carga bioactiva; y (ii) en una capa externa de biomoléculas que regulan la liberación de dicha carga ante determinados estímulos. En función de la naturaleza de las biomoléculas empleadas como funcionalización externa, esta tesis doctoral se divide en tres capítulos.

El primer capítulo trata sobre el empleo del *ácido oleico* como *puerta molecular* capaz de regular el confinamiento y salida de compuestos encapsulados mediante un estímulo (en este caso, surfactantes como las sales biliares). Este capítulo se subdivide a su vez en tres artículos diferentes, en los cuales se persiguen objetivos distintos para la misma puerta molecular.

En el primer artículo se ha desarrollado una nueva puerta molecular basada en ácido oleico capaz de retener las sustancias en el interior de los poros y liberarla sólo en el intestino. El sistema consta de un soporte inorgánico SBA-15, cargado con la molécula modelo rodamina B, funcionalizado con grupos amina y tapado con ácido oleico mediante interacciones electrostáticas. El material preparado es capaz de proteger la carga en las condiciones presentes en la boca y en el estómago, e inducir la liberación de la misma cuando el sistema llega al intestino. Además, se ratificó la acción surfactante de las sales biliares como el estímulo que desencadena la liberación de la carga, siendo los cambios de pH o la acción de otras enzimas (como la pancreatina, la pronasa o la esterasa) estímulos inocuos para la puerta. Finalmente, se ha sintetizado un microdispositivo con este diseño donde se ha encapsulado y liberado controladamente un nutracéutico (vitamina B2), demostrando así la posibilidad del sistema diseñado para la

protección y liberación controlada de moléculas bioactivas en el intestino delgado.

El segundo artículo estudia la efectividad de esta puerta molecular en diferentes tipos de partículas mesoporosas de sílice, con diversos tamaños y estructuras de poro (MCM-41, MCM-48, SBA-15 y UVM-7). En todos los sistemas estudiados, la puerta molecular es capaz de mantener protegidas las moléculas albergadas dentro de la estructura porosa, y liberarlas ante la presencia de un estímulo surfactante. Los perfiles de liberación obtenidos se han ajustado a diferentes modelos cinéticos, demostrando que el perfil de liberación depende de la estructura del material inorgánico. Finalmente, se seleccionó el sólido basado en la estructura de UVM-7 para realizar pruebas *in vivo* con ratas Wistar, observándose un retraso en la absorción intestinal de la rodamina al administrarla empleando el sistema diseñado. Este retraso confirma la necesidad de la acción surfactante de las sales biliares para abrir el sistema, y liberar la carga encapsulada en el duodeno. El diseño de este microdispositivo permite que la absorción intestinal se produzca de forma controlada tras el vaciado gástrico, por lo que este sistema podría emplearse como alternativa a las formas de administración de fármacos empleadas hasta ahora.

Por último, el tercer artículo incluido en este capítulo, ha estudiado la posibilidad de incorporar puertas moleculares a filosilicatos. Hasta el momento, estos materiales sólo habían sido empleados para liberar la carga albergada de una forma pasiva, pero no se habían protegido con puertas moleculares que permitiesen la liberación activa de las moléculas encapsuladas tras la acción de un estímulo específico. En este trabajo, se ha conseguido la protección y liberación controlada tanto de moléculas modelo (rodamina) como de biomoléculas de gran tamaño implicadas en el metabolismo humano (vitamina B12 y hematina) empleando filosilicatos equipados con la puerta molecular de ácido oleico. Este trabajo demuestra la posibilidad de funcionalizar filosilicatos con puertas moleculares que protejan grandes moléculas en ambientes acuosos, y las liberen en las condiciones presentes en el intestino, permitiendo aumentar la

bioaccesibilidad intestinal de grandes moléculas, complicadas de encapsular en otros sistemas por su restricción de tamaño.

El segundo capítulo describe nuevos sistemas en los que por primera vez se emplea la proteína *zein* (prolamina de maíz) como puerta molecular. Esta biomolécula, a pesar de su amplio uso en el ámbito alimentario, no ha sido nunca empleada para el desarrollo de sistemas de liberación controlada basados en puertas moleculares. Se ha preparado una colección de partículas mesoporosas de sílice cargadas con diferentes componentes de aceites esenciales (EOCs, por sus siglas en inglés) y recubiertas con *zein*. En los sistemas preparados, la presencia de la prolamina de maíz inhibe la salida de los EOCs encapsulados (timol, carvacrol y cinamaldehído) de manera que estos solo se liberan en presencia de las enzimas proteolíticas excretadas durante el crecimiento bacteriano, capaces de degradar la proteína que bloquea los poros. De todos los materiales desarrollados, el sistema cargado con cinamaldehído ha demostrado una capacidad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* mucho más eficaz que el compuesto libre, tanto en los estudios de susceptibilidad bacteriana, como mediante microscopía de fluorescencia. Esta mejora de la capacidad antimicrobiana se debe al descenso en la volatilidad del compuesto gracias a su encapsulación, y al incremento en la concentración efectiva de cinamaldehído promovida por la liberación local desencadenada por las enzimas proteolíticas. Este nuevo sistema combina moléculas de grado alimenticio con un soporte biocompatible, por lo que podrían ser considerados como una alternativa para el desarrollo de nuevas formulaciones de conservantes en el ámbito de la industria alimentaria.

Finalmente, el tercer capítulo de esta tesis estudia la efectividad de la *lactosa* como puerta molecular capaz de retener aceites esenciales y liberarlos sólo en las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal. Se han preparado tres materiales diferentes basados en MCM-41, cargados con timol, eugenol y cinamaldehído y funcionalizados con lactosa para inhibir la salida de los EOCs. Así, sólo la acción enzimática de la lactasa secretada por las microvellosidades

intestinales es capaz de hidrolizar la puerta molecular en los correspondientes monosacáridos, eliminando el impedimento estérico que mantiene confinada la carga encapsulada, y permitiendo así su liberación a lo largo del lumen intestinal. Los microdispositivos diseñados han sido probados tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de estudiar sus propiedades como fármacos anticancerígenos. En primer lugar, se ha demostrado la conservación de la estructura del sistema híbrido a lo largo del tracto gastrointestinal mediante un ensayo de digestión *in vitro* acompañado de microscopía confocal. Mediante ensayos *in vitro* con células Caco-2 se ha observado la internalización de las partículas por las células, y el aumento de la capacidad citotóxica del cinamaldehído gracias a su encapsulación, que promueve una reducción de su volatilidad y el aumento de su bioactividad. También se ha observado que la encapsulación de los EOCs en los microdispositivos protegidos con lactosa disminuye su permeabilidad a través de un modelo *in vitro* de membrana intestinal, aumentando así el tiempo de permanencia del compuesto en el lumen y su liberación progresiva con la acción de la lactasa secretada. Este aumento del tiempo de contacto puede estar relacionado con el aumento de la reacción proinflamatoria de los EOCs encapsulados en comparación con la de los compuestos libres, especialmente en el caso del cinamaldehído. El microdispositivo cargado con cinamaldehído también se ha probado en un modelo *in vivo* (rata Wistar). En este modelo se ha ratificado la disminución de la permeabilidad del cinamaldehído observada *in vitro*, ya que el compuesto pasa al plasma sanguíneo de una forma más lenta al precisarse la acción de la lactosa para liberarlo, y una mayor permanencia del EOC en el lumen gastrointestinal. Por tanto, los estudios realizados apoyan que el diseño planteado que emplea la lactosa como puerta molecular podría ser una alternativa para la administración de tratamientos que contengan moléculas volátiles y que tengan que ejercer su acción a lo largo del intestino (delgado y grueso), permitiendo una entrega más sostenida y una mayor biodisponibilidad con respecto a los modos de administración actuales.

Con todo esto, la presente tesis doctoral ha demostrado la posibilidad de configurar puertas moleculares sobre una amplia variedad de materiales híbridos de sílice, empleando biomoléculas sencillas de grado alimentario. Estos nuevos sistemas han permitido encapsular diferentes compuestos nutracéuticos, tanto volátiles como de tamaño considerable, para su protección y liberación controlada, mejorando su acción y biodisponibilidad. De este modo, se ha dado un paso más en el uso de la nanotecnología para potenciar las propiedades de biomoléculas naturales con fines farmacológicos.