



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS BASADOS EN  
SÍLICE MESOPOROSA CON PROPIEDADES  
ANTIMICROBIANAS.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Esteve Gómez, Diego

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Cotutor/a externo: BERNARDOS BAU, ANDREA

Director/a Experimental: MORELLA AUCEJO, ANGELA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

**Título del TFG:** Desarrollo de nuevos sistemas basados en sílice mesoporosa con propiedades antimicrobianas

**Resumen:** Aunque la nanomedicina es un campo que se encuentra en estadio temprano de desarrollo, se espera que su impacto sea revolucionario en el campo de la medicina. Uno de los prometedores campos de la nanomedicina puede ser el desarrollo de nanovehículos para el transporte y la liberación de fármacos que, al mismo tiempo, actúan protegiendo el cargo.

Una de las aplicaciones que se beneficiaría notoriamente del uso de la nanomedicina podría ser el tratamiento de quemaduras. Estas heridas han sido tradicionalmente tratadas con compuestos de plata como disoluciones de nitrato de plata o cremas de sulfadiazina de plata. Sin embargo, los tratamientos se han de reponer con cierta frecuencia para prevenir infecciones y estas reposiciones suelen conllevar muchas molestias para los pacientes. En este escenario es necesario el desarrollo de nuevos métodos para la administración de estos fármacos los cuales deben de ser capaces de mantener una concentración adecuada de plata en la herida.

El objetivo de este trabajo era la creación de materiales mesoporosos de sílice funcionalizados con aminas (AMS-6) para potenciar su actividad antimicrobiana e incrementar su capacidad de encapsular fármacos como son la plata y la sulfadiazina de plata generando dos nuevos sistemas antimicrobianos.

Finalmente, los materiales fueron evaluados como agentes antimicrobianos contra la bacteria patogénica *Staphylococcus aureus*. Se observó que a concentraciones de 1,0 mg/mL y de 4,5 mg/mL se encontraban las concentraciones mínimas inhibitorias de la plata y la sulfadiazina cargada en AMS-6 respectivamente.

**Palabras clave:** antimicrobianos de origen natural, funcionalización, encapsulación, aminas, liberación controlada, materiales particulados, materiales mesoporosos de sílice.

**Autor del TFG:** D. Diego Esteve Gómez

**Localidad y fecha:** Valencia, 4 de julio de 2022

**Tutor académico:** Prof. D. José Ramón Murguía Ibáñez

**Cotutor externo:** Prof. Dña. Andrea Bernardos Bau

**Directora experimental:** Dña. Ángela Morellá Aucejo

**Licencia:** Creative Commons

**Abstract:** Although nanomedicine is a field which is at an early development stage, it is expected nanomedicine to have a revolutionary impact on medicine. One of the exciting directions of nanomedicine can be the development of nanocarriers for the external release of drugs, at the same time that the cargo is protected by the carrier.

A medical area which may benefit from nanomedicine could be burn wounds treatment. These kinds of wounds have been traditionally treated with silver compounds like solutions of silver nitrate or creams of silver sulfadiazine. However, the treatments has to be frequently replaced to avoid infections. In addition, these substitutions are usually traumatic for the patient. In this scenario, new treatment methods for carrying these drugs are needed which must be able to keep a proper concentration of silver on the wound.

The objective of this work was the creation of amine functionalized silica mesoporous materials (AMS-6) to increase both its antimicrobial activity and its ability to charge drugs as silver and silver sulfadiazine creating two new antimicrobial systems.

Finally, the materials were evaluated as antimicrobial agents against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*. It was observed that a concentration of 1 mg/mL was the minimum inhibitory concentration for nanoparticles loaded with silver meanwhile the minimum inhibitory concentration for particles charged with silver sulfadiazine was of 4,5 mg/mL.

**Keywords:** natural antimicrobials, functionalization, encapsulation, amines, controlled release, particulate materials, mesoporous silica materials.

## Agradecimientos

Quería aprovechar este espacio para agradecer a todos aquellos que me han ayudado en la realización de este trabajo.

Al doctor José Ramón Murguía Ibáñez por su ayuda en la obtención de mi TFG, así como por presentarme a un grupo de trabajo de tan alto nivel.

A la doctora María Dolores Marcos Martínez, al doctor Luis Ángel Villaescusa Alonso y a la doctora Andrea Bernardos, por aceptar mi solicitud de becario y por su apoyo durante la realización de este trabajo; además, me gustaría agradecer especialmente a Andrea su disponibilidad y proximidad en la supervisión y revisión de este trabajo.

A mis compañeros de la CPI, por ser grandes profesionales y ayudar a crear un clima de trabajo excelente y haberme acogido con tanta amabilidad. A Miguel, por tomar la responsabilidad de ayudarme con la parte microbiológica de este trabajo. A Serena, por ayudarme con la interpretación de los diferentes espectros y difractogramas. Y a Angy, por todo el apoyo que he recibido de ella que ha sido fundamental para poder sacar este trabajo adelante. En general; gracias a los tres por hacer de mi estancia, aparte de productiva para mi desarrollo como persona e investigador, extremadamente agradable y, además, también divertida.

A toda mi familia por ser mi apoyo incondicional durante toda la carrera y el desarrollo de este trabajo. A mis abuelos, por enseñarme a valorar el esfuerzo y el trabajo propio. A mis padres, por ser los hombros donde me apoyo para ver más allá. Todo el esfuerzo que han puesto en mi es impagable así que espero que este trabajo este a la altura. A mi hermana por soportar al pesado de su hermano durante todo este camino. Y, finalmente, a Klaudia por su apoyo incontestable durante todo este trabajo y su ayuda a no perder de vista el objetivo.

¡Muchas gracias a todos!

## Índice

<b>1.-INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1.- Quemaduras.....	1
1.2.- Tratamientos actuales basados en plata.....	1
1.2.1- Gold estándar de la práctica clínica .....	1
1.2.2.- Nuevos tratamientos .....	2
1.3.- Nanomedicina y sólidos mesoporosos.....	4
1.4.- Toxicidad de las nanopartículas de sílice.....	5
1.5.- Síntesis de sólidos mesoporosos .....	6
1.5.1.- Características de la AMS-6 .....	6
1.5.2.- Síntesis AMS-6 .....	7
1.6.- Carga de las partículas.....	8
<b>2.- OBJETIVOS</b>	9
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	9
3.1.- Reactivos y Equipamiento empleado.....	9
3.1.1.- Reactivos.....	9
3.1.2.- Equipamiento.....	9
3.1.3.- Cepas y Cultivos bacterianos .....	10
3.2.- Técnicas generales .....	10
3.2.1.- Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible.....	10
3.2.2.- Difracción de rayos X en polvo .....	10
3.2.3.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear .....	11
3.2.4.- Microscopia electrónica de transición .....	12
3.2.5.- Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo .....	12
3.2.6.- Potencial zeta.....	12
3.2.7.- Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno.....	13
<b>4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	13
4.1.- Síntesis del sólido mesoporoso AMS-6. ....	13
4.1.1.-Síntesis Surfactante.....	13
4.1.2.- Síntesis del Material Poroso (AMS-6) .....	13
4.1.3.- Extracción del surfactante.....	14
4.2.- Caracterización AMS-6 .....	14

4.2.1.- Caracterización de AMS-6 mediante difracción de rayos X en polvo. ....	14
4.2.2.- Caracterización de AMS-6 por Potencial Z.....	15
4.2.3.- Caracterización de materiales mediante RMN. ....	15
4.2.4.- Caracterización de AMS-6 mediante adsorción-desorción de nitrógeno. ...	15
4.2.5.- Caracterización AMS-6 mediante TEM y FESEM.....	15
4.3.- Carga AMS-6.....	15
4.4.- Calibrado de densidad óptica respecto a concentración bacteriana .....	16
4.5.- Ensayo de actividad de la sulfadiazina de plata y la plata cargada .....	18
4.5.1-Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria .....	18
4.5.2- Ensayo de viabilidad.....	19
4.5.3.- Ensayo de Concentración Mínima Bactericida.....	20
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
5.1.- Caracterización físico-química .....	20
5.1.1.- Caracterización C <sub>12</sub> -Ala .....	20
5.1.2.- Caracterización sólido AMS-6 .....	22
5.1.2.1.- <i>Potencial zeta</i> .....	22
5.1.2.2.- <i>Difracción de rayos X en polvo</i> .....	23
5.1.2.3- <i>FESEM y TEM</i> .....	26
5.1.2.4- <i>Resonancia magnética nuclear</i> .....	27
5.1.2.5- <i>Adsorción-desorción de nitrógeno</i> .....	29
5.2.- Resultados ensayos microbiológicos .....	30
5.2.1.- Recta de calibrado.....	30
5.2.2.- Ensayos antimicrobianos.....	31
5.2.2.1.- <i>Ensayo antimicrobiano en plantónico</i> .....	31
5.2.2.2.- <i>Ensayo concentración mínima inhibitoria</i> .....	32
5.2.2.3.- <i>Ensayo de concentración mínima bactericida</i> .....	33
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>36</b>

## Listado de Abreviaturas

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina

Ag: plata

Ag<sup>+</sup>: plata ionizada, catión de plata (+1)

AgSD: sulfadiacina de plata

AgNO<sub>3</sub>: nitrato de plata

AMS: Sílices mesoporosas con surfactante-plantilla aniónico o “anionic surfactant templated mesoporous silicas”

C<sub>12</sub>-Ala: N-lauroyl-l-alanina

APTES: 3-aminopropiltrióxido de silano

TEOS: Tetraortosilicato

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

pXRD: difracción de rayos X en polvo.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión

FESEM: Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo

ZP: Potencial Zeta

BET: Brunauer-Emmett-Teller

BJH: Barret-Joyner-Halenda

DLS: Dispersión de luz dinámica

<sup>1</sup>H-RMN : RMN de protón

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

MHB: Müller-Hinton Broth

AMS-6(Ag): plata encapsulada

AMS-6(AgSD): sulfadiazina de plata encapsulada.

MBC: concentración mínima bactericida

MHA: Müller-Hinton Agar

TEABr: Tetraetilamonio de Bromo

CFU: unidades formadoras de colonias

# 1.-INTRODUCCIÓN.

## 1.1.- Quemaduras

Según la Organización Mundial de la Salud u OMS, las quemaduras son lesiones de la piel u otros tejidos que son causadas principalmente por radiación, radioactividad, electricidad, fricción o contacto con productos químicos. Actualmente, se estima que alrededor de 180.000 personas mueren al año a causa de este tipo de lesiones. La mayoría de defunciones por quemaduras ocurren en países en vías de desarrollo, y sobre todo en regiones de Asia y África (Burns, s. f.).

No obstante, el pronóstico más probable tras sufrir una quemadura es sobrevivir, independientemente de que la quemadura sea muy severa o del rango de edad del paciente. Sin embargo, sigue habiendo defunciones a causa de las quemaduras (Williams et al., 2009). Entre estas defunciones, la causa líder de la mortalidad siguen siendo las infecciones bacterianas, siendo las responsables de alrededor del 50% de las muertes (Norbury et al., 2016).

El 50% de estas infecciones son producidas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), una bacteria Gram-positivas. Ya de por sí, los *Staphylococcus* producen enzimas como las proteasas o colagenasas que les permiten romper la integridad de los tejidos e invadirlos, causando infecciones. Como ejemplo de infecciones por bacterias Gram-negativas; se encuentran las *Pseudomonas*, que son el género más asociado a sufrir una posible sepsis. También es posible encontrar en este tipo de heridas Enterobacterias como *Escherichia coli* que, aunque son más sensibles a los antibióticos, en los últimos años se ha visto un aumento de la presencia de cepas resistentes (Norbury et al., 2016).

Estos datos señalan la necesidad de mejorar los tratamientos actuales para poder hacer frente a las infecciones bacterianas en pacientes que hayan sufrido quemaduras graves. Este tipo de infecciones son debidas, principalmente, a que los pacientes han perdido o tienen dañada la primera capa de protección frente a patógenos, la epidermis, por lo que se suelen aplicar tratamientos para reforzar esa primera capa como cremas o membranas que cubran la herida.

## 1.2.- Tratamientos actuales basados en plata

### 1.2.1- Gold estándar de la práctica clínica

El término “gold standard” es empleado en medicina normalmente para referirse al test diagnóstico (imagen, test de sangre, biopsias...) que es considerado como el mejor ensayo para diagnosticar una determinada condición. Sin embargo, de forma más amplia, también puede hacer referencia al mejor tratamiento (Bell, s. f.). En este trabajo el término “gold estándar” hará referencia exclusivamente al mejor tratamiento actual.

Como se ha señalado, debido a la lesión de la epidermis, muchos de los tratamientos actuales frente a quemaduras se basan en cremas o disoluciones de aplicación tópica que poseen productos antimicrobianos para atacar una posible población bacteriana que se encuentre ya en la herida. Además, se suele cubrir la lesión del paciente para prevenir la colonización de bacterias del medio externo (*Topical agents and dressings for local burn wound care - UpToDate*, s. f.). Hay que tener en cuenta que el tejido lesionado va a presentar tejido vascular muy dañado, por lo que los antibióticos sistémicos (orales o intravenosos) no serán efectivos y por ello se opta por el empleo de tratamientos superficiales o tópicos (Selçuk et al., 2012).

Históricamente, uno de los tratamientos más comunes para este tipo de heridas ha consistido en la aplicación de disoluciones de plata (Ag) (Nherera et al., 2017). Pero no fue hasta 1960 cuando se popularizaron en el tratamiento de quemaduras. En concreto se usaba una disolución al 0,5 % de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>). Esta disolución se mostró efectiva frente a muchas cepas bacterianas, como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (Bessey, 2007).

La Ag, además de ser un compuesto antimicrobiano de amplio espectro, es efectiva contra los microorganismos con multirresistencias como los MRSA. Por tanto, la Ag se encuentra englobada en el mundo de la profilaxis antimicrobiana, pero para poder tener un efecto antimicrobiano la Ag elemental requiere estar ionizada ( $Ag^+$ ). Esta necesidad de carga limita su utilización ya que la  $Ag^+$  esta accesible para unirse a diversas proteínas o a cloruros de la herida que la inactivarán, esto lleva a que sea necesario reponer hasta 12 veces al día el tratamiento, con el consecuente trauma que se le ocasiona al paciente. El reto de estos tratamientos es conseguir mantener una concentración de  $Ag^+$  que sea lo suficientemente alta para tener una actividad residual durante el tiempo necesario para prevenir resistencias. Se considera que la concentración de  $Ag^+$  en cualquier preparación ha de ser mayor de 30 o 40 mg/L para ser efectiva (Murphy & Evans, 2012).

Para lidiar con estas limitaciones se han ido desarrollando diferentes compuestos que liberan  $Ag^+$  de una manera más sostenida o con diferente carga, para poder conseguir una concentración adecuada de  $Ag^+$  activa prolongada en el tiempo. Uno de los primeros compuestos que salió al mercado fue la sulfadiazina de plata (AgSD) (Atiyeh et al., 2007).

La AgSD es el agente profiláctico más usado en el tratamiento de quemaduras, el “gold estándar”. Está formado por un antibiótico (sulfadiazina) unido a  $Ag^+$ . Se suele usar en cremas de una concentración entorno al 1%. La AgSD se sintetiza a través de  $AgNO_3$  y sulfadiazina de sodio. Su rango de acción es muy amplio y puede ser utilizada tanto contra bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) como Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*), así como también presenta actividad antifúngica contra hongos como *Candida albicans* (Bessey, 2007).

La AgSD ejerce su papel deteniendo el crecimiento microbiano, impidiendo que la infección pase a los tejidos circundantes o a la sangre (sepsis) (*Silver Sulfadiazine*, s. f.). Sin embargo, el mecanismo de acción de la AgSD no está muy reportado. La AgSD está compuesta por una sulfadiazina y por tanto se esperaría ver una inhibición de la síntesis de ácido fólico, que es necesario para la replicación del DNA, como en el resto de fármacos sulfo. No obstante, esta inhibición no es apreciable. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana se debe, en principio, a los iones de  $Ag^+$  exclusivamente. Una de las hipótesis es que el fármaco produce su acción bactericida al aumentar la permeabilidad de membrana, unirse al DNA (lo que dificulta su replicación), también puede modificar los lípidos de membrana y/o formar radicales libres; aunque todos estos mecanismos son considerados hipotéticos (Oaks & Cindass, 2022).

### 1.2.2.- Nuevos tratamientos

Además de las disoluciones de  $AgNO_3$  o las cremas de AgSD, hay muchas más alternativas de tratamientos con Ag, como, por ejemplo: vendajes de hidrocoloides de plata que liberan  $Ag^+$  cuando el exudado es absorbido (Contreet-H<sup>R</sup>), vendajes de hidrofibras (Aquacel-Ag<sup>R</sup>), vendajes con Ag unida a carbón activo (Actisorb Silver 220<sup>R</sup>) o, vendajes con plata nanocristalina que consigue una liberación prolongada de  $Ag^+$  en el herida (Acticoat<sup>R</sup>) (Aziz et al., 2012).

Entre los nuevos vendajes con Ag, Acticoat<sup>R</sup> ha destacado por encima del resto, al tener un efecto antimicrobiano mayor y menores efectos adversos. Los vendajes con Ag nanocristalina como Acticoat<sup>R</sup> fueron desarrollados para sobrepasar algunas de las desventajas de los tratamientos tradicionales con Ag, al conseguir una liberación prolongada de  $Ag^+$ . De esta forma se consigue que la  $Ag^+$  reaccione de forma más lenta con los cloruros y por tanto permanezca más tiempo activa en la herida y se requiera menos cambios de vendajes. Esto contrasta frente a los tratamientos tradicionales con  $Ag^+$  y AgSD que requieren reponer el tratamiento hasta 12 o 2 veces al día, respectivamente, ya que pierden su actividad rápidamente (Khundkar et al., 2010). Otra ventaja de este tipo de vendajes es que permite una mejor monitorización de la herida y se desprenden cuando la herida ha sanado. También permiten un mejor drenaje del exudado y evitan que se forme una superficie fangosa en la herida (Munteanu et al., 2016).

Pero, además de la desventaja del tiempo limitado de actividad, estos tratamientos con plata también se han asociado con algunos efectos secundarios:

En el caso de las disoluciones de  $\text{AgNO}_3$  al 0,5%; se puede perder una gran cantidad de electrolitos en el área tratada, lo que puede provocar hiponatremia, un trastorno hidroeléctrico caracterizado por bajos niveles séricos de sodio (Spasovski et al., 2017), o hipokalemia, otro trastorno hidroeléctrico pero esta vez caracterizado por bajos niveles séricos de potasio (Kardalas et al., 2018). Estos trastornos ocurren especialmente en niños con quemaduras graves y se deben a la hipotonicidad de la solución. Otro efecto negativo que, aunque infrecuente, puede ocurrir, es una metahemoglobinemia. Una metahemoglobinemia es un trastorno sanguíneo donde se produce una cantidad anormal de metahemoglobina, un tipo de hemoglobina que libera menos oxígeno. Esta ocurre cuando el  $\text{AgNO}_3$  es reducido a nitrito por las bacterias y es seguidamente absorbido sistémicamente (Bessey, 2007).

Para la AgSD, aunque es una sulfanamida, es raro encontrar los efectos adversos típicamente asociados a estos fármacos como las cristalurias, presencia de cristales en la orina (*Cristaluria / ClinicallyInfo*, s. f.), o las metahemoglobinemias. Sin embargo, menos del 5% de los pacientes sufren de una erupción cutánea (rash). Un efecto más severo sería la aparición de una anemia hemolítica aguda que se asocia a pacientes con falta del enzima glucosa-6-fosfatasa. No obstante; el signo más frecuente asociado es una leucopenia, una bajada de los niveles en sangre de leucocitos (*Low White Blood Cell Count*, s. f.), aunque pasajera, que ocurre a los pocos días de empezar la terapia con una incidencia de 5-15%. Aunque los pacientes suelen reponerse sin necesidad de tratamiento (Bessey, 2007). Respecto a los nuevos vendajes con plata, como Acticoat<sup>®</sup> también presentan algunas desventajas como la aparición de argiria, condición dermatológica que se adquiere por la exposición o ingesta de plata y se presenta como una coloración grisácea o azulada de las mucosas. (Jerger & Parekh, 2022). Además, se ha llegado a reportar incidentes de toxicidad hepática, renal y cerebral; aunque en casos aislados (Khundkar et al., 2010). Otra desventaja de Acticoat<sup>®</sup> es su elevado precio (Munteanu et al., 2016) en comparación con otros tratamientos con plata como el de la AgSD, cuyo coste de producción es muy bajo (Oaks & Cindass, 2022). También requieren que la persona encargada de aplicar el vendaje esté capacitado para ello y saber cómo mantener activo el vendaje, así como en qué áreas se ha de aplicar (Munteanu et al., 2016).

Otra desventaja en general de los tratamientos con Ag, es que esta ha presentado toxicidad frente a queratinocitos y fibroblastos, lo que podría llevar a una mala curación de la lesión. No obstante, en situaciones más complejas (como podría ser una herida por quemadura) no se ha apreciado esta toxicidad. Esto puede deberse a la mayor presencia de proteínas, entre otros compuestos, en el ambiente que ayudan a desactivar los cationes de plata. No obstante, diversos estudios señalan que es un factor a tener en cuenta a la hora de escoger que tratamiento aplicar, por ejemplo; en caso de utilizar un cultivo de queratinocitos como autoinjerto.

Respecto a la actividad antimicrobiana, los diferentes compuestos de plata que son empleados como tratamiento, presentan diferentes actividades. De los tratamientos tradicionales ( $\text{AgNO}_3$  y la AgSD) son las disoluciones de plata las que presentan mayor actividad (Murphy & Evans, 2012). Respecto a los nuevos tratamientos (como el caso de Acticoat<sup>®</sup>) por lo general se ha visto que son más efectivos que los tradicionales a base de  $\text{AgNO}_3$  y AgSD. No obstante, en general, la bibliografía existente sobre la eficacia de estos tratamientos son estudios preliminares y los resultados son ambiguos entre las diferentes fuentes (Rashaan et al., 2014).

En conclusión, los vendajes que liberan  $\text{Ag}^+$  de un modo sostenido y prolongado en el tiempo tienen una mayor efectividad en el tratamiento y permiten reposiciones menos frecuentes, lo que mejora el bienestar del paciente. Sin embargo, esto es algo en lo que falla el gold estándar actual. Por esto mismo, surge la necesidad de crear nuevos tratamientos en los que se pueda

obtener una liberación sostenida y progresiva de  $Ag^+$ . Para ello, en este trabajo fin de grado, se empleará un soporte sólido que actuará como contenedor de los compuestos bioactivos AgSD o  $Ag^+$ , debido a que se consideran el tratamiento estándar en clínica en caso de quemaduras. Se aplicará la técnica de encapsulación para estos fármacos en materiales mesoporosos de sílice que sean capaces de retener de manera efectiva los fármacos en base plata y poder implementar su uso como agentes antimicrobianos en vendajes, haciendo así uso de la nanomedicina.

### 1.3.- Nanomedicina y sólidos mesoporosos

Aunque la nanomedicina se encuentre todavía en un estadio temprano, se espera que en un futuro cercano esta tenga un impacto revolucionario en el campo de la medicina (Ventola, 2012). Una de las ramas más prometedoras de la nanomedicina puede ser el desarrollo de nanopartículas para la liberación externa de fármacos, de forma tal que al mismo tiempo que son transportados serán protegidos por el propio vehículo (G. Chen et al., 2016).

Estas nanopartículas se clasificaron según el tamaño de sus poros, como se ve en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Clasificación de estructuras porosas según su tamaño de poro. IUPAC (Rouquerol et al., 1994)

Material	Tamaño del poro (nm)
Microporosos	$\leq 2$
Mesoporosos	2–50
Macroporosos	$>50$

Una de las primeras desventajas que se encontró en estos nuevos sistemas liberadores de fármacos era que liberaban demasiado rápido los agentes terapéuticos, de forma tal que su concentración aumentaba y disminuía muy rápido en la sangre. Esto llevó a que se desarrollaran vehículos que consiguieran mantener una concentración adecuada por un mayor tiempo. Para ello se comenzaron a utilizar nanopartículas y micropartículas porosas en las que se puede modular el tamaño y volumen de los poros y, por tanto, obtener diferentes perfiles de liberación.

Este tipo de partículas recibieron el nombre de sólidos mesoporosos. Estos sólidos poseen otra ventaja; una gran área superficial interna y externa, lo que les permite albergar una gran cantidad de carga. Además, la liberación de dicha carga se puede prolongar, en función del tamaño de poro, hasta varios días (Strømme et al., 2009). Otra de las características de los sólidos mesoporosos es que se pueden obtener partículas con diferentes estructuras (tetragonal, cúbica o laminar) (Atluri et al., 2008).

Estas propiedades pueden ser muy interesantes por las limitaciones de los tratamientos de plata. Por ejemplo, se podrían emplear para proteger a la plata de interaccionar con cloruros y proteínas de las heridas, por lo que cabría esperar que se consiguiera mantener la plata activa por un tiempo más prolongado. Así mismo, debido a la posibilidad de conseguir una liberación sostenida se reduciría la frecuencia de reposición del tratamiento, pues se podría mantener una concentración adecuada por más tiempo. Esto también podría ayudar a conseguir que se cumplieran las dosis de la terapia prescrita, al suministrar la dosis requerida en unas pocas aplicaciones de las nanopartículas. Otra ventaja que podrían presentar las nanopartículas, es que como se conseguiría disminuir los picos de concentración sérica de la plata, por lo que es probable que la toxicidad del nuevo tratamiento se menor respecto a los tratamientos tradicionales (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010).

Por tanto, un campo donde la nanomedicina puede tener un gran impacto podría ser en el tratamiento de quemaduras con nanopartículas que encapsulen plata; pues, en teoría, subsanaría las limitaciones de los tratamientos actuales.

#### 1.4.- Toxicidad de las nanopartículas de sílice

No obstante, para la aplicación que se les quiere otorgar a estas nanopartículas, primero es necesario comprobar si existe en la bibliografía estudios que justifiquen su inocuidad y, por tanto, su posible empleabilidad en tratamientos humanos.

Las nanopartículas pueden ser definidas como óxidos de metal o composiciones metálicas que poseen una escala en el rango nanométrico. Las nanopartículas de uso más común son las de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), de plata (Ag), dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de Zinc ( $\text{ZnO}$ ) y óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). De entre todos estos tipos de partículas son las de dióxido de silicio las que están surgiendo como una nueva clase prometedora para la nanomedicina, ya que poseen características que las hacen adecuadas para ser usadas en tratamientos y diagnósticos. Por ejemplo, una buena estabilidad y una excelente biocompatibilidad (Yun et al., 2015).

Los efectos tóxicos de la exposición a la sílice han sido ampliamente descritos. Un ejemplo serían las exposiciones laborales a la sílice que, al ser absorbido por las vías respiratorias, puede producir silicosis; una enfermedad fibrótica pulmonar. Además, este tipo de exposición, también se relaciona con otras enfermedades pulmonares tales como cáncer de pulmón o la tuberculosis. Respecto a la exposición a las nanopartículas de sílice, esta se ha relacionado con toxicidad sobre las células inmunes y diversos tejidos. Algunos ejemplos de esta toxicidad podrían ser: cambios en el comportamiento y capacidades de células como los monocitos, macrófagos, mastocitos o células dentríticas, así como también son apreciables daños en hígado, pulmón, o alteraciones en la proliferación de células T y B en el páncreas (L. Chen et al., 2018).

Sin embargo, cabe destacar la existencia de estudios que arrojan resultados favorables respecto al uso de nanopartículas de sílice en clínica. Por ejemplo, se ha visto que presentan una toxicidad mínima tanto en animales como en cultivos de células HeLa (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010).

En otro estudio, en este caso “*in vivo*” sobre ratones, a estos se les suministró oralmente 1g de nanopartículas por Kg de animal diariamente durante 13 semanas. Concluido el experimento, no se apreció ningún signo de toxicidad sistémica en ninguno ratón estudiado. Tampoco se apreció ningún efecto adverso en otro experimento que realizaron, esta vez de toxicidad aguda, en el que suministraron oralmente 2g de partículas por Kg de ratón diariamente por 14 días (Yun et al., 2015).

Sin embargo, cabe destacar que, en otro estudio, donde se administraron diversas concentraciones de sólidos mesoporosos de sílice (25, 50, 100 y 200 mg/Kg) en forma de inyección intraperitoneal a ratones, si se apreciaron afecciones en corazón y pulmones. Estas afecciones se relacionaron con el aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Este efecto de las partículas de sílice sobre el aumento de especies reactivas si se encuentra descrito en varios trabajos (Hozayen et al., 2019).

A pesar de todo lo comentado sobre la toxicidad de las partículas de sílice, hay que tener en cuenta que la vía de administración se encuentra muy relacionada con la potencial toxicidad. Debido a que en este trabajo se plantea su posible aplicación tópica, es necesario valorar la toxicidad de las partículas a través de esta ruta. En la bibliografía revisada se describe un proceso experimental en el que se aplicó diariamente un tratamiento dérmico de partículas de sílice sobre la espalda de ratas por 90 días y no se encontró ningún órgano dañado ni ningún tipo de signo de toxicidad. Las dosis empleadas fueron de 2000 mg/Kg de animal (Ryu et al., 2014).

En conclusión, aun cuando hay varios trabajos que señalan la posible toxicidad de las nanopartículas de sílice, la visión general es que estas partículas podrían ser adecuadas para su aplicación clínica (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010), debido a las grandes ventajas que presentan en la administración de fármacos. Además, hay que tener en cuenta que la toxicidad de estas partículas depende de ciertas variables, como el tamaño de las partículas, el tiempo de

exposición, la funcionalización y el modo de administración (Hozayen et al., 2019; Ryu et al., 2014). Por tanto, por el potencial de estas nanopartículas de mejorar los resultados en clínica y por ser considerada la ruta de administración dérmica relativamente segura, se optó por utilizar estas nanopartículas para la mejora de los tratamientos de plata y la consiguiente realización de este trabajo.

### 1.5.- Síntesis de sólidos mesoporosos

La síntesis de los sólidos mesoporosos requiere el empleo de moléculas de tensioactivos en una disolución acuosa donde formaran agregados conocidos como micelas. La forma, así como el tamaño, de estas micelas depende fundamentalmente de la naturaleza y composición química del tensioactivo, de su concentración y de la temperatura de la reacción, aunque otros factores como el pH de la disolución y la concentración total salina también influyen en la agregación micelar. Además, esas micelas se pueden agrupar formando estructuras supramicelares, la naturaleza de las mismas dependerá de la temperatura y la concentración de tensioactivo. En general; a temperaturas moderadas, conforme aumenta la concentración de tensioactivo, las micelas cilíndricas se agrupan primeramente en una fase hexagonal, que evolucionará a una cúbica (isotrópica) y posteriormente a una estructura laminar (Bernardos Bau, 2011).

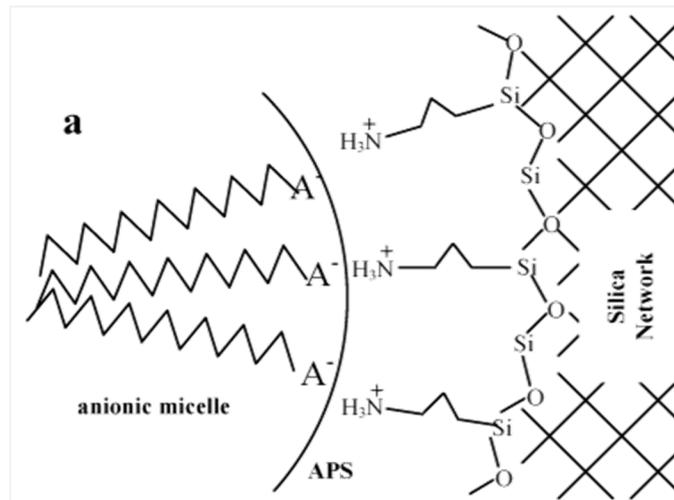
Durante la síntesis de los materiales mesoporosos de sílice, los oligómeros de silicato que se encuentran presentes en la disolución acuosa condensarán alrededor de las micelas que actúan como una plantilla. Finalmente, debido al ensamblaje de las especies de sílice y las micelas, se obtiene un producto sólido que contiene una elevada cantidad de tensioactivo ocluido en su interior. Para la eliminación de este tensioactivo atrapado se pueden emplear disolventes o utilizar una calcinación en aire a temperatura elevada (Bernardos Bau, 2011). La versatilidad de esta ruta de síntesis se puede observar en las numerosas estructuras que pueden formarse fácilmente, incluyendo materiales con mucha superficie, con 2 o 3 dimensiones y con un amplio rango de tamaños de poro. Además, se obtiene una intrincada y estructurada red de poros siendo la razón de la gran superficie de estos materiales (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010).

#### 1.5.1.- Características de la AMS-6

Para este proyecto se ha seleccionado unas nanopartículas de sílice denominadas AMS-6, las cuales poseen una estructura cubica con grupo espacial Ia3d (Atluri et al., 2008).

La familia de materiales mesoporoso AMS (por sus siglas en inglés: anionic surfactant templated mesoporous silicas) es relativamente reciente, pero ha atraído mucho la atención por su amplio número de estructuras bien definidas. Las nanopartículas AMS se caracterizan por el empleo de surfactantes aniónicos en su síntesis. En el caso de la AMS-6, el surfactante empleado es el N-lauroyl-l-alanina (C<sub>12</sub>-Ala) (Atluri et al., 2008) que es una amida de ácidos grasos.

En esta familia de materiales el mecanismo de síntesis está controlado por la interacción electrostática entre el grupo carboxílico del surfactante que se encuentra cargado negativamente (por ejemplo, el surfactante C<sub>12</sub>-Ala) y un grupo amino de un organoalcoxilano, 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES), empleado como agente co-estructurante en el proceso de síntesis. Además, la condensación ocurre preferentemente en el alcoxilano unido a su vez a un precursor inorgánico de sílice, el Tetraetilortosilicato (TEOS), lo que lleva a la formación de la malla de sílice (Garcia-Bennett et al., 2004), como podemos observar en la figura 1.1.



**Figura 1.1.** Representación esquemática de las especies involucradas en la síntesis de los materiales AMS-n mediante TEOS y APTES (Garcia-Bennett et al., 2004). APS, hace referencia al APTES mientras A<sup>-</sup> hace referencia a un grupo funcional con carga negativa.

### 1.5.2.- Síntesis AMS-6

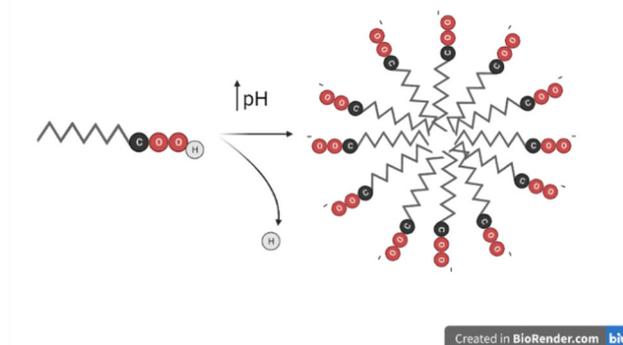
Para la síntesis de estas nanopartículas se empleó: C<sub>12</sub>-Ala, APTES y TEOS.

La C<sub>12</sub>-Ala puede ser usada como soporte para la favorecer la gelificación de mezclas de solventes hidrocarbonados lo que permite la formación de sistemas liberadores de fármacos (*N-Lauroyl-L-alanine* =99.0 TLC 52558-74-4, s. f.). Entra dentro de la categoría de surfactantes aniónicos y fue el elegido como porógeno para la síntesis de las nanopartículas, AMS-6.

APTES actúa como agente co-estructurante de la fuente de sílice e interacciona fuertemente con la cabeza aniónica del surfactante, al mismo tiempo que se une covalentemente a la pared inorgánica de sílice (Atluri et al., 2008).

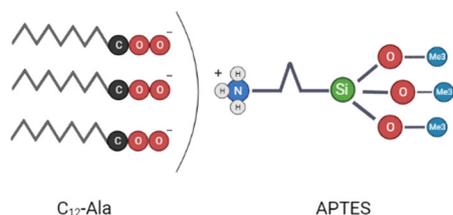
El TEOS es el tetraetil ortosilicato que en la síntesis de nanopartículas su aportación consiste en ser el precursor inorgánico de la polimerización, además de aportar la fuente de sílice para formar la matriz de las nanopartículas (Bernardos Bau, 2011).

Para la síntesis de las partículas primero se prepara una suspensión del surfactante en un medio alcalino. Esto permite que el grupo carboxílico de la C<sub>12</sub>-Ala se desprotona y adquiere una carga negativa (formación del carboxilato) al mismo tiempo que forma una micela aniónica, debido a su característica de molécula anfipática, como podemos observar en la figura 1.2.



**Figura 1.2.** Proceso de formación de una micela aniónica al perder la C<sub>12</sub>-Ala un protón de su grupo carboxilo al aumentar el pH (Atluri et al., 2008).

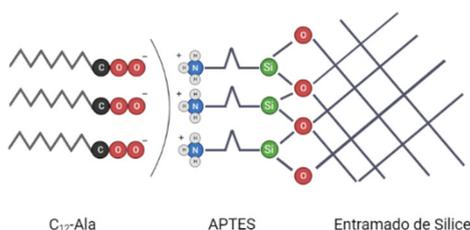
Una vez formada la micela aniónica se añadirá el agente co-estructurante (APTES) que, como se puede ver en la figura 1.3, interaccionan sobre las micelas de forma electrostática al poseer un grupo cargado positivamente frente al carboxilo desprotonado.



Created in BioRender.com bio

**Figura 1.3.** Interacción entre el grupo carboxilo de la C<sub>12</sub>-Ala y la amina del APTES (Atluri et al., 2008).

Por último, condensaran los precursores de sílice (TEOS) sobre el APTES formando el entramado de sílice que originará la nanopartícula, como se puede apreciar en la figura 1.4.



Created in BioRender.com bio

**Figura 1.4.** Estructura AMS-6 previa extracción del surfactante, formada por la condensación entre el APTES interaccionando con la micela y las partículas de TEOS (Atluri et al., 2008).

En este método de síntesis, la co-condensación permite que, tras el proceso de síntesis y extracción del porógeno, las aminas del agente coestructurante (APTES) queden en el interior de los poros. Así se obtiene una superficie interna del poro funcionalizada con restos de aminas terminales (Atluri et al., 2008). Esta particularidad es la que confiere a la AMS-6 la capacidad de interaccionar con los compuesto plata (Roldán et al., 2012), además de sus propiedades antimicrobianas intrínsecas (Ortega et al., 2008).

### 1.6.- Carga de las partículas

La premisa de un proceso de carga de un fármaco es que una porción se absorba en la partícula de sílice. Actualmente, existen diversas metodologías para conseguir cargar las nanopartículas (Trzeciak et al., 2021).

Uno ejemplo de un proceso de cargado son los métodos que emplean solvente. Este tipo de metodología abarca desde una simple mezcla de los componentes por agitación, hasta procesos como fundir el propio fármaco para después mezclarlo con las partículas e introducirlo por difusión. Las ventajas de estas técnicas son que se puede predecir fácilmente la concentración final de la formulación y que no quedan residuos del solvente en la muestra (Trzeciak et al., 2021).

Otra forma de introducir los fármacos en las nanopartículas consiste en utilizar disolventes. En este caso los fármacos entran por capilaridad hacia los poros de las partículas desde una suspensión. Sin embargo, una de las desventajas de este proceso es el posible residuo que puede persistir en las partículas. Esta forma de carga tiene diferentes variantes, una de ellas y la que

se empleará en este trabajo, es el método de adsorción por inmersión. Este método consiste en sumergir las nanopartículas en una suspensión acuosa con el fármaco en cuestión. Estos procesos puede llegar a durar hasta 48 horas y, una vez finalizado, se recogen las nanopartículas mediante un filtrado o centrifugación (Trzeciak et al., 2021)

## 2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en desarrollo, síntesis, estudio y aplicación de nuevos sistemas antimicrobianos basados en la funcionalización de compuestos en base plata mediante sólidos mesoporosos de sílice, para mejorar su acción en quemaduras.

Para ello el objetivo principal se desglosa en los siguientes objetivos secundarios:

- Síntesis de nanopartículas que contienen aminas en sus poros de cuatro formas distintas.
- Funcionalización de las partículas a través de la encapsular en ellas dos tratamientos tradicionales de quemaduras, plata y sulfadiazina de plata.
- Caracterización físico-química de las nanopartículas, cargadas y sin cargar y determinar cuál de las formas de síntesis es más adecuada.
- Estudio y validación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas cargadas y los tratamientos libres

## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- Reactivos y Equipamiento empleado

#### 3.1.1.- Reactivos

H<sub>2</sub>O miliQ, TEOS, APTES, MHA, MHB, Ringer concentración 1/4, L-alanina, hidróxido sódico, acetona, etanol, ácido clorhídrico, cloroformo, TEABr, hidróxido sódico deuterado, agua deuterada, AgNO<sub>3</sub>, AgSD, resazurina al 0,15%, cloruro de lauroilo 98%, hexano, ácido sulfúrico.

#### 3.1.2.- Equipamiento

pXRD, difractómetro empleado fue Bruker D8 Advance diffractometer

TEM, marca JOEL modelo JEM-1400 Flash

Porosimetría de N<sub>2</sub>, Micromeritics TriStar II Plus.

ZP, ZetaSizer ZS (Malvern)

Espectroscopía de UV, Jasco V-630, N° de serie: A141561148

RMN, Bruker ADVANCE III

Calcinación; Horno eléctrico, marca: gallur, volumen: 220, KWH: 4,5; temperatura máxima: 1300 °C, Capacidad: 12,5 L.

Termoshaker: Grant-bio, PCMT, Versión: V.6GW

Autoclave de teflón, vaso de precipitados, agitador magnético, placa agitadora, sensor de temperatura, matraz esférico de 50 mL, serpentín refrigerante, tubo flacón de 15 mL, eppendorfs de 2 mL, placas de 96 pocillos, filtro de 0,2 µm.

### 3.1.3.- Cepas y Cultivos bacterianos

Para los estudios antimicrobianos de los compuestos cargados y sin cargar se empleó como cultivo bacteriano la cepa de *S. aureus* ATCC 25923

## 3.2.- Técnicas generales

En este apartado se profundizará sobre los diferentes equipos empleados en este proyecto y que resultaron esenciales para la resolución del mismo. Para la valoración de la concentración de bacterias, se empleó la espectroscopia de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis). Mientras que para la caracterización de las partículas se emplearon, difracción de rayos X en polvo (pXRD), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Para obtener los valores electrocinéticos de las nanopartículas se utilizó el potencial Z (ZP) y en el estudio de los parámetros de los poros se realizó un estudio de las isothermas de absorción-desorción de nitrógeno.

### 3.2.1.- Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible

Los equipos de espectrofotometría de UV-Vis se basan en la absorción de la radiación UV-Vis (radiación comprendida entre 200 y 800 nm) por una molécula (*Espectrofotómetro Ultravioleta-visible (UV-vis)*, s. f.). De esta forma, el estudio de los fenómenos que produce la interacción entre la radiación electromagnética con la materia permite identificar y/o cuantificar el elemento o moléculas que forman las muestras objeto de análisis.

Para la cuantificación de la absorbancia de los cultivos de *S. aureus*, se cogía una alícuota de 200  $\mu$ L del cultivo a valorar que se disponían en una cubeta del equipo. Una vez introducido el cultivo en la cubeta, esta se colocaba dentro del espectrofotómetro UV-Vis y se medía la absorbancia en el espectro comprendido entre 500 y 700 nm. Una vez obtenida la lectura, se tomaba el valor de la absorbancia a 600 nm, ya que se corresponde a la absorbancia debida a las bacterias (*Matlock et al. - Analyzing Differences in Bacterial Optical Density.pdf.*).

### 3.2.2.- Difracción de rayos X en polvo

La pXRD es una técnica no destructiva que permite la identificación de las distintas fases cristalinas y la caracterización estructural y microestructural de sólidos. Debido a que las longitudes de onda de los Rayos X son del mismo orden que las distancias interatómicas de los cristales, estos actúan como una red de difracción y por tanto difractan los Rayos X en determinadas direcciones con intensidades características en función de su estructura cristalina. La microestructura del material marca el área en la que la estructura cristalina permanece inalterada. Son los defectos cristalinos y el tamaño de los granos lo que afecta al perfil de difracción, permitiendo su estudio (*Difracción de RX*, s. f.).

Por tanto, la técnica de pXRD sirve tanto para determinar estructuras cristalinas como para identificar sólidos cristalinos. Para el estudio de rayos X se requiere una fuente de radiación. Esta es el anticátodo de un tubo de rayos X. Los anticátodos más usuales son: Cobre, Hierro, Cromo... En el caso de este proyecto el anticátodo del equipo empleado para el estudio de las nanopartículas era de Cobre (*Difractograma de Rayos X-UPV*, s. f.). La radiación procedente del anticátodo con una longitud de onda determinada incidirá sobre la muestra en el espacio interplanar. Cada uno de los planos se encuentran definidos por los índices de Miller (h, k, l) que están separados entre sí por una distancia determinada de forma que el haz sale reflejado con un ángulo  $\Theta$ , respecto al plano cristalino. El detector se irá moviendo, variando el ángulo que forma con la muestra, registrando así el haz reflejado. El resultado de la intensidad obtenida según el ángulo proporcionará información sobre la estructura cristalina de la muestra (*Difractometría de Rayos X (Polvo)*, s. f.).

En este trabajo el análisis empleado fue el de ángulos bajos. Este tipo de análisis permite obtener valores del tamaño y distribución de partícula, distancia entre partículas, ordenación de las mismas, establecer fracciones volumétricas y grado de cristalinidad en materiales, el cálculo de la porosidad y dimensiones de nanopartículas (*Equipos*, s. f.).

La pXRD fue usada para confirmar que la estructura atómica de los materiales sintetizados era correcta, ya que como se ha comentado la AMS-6 tiene una estructura cúbica con un difractograma muy característico fácil de interpretar. Por tanto, a partir de la asignación de los índices de Miller a los espectros obtenidos y empleando la ley de Bragg (ecuación 3.1) y la ecuación de la celda unidad cúbica (ecuación 3.2) se pueden calcular los parámetros de las nanopartículas, de la celda unidad ( $a_0$ ) y distancia interplanar ( $d$ ), para valorar si ha habido algún cambio estructural.

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

**Ecuación 3.1.** Ley de Bragg (*Bragg's Law For Diffraction*, s. f.). La letra  $n$ , hace referencia a un número entero,  $\lambda$  hace referencia a la longitud de onda.

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = (h^2 + k^2 + l^2) \frac{1}{a_0^2}$$

**Ecuación 3.2.** Distancias interplanares para celdas de estructura cúbica. (*Cristalografía. Redes directa y recíproca*, s. f.)

### 3.2.3.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

El RMN permite resolver la estructura de compuestos orgánicos y organometálicos. También posibilita determinar la estequiometría del esqueleto carbonado y proporciona una información valiosa de núcleos magnéticamente activos. La RMN es una espectroscopia de absorción que se basa en la propiedad que poseen determinados núcleos de absorber energía cuando son sometidos a la acción de radiofrecuencias. Esta radiación provoca un tránsito entre niveles de energía resultantes de la interacción de un campo magnético externo con las distintas orientaciones del espín nuclear de forma que, cuando vuelvan a su posición inicial, emitirán una señal (*Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | Universidad de Burgos*, s. f.). La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de moléculas como de su entorno electrónico y sus interacciones. Por tanto, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro proporciona una valiosa información sobre la estructura del compuesto que la origina. Por ello, esta técnica es de las más eficientes y útiles para saber la estructura de una sustancia en disolución (*Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear*, s. f.). En el caso de este trabajo se empleará el RMN de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) y por tanto las diferentes señales que se estudiarán se corresponderán a los diferentes hidrógenos que posea la molécula.

Para el análisis de los espectros de RMN se utilizarán 3 características: los desdoblamientos, la intensidad (área) y los desplazamientos químicos. Respecto a los desdoblamientos hacen referencia a el número de picos que forman una única señal, un único tipo de hidrógeno. El número de picos de una señal varía en función de los hidrógenos adyacentes al hidrógeno que origina la señal, por lo que viene definido por la ecuación 3.3. Como con el número de picos se nos da una información importante sobre los alrededores de un determinado hidrógeno; podemos utilizar los desdoblamientos para identificar el origen de una determinada señal. Respecto a la intensidad de una señal, esta viene determinada proporcionalmente al número de protones que la producen. De esta forma, se puede saber cuántos hidrógenos forman una determinada señal. Por último, el entorno del núcleo magnético es muy importante para la señal que emitirá, ya que según este habrá un mayor o menor apantallamiento del campo magnético. Como el entorno de cada núcleo es distinto estos tendrán diferentes frecuencias de absorción y de emisión, lo que se refleja en el desplazamiento químico (unidades en ppm). Un núcleo apantallado es un núcleo rodeado por electrones, de esta forma si hay elementos más

electronegativos que “desplacen” la carga, el átomo estará más desapantallado. De esta forma, a mayor desapantallamiento de un núcleo a mayor frecuencia emitirá, mayor ppm. Por lo que, el desplazamiento químico de núcleo, da información sobre lo que lo rodea y permite identificarlo en una molécula (*Espectroscopia.pdf*, s. f.). Por tanto, juntando estas tres características es posible identificar o predecir la estructura de una molécula.

$$n^{\circ} \text{ de picos de la señal} = n^{\circ} \text{ de } H_1^1 \text{ adyacentes} + 1$$

**Ecuación 3.3.** Ecuación para conocer el número de hidrógenos adyacentes respecto a una señal determinada de un protón ( $H_1^1$ ).

Mediante la RMN se caracterizó la C<sub>12</sub>-Ala para comprobar que su estructura se correspondía con la esperada. Mediante esta técnica también se valoraron las nanopartículas sintetizadas, específicamente para poder hacer un recuento de la cantidad de aminas presentes.

#### 3.2.4.- Microscopia electrónica de transición

El TEM es un instrumento que se aprovecha de los fenómenos físico-atómicos producidos cuando un haz de electrones con aceleración suficiente colisiona con una muestra bien preparada. Cuando esto ocurre, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de los electrones son dispersados selectivamente; es decir, algunos electrones atraviesan la muestra directamente mientras que otros son desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen sobre una cámara CCD que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable por otros medios. Esta información obtenida se muestra en forma de imagen con diferentes tonalidades de gris según el grado de dispersión de los electrones incidentes. Esta imagen ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta amorfa o cristalina (*Microscopia electrónica de transmisión: Servicio de Microscopía Electrónica: UPV, s. f.*).

En este trabajo el TEM fue empleado para el análisis de la estructura mesoporosa, comprobando que la síntesis había resultado exitosa al ver el tamaño de poro y la organización de las partículas. También se comprobó si había alguna diferencia entre las diferentes partículas sintetizadas previa y posteriormente a ser cargadas.

#### 3.2.5.- Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

El FESEM es un instrumento capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con más resolución y con un rango de energía mucho mayor. El funcionamiento consiste en un barrido sobre la superficie de la muestra con un haz de electrones, mientras que en un monitor se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles. Como fuente de electrones se utiliza un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales. Esto ayuda a minimizar el efecto de carga en especímenes no conductores y a evitar daños en muestras sensibles al haz electrónico. Otra característica del FESEM es la utilización de detectores dentro de la lente, que se encuentran optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, lo que es fundamental para obtener el máximo rendimiento del equipo (*Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo: Servicio de Microscopía Electrónica: UPV, s. f.*).

Como en el caso del TEM, el FESEM fue utilizado para la caracterización de las partículas sintetizadas, estudiando su morfología y tamaños.

#### 3.2.6.- Potencial zeta

El ZP hace referencia al potencial electrocinético de los sistemas coloidales. Desde un punto de vista teórico el ZP es la diferencia de potencial eléctrico entre el medio (fase móvil) y las partículas en este (fase estacionaria). El valor del ZP se relaciona con la estabilidad de las

emulsiones, altos potenciales zeta (positivos o negativos) se asocian con mayor estabilidad eléctrica.

Sin embargo, en este trabajo se empleó para determinar si las diferentes rutas de extracción del surfactante fueron adecuadas y ver si las partículas AMS-6 estaban cargadas.

### 3.2.7.- Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno

La adsorción física de gases y vapores en sólidos es una de las técnicas más empleadas en el estudio de la porosidad de los sólidos. Para ello los parámetros que se han de determinar son el área superficial, así como el volumen y el diámetro de los poros.

Para la determinación de estos parámetros se puede usar la adsorción de un gas, que actúa como un adsorbato, a temperatura constante sobre el sólido de estudio, adsorbente. De esta forma se obtiene la isoterma de adsorción del sólido de interés. Para obtener dicha isoterma, en este trabajo se empleó el N<sub>2</sub> a 77K como adsorbato, ya que es el de uso más común y es útil para materiales mesoporosos. Esta isoterma puede obtenerse de varias maneras, gravimétricamente (se mide la ganancia de peso experimentada por la muestra por la adsorción a cada presión relativa de gas) y volumétricamente (la cantidad absorbida se calcula mediante la aplicación de las leyes de los gases a la presión y volumen del adsorbato antes y después de la adsorción) (*ANÁLISIS DE LA TEXTURA POROSA DE SÓLIDOS. Servicios Técnicos de Investigación, s. f.*).

Para la obtención del área superficial del poro (m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>), que hace referencia al desarrollo superficial del sólido por unidad de masa, se requiere emplear modelos matemáticos como el de Brunauer-Emmett-Teller (BET), que será empleado en este trabajo. En el caso del diámetro de los poros también será necesario el empleo de modelos matemáticos y, en este caso, se decidió usar el modelo Barret-Joyner-Halenda (BJH), que es el más empleado en sólidos mesoporosos. Sin embargo, para obtener el volumen (cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>) total de poros no es necesario ningún modelo matemático ya que es una medida directa que representa el volumen que ocupan los poros en una unidad másica de poro (*Adsorción física de gases, s. f.*).

## 4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.1.- Síntesis del sólido mesoporoso AMS-6.

#### 4.1.1.- Síntesis Surfactante

Para la síntesis del surfactante (C<sub>12</sub>-Ala), primeramente, se realizaron dos suspensiones. La primera suspensión (1), estaba compuesta por: 43,75 g de cloruro de lauroilo, 8 g de hidróxido sódico en 20 mL de agua.

La segunda suspensión (2), consistía de: 21,38 g de L-alanina y 19,2g de hidróxido sódico que se mezclaron en 140 mL de agua y 120 mL de acetona. Una vez preparadas, se vertió la suspensión (1) sobre la (2). Esta nueva suspensión (3), se mantuvo en agitación (400 rpm) durante 20 minutos a 30 °C. Tras esto la suspensión (3) se dejó atemperar durante una hora manteniendo la agitación constante, y se obtuvo una suspensión con pH superior a 12. Seguidamente, se acidificó la solución con ácido sulfúrico hasta obtener un pH igual 1. Completada la hora, el sólido precipitó y se filtró a vacío. El sólido se lavó 3 veces con hexano mientras se mantenía el filtrado a vacío y posteriormente se dejó secar a 37 °C. Una vez seco se recogió el surfactante.

#### 4.1.2.- Síntesis del Material Poroso (AMS-6)

Para la síntesis del material se suspendió 0,2 g de C<sub>12</sub>-Ala; previamente sintetizada, en 40 mL de agua dentro de un autoclave de teflón. Para conseguir una correcta disolución se ha de mantener el autoclave a 80 °C en estático durante 24 horas.

Tras las 24 horas se añadió en el autoclave a 80°C y en agitación (400 rpm) 0,2 g de APTES. Se dejó el autoclave en agitación y tras esperar 3 minutos se añadió gota a gota mediante una pipeta Pasteur 1,53 g de TEOS; el precursor de sílice. Tras añadir el TEOS se dejó el autoclave en la estufa a 80 °C durante 20 minutos en agitación. Durante el proceso se variaron el tiempo de agitación al añadir los TEOS y/o la intensidad de la misma durante los 20 minutos posteriores. Por tanto, se generaron 4 AMS-6 diferentes, según sus condiciones de síntesis, como se puede apreciar en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Diferentes procesos de síntesis seguidos durante el desarrollo de este trabajo

AMS-6 Síntesis 1	Se siguió el protocolo descrito
AMS-6 Síntesis 2	Tras añadir el APTES se agitó por un minuto a 400 rpm y se añadió el TEOS. Tras esto se puso brevemente en agitación y se dejó los 20 minutos siguientes en estático.
AMS-6 Síntesis 3	Al añadir el APTES se dejó en agitación a 200 rpm por 3 minutos, tras esto y tras añadir el TEOS se dejó en agitación a 200 rpm durante los 20 minutos siguientes.
AMS-6 Síntesis 4	Después de añadir el APTES se dejó el autoclave en agitación a 200 rpm por 3 minutos. Tras esto se añadieron los TEOS y se dejó el autoclave en estático por los siguientes 20 minutos.

Tras 20 minutos en la estufa, los autoclaves se sacaron para dejarlos en un periodo de envejecimiento durante 4 días. El sólido obtenido tras este periodo se sometió a un lavado mediante centrifugación. El lavado consistió en una precipitación por centrifugación (9500 rpm, 20 minutos) donde se retiraba el sobrenadante y tras esto el precipitado se resuspendía en agua y se repetía el proceso. Este proceso continuo hasta que el sobrenadante llegó a un pH igual a 7. Tras lo cual el sólido se deja secar a 80 °C durante tres días.

#### 4.1.3.- Extracción del surfactante

Tras la síntesis surfactante se queda dentro de los poros del material mesoporoso, lo que impide que se pueda cargar con la partícula de interés. Por esto mismo se procedió a su eliminación. Esta eliminación se realizó mediante disolventes ácidos o por calcinación.

En la extracción del surfactante con disolventes orgánicos en medio ácido, se añadieron 150 mg de sólido en un matraz esférico de 50 mL junto con 13,5 mL (0,23 mol) de etanol y 1,5 mL ( $4,896 \cdot 10^{-2}$  mol) de HCL 37%. Tras esto se dejó el matraz en agitación (400 rpm) durante 24 horas a 90 °C. Después de esto el sólido se centrifugó 20 minutos a 9500 rpm. Se dejó de lavar cuando el pH de las aguas de lavado fue neutro. Por último, se secó a 80 °C.

La extracción del surfactante por calcinación se realizó empleando navcillas de combustión sobre los que se depositó en cada uno 200 mg de muestra y se introdujeron en el horno de calcinación, mufla. Se dejaron durante 5 horas a 550 °C.

Debido a que este proceso puede desestabilizar la estructura, se realizaron estudios sobre las características del sólido a posteriori. Además, la calcinación elimina las aminas, en contraposición de la extracción en medio ácido. Esto fue validado en análisis posteriores.

## 4.2.- Caracterización AMS-6

### 4.2.1.- Caracterización de AMS-6 mediante difracción de rayos X en polvo.

Se realiza una preparación de la muestra a estudiar, se han de coger sobre unos 200 mg de la partícula y molturar. Tras esto, se ha de disponer la muestra sobre una bandeja de medición del

equipo, aplanándola sin dejar rugosidades y cubriendo el espacio designado, e introducirla en el mismo. Entonces, se seleccionó el programa de ángulos bajos con una duración de 11 min por ensayo. El procedimiento seguido para cada muestra fue el mismo.

#### 4.2.2.- Caracterización de AMS-6 por Potencial Z

Se prepararon para todas las muestras suspensiones de 1,5 mL y concentración igual a 1 mg/mL en eppendorfs de 2 mL. Se cogió un 1 mL de muestra mediante una jeringa y se dispuso en una cubeta específica del equipo. Posteriormente se procedió a realizar su medición.

#### 4.2.3.- Caracterización de materiales mediante RMN.

Según el material analizado la preparación de la muestra varió. En el caso del surfactante; C<sub>12</sub>-Ala, se introdujeron 10 mg dentro de un tubo de RMN que se disolvieron en 0,6 mL de cloroformo deuterado. Posteriormente, se agito el tubo para disolver el material.

Para las partículas sintetizadas, se cogieron 10 mg de la muestra, 5 mg de la molécula patrón tetraetilamonio de bromo (TEABr). Seguidamente se usó como disolvente 10 gotas de sosa deuterada y 10 gotas de agua deuterada. Se llevaron a un agitador donde se mantuvo la muestra hasta que se consiguió su disolución, tras lo cual rápidamente se realizó el estudio.

Tras la preparación de las muestras fueron llevadas debidamente etiquetadas al equipo de RMN.

#### 4.2.4.- Caracterización de AMS-6 mediante adsorción-desorción de nitrógeno.

Se introdujeron unos 100 mg de muestra en un vial de 5 mL que se llevaron al técnico del porosímetro.

#### 4.2.5.- Caracterización AMS-6 mediante TEM y FESEM.

Una vez sintetizadas las nanopartículas se procedió a estudiar la morfología y porosidad de las mismas. Este análisis morfológico se llevó a cabo mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), y microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).

La preparación de las muestras de TEM se realizó de la forma indicada a continuación. Para cada una de ellas se pesará 1 mg que será suspendido en 1 mL de agua. Después se añadió de 2 a 3 gotas con una pipeta pasteur en una rejilla de Ni recubierta por un film de carbono y se dejó reposar hasta evaporación. Una vez seca la muestra se llevó al equipo de microscopía para ser analizada, donde un técnico la introdujo al equipo.

En el caso del FESEM, en un portamuestras se añade una cinta de carbono adhesivo. Tras esto se retira la cinta protectora revelando una superficie rugosa donde se pondrá la muestra. Se requiere, tras añadir la muestra, eliminar aquella que no esté pegada a la cinta mediante un soplador. Tras esto un técnico introdujo la muestra al equipo.

### 4.3.- Carga AMS-6

Una vez sintetizada la AMS-6 y extraído del porógeno de sus poros, se procedió a realizar el cargado de las partículas por inmersión. La carga se realizó en las partículas extraídas en medio ácido ya que los sólidos conservan sus aminas. Se prepararon sendas suspensiones saturadas de AgSD y de AgNO<sub>3</sub>. Tras añadir el sólido, se dejarán ambas suspensiones en agitación (400 rpm) a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron las suspensiones para eliminar el disolvente, retirando el sobrenadante y dejando secar a vacío.

La AgSD es un compuesto muy insoluble en agua y etanol por lo que para su carga se decidió emplear amonio donde si es soluble (*NCATS Inxight Drugs — SILVER SULFADIAZINE*, s. f.). En este trabajo se empleó una disolución de amonio al 25% y agua a una proporción 7:1 en volumen. De esta mezcla se extrajeron 4mL donde se disolvió la AgSD. En estos 4 mL se añadieron 100 mg de AMS-6 y 0,4 milimolar de AgSD por gramo de sólido, que se corresponde con 14,58 mg de AgSD.

En el caso del  $\text{AgNO}_3$  la solubilidad en agua es muy alta (PubChem, s. f.) por lo que se disolvió directamente en 4 mL de agua miliQ. Esto se hizo para evitar problemas de precipitaciones de cloruro de plata por la interacción de la plata con las sales del agua (*Precipitation of Silver Chloride*, s. f.). En estos 4 mL se añadieron 100 mg de AMS-6 y 0,4 milimol de  $\text{AgNO}_3$  por gramo de sólido, que se corresponde con 6,79 mg de  $\text{AgNO}_3$ .

Ambos procedimientos quedan recogidos en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Condiciones de los procesos de cargas realizados

Componente	Disolvente	Volumen (mL)	AMS-6 (mg)	Carga (milimol /g sol)	Masa carga (mg)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
Sulfadiazina de Plata	disolución de agua y amonio (1:7)	4	100	0,4	14,58	24	Tª ambiente (25)	400
Nitrato de Plata	agua miliQ filtrada	4	100	0,4	6,79	24	Tª ambiente (25)	400

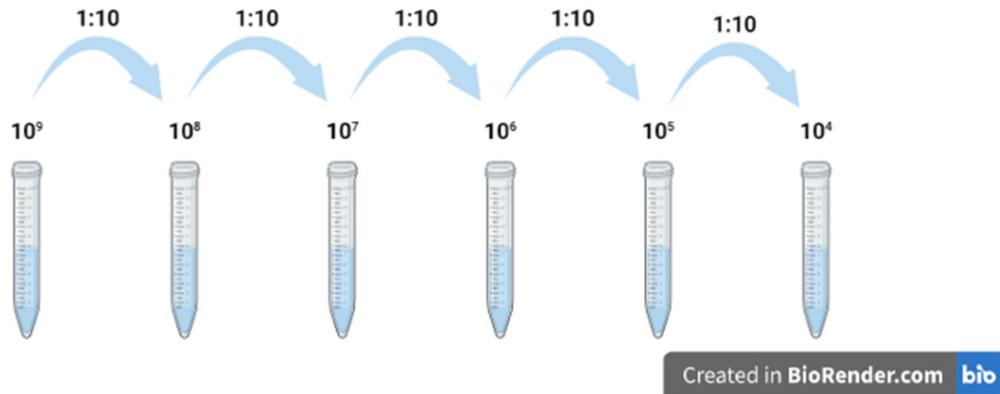
#### 4.4.- Calibrado de densidad óptica respecto a concentración bacteriana

Para conocer a la concentración a la que se encuentra el cultivo de *S. aureus* cuando se utilizó en un proceso experimental se creó una curva patrón. Esta curva patrón relaciona la concentración de un cultivo con la absorbancia del mismo en un espectrofotómetro UV-Vis. Por lo que midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro y sustituyéndola en la ecuación 5.3 se puede obtener la concentración aproximada de un cultivo. Lo que permitirá hacer las diluciones adecuadas para realizar los diferentes ensayos con la misma concentración inicial de bacterias aumentando la reproducibilidad de los mismos.

Para la obtención de la curva patrón se dejó crecer durante un día a 37 °C un cultivo de *S. aureus* en medio Müller-Hinton Broth (MHB), para que llegue a saturación que correspondería con una concentración de  $10^9$  cel/mL aproximadamente. El cultivo se realizó en un tubo falcón de 15 mL con 9 mL de medio de cultivo al que se añadió 1 mL de un cultivo previo.

Tras 24 horas, se realizaron diluciones seriadas desde el cultivo inicial hasta llegar de concentraciones de  $10^4$  cel/mL. Estas diluciones se hicieron de forma 1:10 en tubos de dilución que contenían 9 mL de MHB, como ejemplifica la figura 4.1.

Luego, de cada dilución obtenida ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ... cel/mL) se realizaron sus correspondientes diluciones para llegar a valores de  $10^3$  cel/mL, donde se podrá hacer el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) y, al aplicar el factor de dilución, obtener la concentración real de bacterias de cada dilución. Estas nuevas diluciones se realizaron esta vez en tubos eppendorf de 2 mL con 900  $\mu\text{L}$  de medio MHB y se volvieron a realizar diluciones seriadas 1:10 para llegar a la concentración deseada. Este procedimiento se recoge en la tabla 4.3.



**Figura 4.1.** Ejemplificación de las diluciones realizadas.

**Tabla 4.3.** Procedimiento seguido para obtener las diferentes concentraciones requeridas para el ensayo. En negrita queda resaltada la concentración a la que se llevó cada dilución para realizar el recuento ( $10^3$  UFC/mL).

	Dil 1:10					
Dil\Conc estimada (CFU/mL)	<b><math>10^9</math></b>	<b><math>10^8</math></b>	<b><math>10^7</math></b>	<b><math>10^6</math></b>	<b><math>10^5</math></b>	<b><math>10^4</math></b>
<b><math>10^{-1}</math></b>	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	<b><math>10^3</math></b>
<b><math>10^{-2}</math></b>	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	<b><math>10^3</math></b>	
<b><math>10^{-3}</math></b>	$10^6$	$10^5$	$10^4$	<b><math>10^3</math></b>		
<b><math>10^{-4}</math></b>	$10^5$	$10^4$	<b><math>10^3</math></b>			
<b><math>10^{-5}</math></b>	$10^4$	<b><math>10^3</math></b>				
<b><math>10^{-6}</math></b>	<b><math>10^3</math></b>					
<b><math>10^{-6}</math></b>	<b><math>10^3</math></b>					

Una vez se hicieron las diluciones en tubos eppendorfs, las concentraciones de  $10^3$  cel/mL se sembraron en placas Petri con Müller-Hinton Agar (MHA) mediante el método de Miles y Misra (Miles et al., 1938). Este método consiste en sembrar de cada muestra tres gotas de  $20 \mu\text{L}$  optimizando así el espacio de una placa de cultivo. Tras ser sembradas las placas se dejaron 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una estufa.

Al mismo tiempo, se tomó una alícuota de cada concentración sin diluir ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ... cel/mL) y se midió la absorbancia para cada una a  $600 \text{ nm}$ , poniendo  $200 \mu\text{L}$  en una cubeta del equipo de espectrofotometría. Esta absorbancia se relacionó con la concentración de bacterias o unidades formadoras de colonias (CFU/mL) obtenida tras el recuento de la correspondiente placa para cada concentración. Previamente a esto, se tuvo que medir la absorbancia del medio de cultivo sin microorganismos para poder obtener la línea base (baseline) o blanco. La medida de absorbancia se realizó en un rango de  $500$  a  $700 \text{ nm}$  de longitud de onda y se hizo la lectura absorbancia a  $600 \text{ nm}$ .

Pasadas 24 horas se procedió a realizar el recuento, el número obtenido de CFU a su vez se multiplicó por el factor de dilución para obtener los valores de concentración reales. En este caso, al haber hechos las diluciones en  $1 \text{ mL}$  y haber sembrado  $20 \mu\text{L}$ , el factor de dilución será de 50 ( $50 * 20 \mu\text{L} = 1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL}$ ). Estas concentraciones se pasaron a forma logarítmica obteniéndose una recta patrón con ecuación 5.3.

#### 4.5.- Ensayo de actividad de la sulfadiazina de plata y la plata cargada

Se valoró la actividad de los sólidos AMS-6 cargados con AgSD, AMS-6(AgSD), y con Ag<sup>+</sup>, AMS-6(Ag). En el estudio se utilizaron cultivos de *S. aureus* frente a diferentes concentraciones de sólidos cargados. Además, también se valorará la actividad de la AMS-6 sin cargar, ya que en su superficie presenta aminas que poseen cierta actividad bactericida.

Primero, se preparó un cultivo bacteriano en medio MHB en un tubo falcón de 15 mL. Se dejó en crecimiento overnight, para que llegará a una concentración aproximada de 10<sup>9</sup> cel/mL.

Se pesaron las partículas para posteriormente preparar las diluciones del ensayo: AMS-6, AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD). Para cada partícula se prepararon las mismas concentraciones. Mediante diluciones seriadas se llegaron a concentraciones de 5mg/mL hasta 0,00975 mg/mL.

Posteriormente, se extrajo una alícuota del cultivo bacteriano que se había dejado overnight. De esta alícuota se tomaron unos 200µL que se introdujeron en una cubeta del equipo de espectroscopia del laboratorio, con el que se obtuvo la absorbancia del cultivo. Con esta absorbancia se obtuvo la concentración del cultivo mediante la ecuación 5.3.

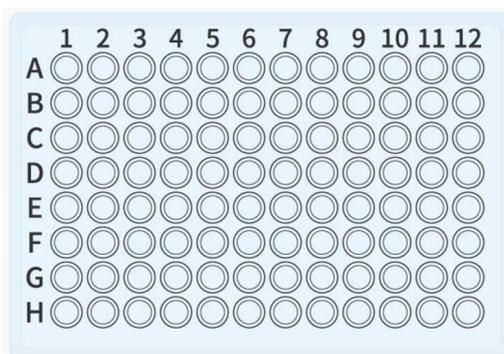
Una vez conocida la concentración del cultivo se procederá a hacer las pertinentes diluciones para acabar con una concentración cercana a 10<sup>5</sup> cel/mL. En el caso del ejemplo, se realizaron 4 diluciones, 3 diluciones seriadas 1:10 en falcón de 15 mL con 9 mL de medio Ringer. La última dilución se realizó al pasar el cultivo al ensayo, ya que se añadieron 100µL de cultivo 900 µL de medio Ringer con partículas, en eppendorfs de 2mL. Se dejaron los eppendorfs 24 horas en un termoshaker a una temperatura de 37 °C.

Al día siguiente, de cada concentración se realizaron tres diluciones y se sembraron las concentraciones en torno a 10<sup>5</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>2</sup> cel/mL, con el método de Miles y Misra. Se sembró en placas Petri con medio MHA tras ser divididas en tres áreas, cada una para una concentración. Una vez sembradas las placas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se procedió al recuento de las colonias.

##### 4.5.1-Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria

Para continuar con la valoración de la capacidad antimicrobiana de los compuestos de plata, cargados y sin cargar, se realizó un ensayo de su Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Para determinar la MIC se dejó crecer a 37 °C un cultivo de *S. aureus* en MHB durante 24 horas con el objetivo de que llegará a una concentración igual a 10<sup>9</sup> cel/mL. Esto se comprobó midiendo la absorbancia del cultivo en el espectrofotómetro del laboratorio, como ya se ha descrito, y, aplicando la lectura obtenida en la ecuación 5.3, se obtuvo así la concentración real del cultivo. Este valor se empleó para poder realizar las diluciones convenientes para conseguir realizar los diversos ensayos siempre a la misma concentración, 10<sup>5</sup> cel/mL. El método empleado en este ensayo fue el método de microdilución de cultivo (EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) of the EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY and INFECTIOUS DISEASES (ESCMID), 2003), en placas de 96 pocillos, como la que se puede ver representada en la figura 4.2.



**Figura 4.2.** Ilustración de una placa de 96 pocillos. («¿Qué Es Una Placa de 96 Pocillos?», s. f.)

Este método consiste en rellenar los pocillos exteriores de 200  $\mu$ L (columnas 1 y 12, filas A y H) con el medio para evitar la evaporación en los pocillos interiores, donde ocurre el experimento. Así estos pocillos cumplen una función protectora y de controles de posibles contaminaciones. Tras esto, se añaden las disoluciones de los fármacos a la concentración deseada en los 3 pocillos superiores (B, C y D) de la columna 11, que serán siempre los de mayor concentración, mientras que los tres pocillos inferiores (E, F, G) no recibieron fármaco y actuaron como controles +. Así también se comprueba que el disolvente empleado (en este trabajo MHB) no es tóxico para las bacterias, lo que afectaría a la obtención de la MIC. Por tanto, el ensayo se realizó por triplicado, con sus respectivos controles. Después de esto se añadió en el resto de pocillos 100  $\mu$ L (de las columnas 2 al 10) de medio MHB. Luego se procedió a realizar una serie de diluciones seriadas para conseguir una ristra de concentraciones donde buscar la MIC de cada compuesto.

Después de obtener la concentración del cultivo bacteriano, se prepararon las suspensiones de los diversos tratamientos a valorar: Ag, AgSD, AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD). Tras esto se depositaron en los pocillos de la fila número 11 la cantidad correspondiente de cada suspensión para tener en 200  $\mu$ L la concentración deseada. Después de este paso, se procedió a hacer las diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 2 y, al acabar las diluciones, se añadieron 100  $\mu$ L de bacterias para realizar el ensayo a una concentración bacteriana de  $10^5$  cel/mL, que sirvieron de inóculo. Las bacterias se añadieron de la columna 2 a la 11 y sin añadir en las filas A y H.

De esta forma en los pocillos de mayor concentración (11) se utilizaron concentraciones de 0,5 mg/mL para la Ag y la AgSD, mientras que en el caso de los tratamientos encapsulados la concentración fue mayor 2,5 y 5 mg/mL para la AMS-6(Ag) y la AMS-6(AgSD), respectivamente.

Una vez preparados los ensayos en las placas de 96 pocillos se dejaron overnight a 37 °C.

#### 4.5.2- Ensayo de viabilidad

Para valorar la MIC se procedió a realizar el ensayo de la resazurina. La resazurina es un indicador redox que puede entrar en las células y por tanto servir para indicar la viabilidad celular. La resazurina al disolverse adquiere un tono azul pero una vez que se añade a un cultivo, si este es viable y está activo metabólicamente, puede reducir la resazurina en resorufina que es un compuesto de color rosáceo. Esta reducción ocurre a través de la respiración aeróbica de las células activas dándose un intercambio de electrones entre el NADH (reductor) y la resazurina (oxidante). El periodo de incubación necesario para que se dé la reacción varía según diversos parámetros como, el tipo de célula, la densidad celular, el tipo de medio de cultivo; entre otros. Este tiempo puede estar comprendido entre 1-4 horas (Riss et al., 2004).

Primero se preparó una disolución de resazurina al 0,15% del peso en el volumen deseado de agua destilada. La disolución fue filtrada a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m en un recipiente vacío y esterilizado. Después, una vez el ensayo había crecido, se añadieron 30  $\mu$ L de resazurina por

pocillo. Una vez añadida la resazurina se dejaron las placas por 1 hora en una estufa a 37 °C. El cambio de color se comprobó visualmente.

#### 4.5.3.- Ensayo de Concentración Mínima Bactericida

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (MBC), una vez conocida la MIC de un ensayo, se tomaron 20 µL del pocillo posterior (bacterias activas) y del pocillo de la MIC más los dos siguientes (bacterias no activas) o los necesarios hasta no obtener crecimiento. Estos se cultivaron en una placa de MHA. Se cogió una muestra por pocillo de una determinada concentración, es decir 3 muestras por concentración. Las placas se dividieron en 4 sectores para sembrar en cada uno una determinada concentración. Se metieron en la estufa a 37 °C y se procedió a su valoración pasadas 24 horas.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Caracterización físico-química

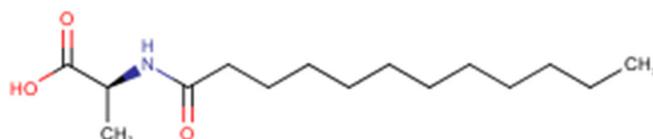
La caracterización fisicoquímica se llevó a cabo durante los diferentes pasos de la síntesis de las nanopartículas, AMS-6, así como estando cargadas o sin cargar.

En la síntesis del AMS-6 intervienen el surfactante ( $C_{12}$ -Ala), APTES y una unidad polimerizadora precursora de sílice (TEOS). Tras su síntesis se procedió a la extracción del surfactante y tras esta se ha de obtener un material mesoposo con una distribución de poro y diámetro uniforme, el cual puede variar entre 2-50 nm.

Para esta caracterización se siguieron los procedimientos estándar de la química de materiales. Por tanto, se ha empleado: la técnica de difracción de rayos X en polvo, microscopía electrónica de barrido de emisión de campo y microscopía electrónica de transmisión. También se ha empleado la resonancia magnética nuclear de protón. Además, se realizó un estudio de potencial zeta para la medida de la carga en la superficie de las partículas.

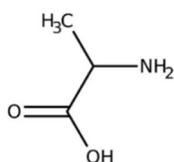
#### 5.1.1.- Caracterización $C_{12}$ -Ala

En primer lugar, se sintetizó el surfactante aniónico, N-lauroil-L-alanina ( $C_{12}$ -Ala), con el que se procedió a sintetizar el material poroso (AMS-6). Este compuesto tiene una naturaleza anfipática al tener una cabeza polar (hidrófila) y una cola apolar (hidrofóbica). La cabeza polar corresponde al aminoácido de la alanina, mientras la cola es una cadena hidrocarbonada de 12 carbonos, esto se ve representado en la figura 5.1.

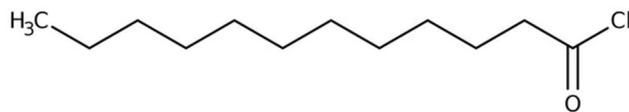


**Figura 5.1.** N-lauroil-L-alanina ( $C_{12}$ -Ala). (*N-Lauroyl-L-Alanine*, s. f.).

Para la síntesis de la  $C_{12}$ -Ala se utilizó L-alanina, figura 5.2, y cloruro de lauroilo, figura 5.3.



**Figura 5.2.** L alanina. (*L-alanina, 99 %, pura, Fisher Chemical | Fisher Scientific, s. f.*)



**Figura 5.3.** Cloruro de lauroilo. (*Cloruro de lauroilo, 98 %, Thermo Scientific | Fisher Scientific, s. f.*)

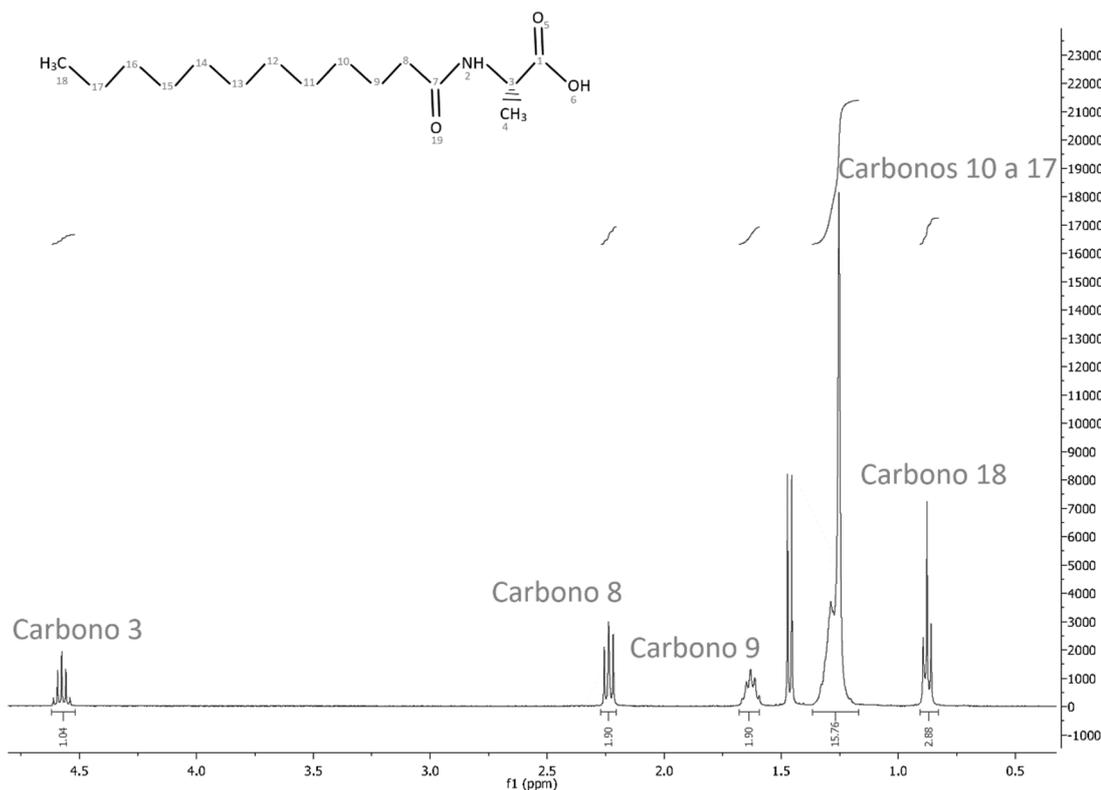
La L-alanina, como se ve en la figura 5.2, posee dos grupos funcionales de gran interés, un amino y un ácido carboxílico. El amino posee un par de electrones libres que le confieren un carácter nucleófilo (tiende a ceder electrones). En cambio; el cloruro de lauroilo, como se aprecia en la figura 5.3, contiene un grupo carbonilo unido a un átomo de cloro. Este cloro presenta una elevada electronegatividad, confiriendo al carbonilo un carácter electrófilo (atrae electrones).

De esta forma, la síntesis del surfactante C<sub>12</sub>-Ala, consiste en una sustitución nucleofílica de la L-alanina en la molécula de cloruro de lauroilo. Así; la amina, de la L-alanina, y el carbono, del carbonilo del cloruro de lauroilo, se unen covalentemente desplazando al cloruro del cloruro de lauroilo, formando la C<sub>12</sub>-Ala a través de la creación de un nuevo enlace amida. El pH del medio de reacción debe ser alcalino, en torno a 9, para evitar que se protonen las especies nucleófilas y se detenga la reacción, por ello se hace la reacción en presencia de hidróxido sódico.

Para la caracterización de la C<sub>12</sub>-Ala se empleó la espectroscopía de RMN de protón (<sup>1</sup>H-RMN) ya que con ella se puede determinar la estructura de un compuesto orgánico, según la posición (desdoblamiento), intensidad (área) y forma de las señales (picos) obtenidas en el espectro. Se utilizarán estos parámetros para determinar si la estructura obtenida corresponde a la C<sub>12</sub>-Ala y por tanto si la síntesis ha sido exitosa. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado pero su señal no es apreciable ya que aparece en torno a 7 ppm y se cortó el espectro en 4,75 para favorecer su visualización.

Como se puede apreciar en la figura 5.4, hay una serie de picos que van desde 4,75 ppm hasta 0,75 ppm. Desde señales mayores a menores, podemos observar una señal sobre 4,5 ppm consta de cinco picos, multiplete, y está constituida por un hidrógeno. Además, se encuentra a frecuencias elevadas por lo que viene de un hidrógeno muy desapantallado. Si nos fijamos en el dibujo de la molécula, podemos observar que el hidrógeno del carbono 3 tiene elementos capaces de desplazar las cargas adyacentes, como el grupo carboxilo, además presenta un solo hidrógeno, por lo que se ajusta a la señal observada.

Siguiendo el anterior procedimiento se puede resolver el espectro. Por tanto, la señal de 4,5 hace referencia al hidrógeno del carbono 3; la señal a 2,25 se relaciona con los dos hidrógenos del carbono 8 ya que sale más desplazada que un metileno normal. La señal a 1,75 haría referencia a los dos hidrógenos del carbono 9, ya que también se encuentra un poco desapantallados. Finalmente, la señal a 1,25 es la que cabría esperar de un metileno normal y al integrar a 16 hidrógenos se puede asociar a los 8 metilenos del resto de la cola hidrofóbica del compuesto (carbonos 10 a 17), y la señal a 0,8 se puede asociar con el metilo al ser la señal más apantallada y al integrar a 3 hidrógenos (carbono 18). Debido a los resultados obtenidos, la síntesis del surfactante se considera que fue exitosa.



**Figura 5.4.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN resuelto de la  $\text{C}_{12}$ -Ala en cloroformo deuterado.

### 5.1.2.- Caracterización sólido AMS-6

Los sólidos analizados presentaban alguna de estas condiciones:

AMS-6 as made; consiste en el sólido que, tras ser sintetizado, no ha sufrido ningún tratamiento posterior, por lo que el surfactante ( $\text{C}_{12}$ -Ala) todavía no ha sido extraído del interior de los poros.

AMS-6 extraído, la extracción se realiza en medio ácido. El sólido una vez que se ha extraído el porógeno  $\text{C}_{12}$ -Ala conserva las aminas en los poros del AMS-6. Posteriormente fueron cargados.

AMS-6 calcinado, se ha eliminado el porógeno del interior de los poros mediante calcinación a  $550\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 horas. Esta eliminación del porógeno conlleva también la pérdida de toda materia orgánica de la muestra, luego se elimina la funcionalización de los poros, las aminas.

#### 5.1.2.1.- Potencial zeta

El ZP puede servir para medir la carga superficial de un compuesto en una disolución coloidal. Esta capacidad fue empleada en este trabajo para valorar la carga superficial de las diferentes nanopartículas. Se valoraron las dos condiciones de extracción: extraído y calcinado. Así como también se valoraron las nanopartículas cargadas con  $\text{AgNO}_3$  o  $\text{AgSD}$ . Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5.1. Como se puede observar las AMS-6 calcinadas poseen un ZP negativo, como es el caso de la AMS-6.1 con  $-43 \pm 6\text{ mV}$ . Esto se debe a que como las aminas son eliminadas la superficie de las nanopartícula se quedan expuestos los silanatos. En cambio, en las AMS-6 extraídas, al conservarse las aminas, tienen carga positiva. Por ejemplo, AMS-6.1 con  $47 \pm 11\text{ mV}$ . A las nanopartículas cargadas se les extrajo el surfactante por medio de disolventes ácidos antes de cargarlas con  $\text{Ag}^+$  o  $\text{AgSD}$ , lo que explica su carga positiva. Sin embargo, en ambos casos, esta es menor que la de las AMS-6 extraídas debido a la interacción de los compuestos con las aminas del poro. Por ejemplo, en el caso de la AMS-6(Ag) el ZP  $31 \pm 4\text{ mV}$  mientras en la AMS-6(AgSD) es de  $35,2 \pm 8\text{ mV}$

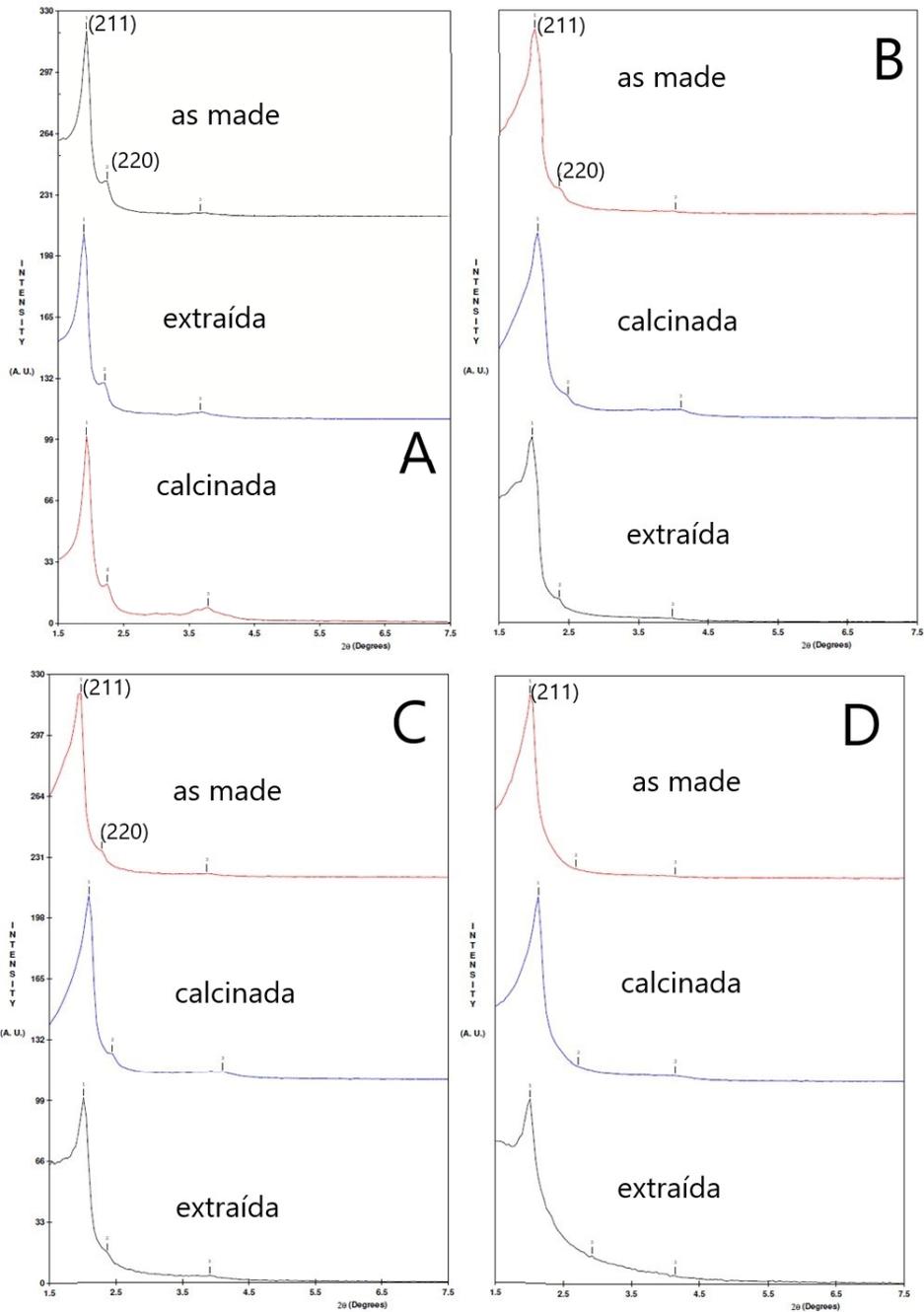
**Tabla 5.1.** Potencial Zeta de los sólidos AMS-6 cuyo surfactante ha sido extraído mediante calcinación o con un disolvente ácido y de los AMS-6 cargados.

<b>Partícula</b>	<b>Extracción</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>
AMS-6.1	calcinación	-43 ± 6
AMS-6.2	calcinación	-30 ± 5
AMS-6.3	calcinación	-14 ± 5
AMS-6.4	calcinación	-15 ± 5
AMS-6.1	Disolvente ácido	47 ± 11
AMS-6.2	Disolvente ácido	45 ± 6
AMS-6.3	Disolvente ácido	57 ± 6
AMS-6.4	Disolvente ácido	58 ± 7
AMS-6(Ag)	Disolvente ácido	31 ± 4
AMS-6(AgSD)	Disolvente ácido	35 ± 8

#### *5.1.2.2.- Difracción de rayos X en polvo*

Se valoraron los sólidos en sus tres condiciones: as made, extraída y calcinado.

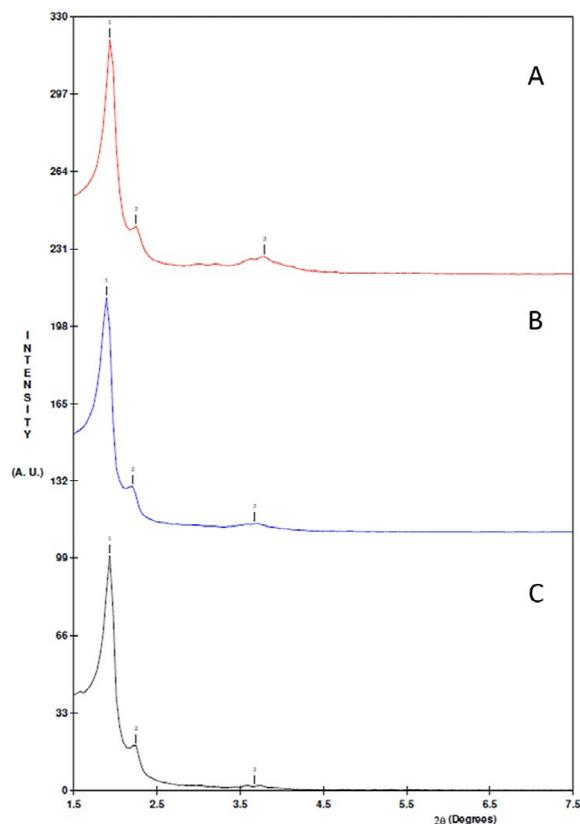
Con los datos obtenidos de un difractograma es posible estudiar las características estructurales de un material. En el caso de este estudio se emplean nanopartículas de estructura cúbica, por lo que se espera que al hacer el estudio de los materiales mediante pXRD a ángulos bajos se puedan observar los planos más representativos de la estructura cúbica. Estos planos se pueden identificar como planos de Bragg correspondiendo a (2 1 1) y a (2 2 0). Para ello se estudiaron las partículas según su síntesis, en sus tres estados, obteniéndose los difractogramas que se observan en la figura 5.5.



**Figura 5.5.** Difractogramas de las diferentes AMS-6 con diferentes rutas de síntesis. AMS-6 con ruta de síntesis 1 (A); ruta de síntesis 2 (B); ruta de síntesis 3 (C), ruta de síntesis 4 (D).

Como se puede observar en la figura 5.5 en algunos difractogramas no aparece el plano (2 2 0) (figura 5.5.D) o su intensidad es menor a la esperada y no se distingue bien este plano (figura 5.5.B y C), por lo que se supone que su estructura será amorfa. Por tanto, se eligió a la AMS-6 representada en la figura 5.5.A (correspondiente a la síntesis 1) como la adecuada para continuar con la caracterización, realizar los análisis microbiológicos y continuar con este trabajo, al mantener su estructura estable.

Además, mediante el análisis de los difractogramas de pDRX, se puede determinar si una nanopartícula ha sufrido alguna alteración en su estructura. Por tanto, se valorará si hubo algún tipo de modificación de la estructura tras extraer el surfactante. Para ello se analizará la figura 5.6, que muestra el difractograma de las partículas sintetizadas mediante la síntesis 1.



**Figura 5.6.** Comparación de los difractogramas de la AMS-6 sintetizadas mediante la síntesis 1. Se comparan los modelos as calcinada (A), extraída (B) y as made (C).

Como se puede observar en la figura 5.6, las nanopartículas extraídas muestran los picos característicos, indicando que mantienen la estructura cúbica. Esto muestra una alta estabilidad estructural. No obstante, si se observa cierto desplazamiento de las reflexiones sobre el eje X. Esto simboliza la contracción de la celda unidad a causa de la extracción del surfactante.

Como ya se ha comentado, una vez asignados los índices de Miller y con el empleo de la Ley de Bragg (ecuación 3.1) y la ecuación de la celda unidad cúbica (ecuación 3.2), se pueden obtener los valores de la distancia interplanar ( $d$ ) y la celda unidad ( $a_0$ ). Los resultados que se obtuvieron son los que se muestran en la tabla 5.2.

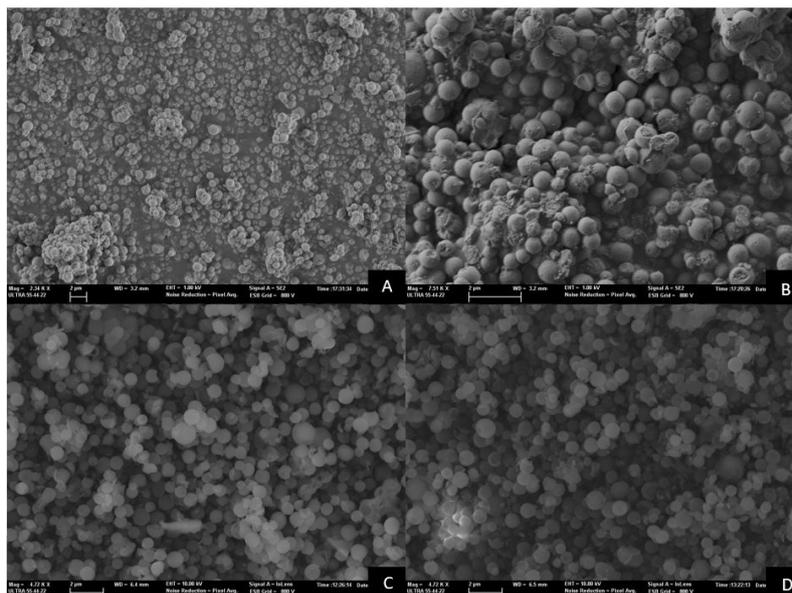
**Tabla 5.2.** Resultados obtenidos al calcular los parámetros de la distancia interplanar y la celda unidad.

Familia de planos	Características	As made	Extraída ácido	Calcinada
211	$a_0$ (Å)	112,500	113,700	111,000
	$d$ (Å)	45,927	46,418	45,315
220	$a_0$ (Å)	112,500	113,700	111,000
	$d$ (Å)	39,775	40,199	39,244

Mediante la tabla 5.2 se puede comprobar que con respecto a la as made se produce una expansión de la celda unidad (aumento del parámetro  $a_0$ ) al extraer el surfactante. Esto repercute en la distancia interplanar (parámetro  $d$ ) que aumenta respecto al as made. En cambio, en el caso de la calcinación se produce un proceso inverso produciéndose una contracción, una disminución tanto en los parámetros  $a_0$  y  $d$ .

### 5.1.2.3- FESEM y TEM

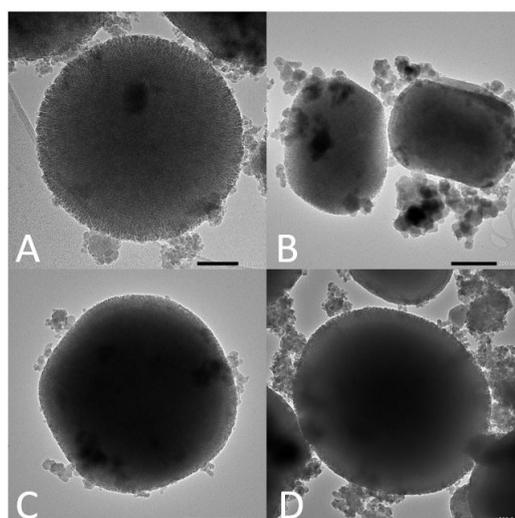
Con respecto a la caracterización mediante la técnica de FESEM, en la figura 5.7, se muestran una selección de fotos representativas.



**Figura 5.7.** Imágenes de FESEM de AMS-6 extraída (A) AMS-6 calcinada (B) AMS-6(Ag) (C) y AMS-6(AgSD) (D).

En la figura 5.7A se muestra las AMS-6 extraída y en la 5.7B las AMS-6 calcinada, observando que aparentemente no hay modificación en la forma, tamaño o composición general de la muestra tras el proceso de calcinación. Por otro lado, en la figura 5.7C, cargada con nitrato de plata, y en la figura 5.7D, cargada con sulfadiazina de plata, se puede observar que el proceso de carga no da lugar a una modificación importante de la superficie por lo que la estructura del material no se ve afectada en el proceso.

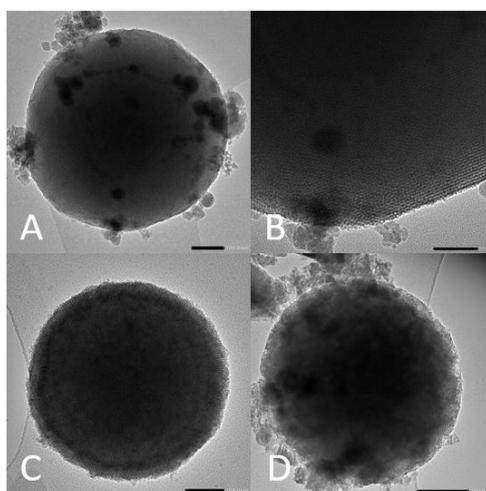
Los sólidos AMS-6 sintetizados se evaluaron mediante la técnica de TEM para observar las variaciones que podrían presentar los sólidos sintetizados en cuanto a forma y porosidad. Tal y como se observa en la figura 5.8, las cuatro síntesis presentan diferente morfología.



**Figura 5.8.** imágenes de TEM de las diferentes AMS-6 sintetizadas, as made. AMS-6 síntesis 1 (A), AMS-6 síntesis 2 (B), AMS-6 síntesis 3 (C) y AMS-6 síntesis 4 (D).

Con respecto a la síntesis 1, cuya imagen de TEM corresponde a la figura 5.8.A, su morfología es mucho más esférica que las demás y se aprecian mejor los canales del material si la comparamos con las figuras 5.8.B, C y D que representan las imágenes obtenidas de las síntesis 2, 3 y 4 respectivamente. Esto se relaciona muy bien con los resultados obtenidos pXRD, confirmando que la síntesis 1 es la más exitosa y justifica el uso de los materiales obtenidos a través de ella en el resto del trabajo.

Por último, se presentan las imágenes TEM de las AMS-6 calcinadas, figura 5.9.A y figura 5.9.B en la que podemos apreciar la estructura porosa del sólido a mayor magnificación. Por otro lado, se presentan las imágenes de TEM de las AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD), figuras 5.9.C y 5.9.D respectivamente en las que se puede deducir que no hay variación de la estructura tridimensional tras los procesos de carga. No obstante, en las imágenes tomadas de los sólidos cargados se dejan de apreciar los canales presentes en las AMS-6 extraídas de la figura 5.9.A, esto es debido a la pérdida de contraste producida por la presencia plata y de materia orgánica en sólidos cargados.

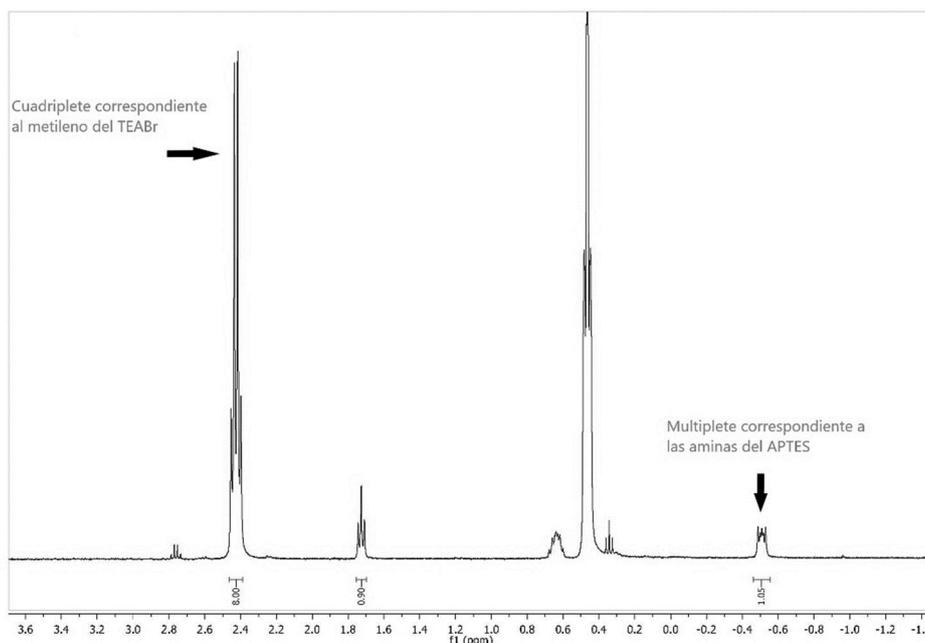


**Figura 5.9.** Imágenes de TEM de las AMS-6 calcinadas (A y B) y las cargadas, AMS-6(Ag) (C) y AMS-6(AgSD) (D).

#### *5.1.2.4-Resonancia magnética nuclear*

Mediante la espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN se puede identificar las especies o grupos que forman el sólido creado, AMS-6. Además, el añadir una cantidad conocida de una molécula patrón permite cuantificar la cantidad de grupos funcionales u otras moléculas de la muestra, al comparar las señales entre ambos compuestos. Esta especie patrón ha de consistir en una especie química que no reaccione con la muestra y cuya masa sea conocida. En el caso de este trabajo la molécula patrón fue el bromuro de tetraetilamonio (TEABr), que se utilizó para poder cuantificar la cantidad de aminas presentes en los poros de las partículas sintetizadas. Ya que estas poseen la capacidad de interactuar con la plata y poseen actividades antimicrobianas, características muy interesantes para este trabajo.

Tras ser extraído el surfactante con disolventes ácidos de la AMS-6 de síntesis. Se disolvió el sólido en una mezcla de sosa y agua deuterada y se introdujo al equipo obteniendo el siguiente espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, figura 5.10. Las señales del solvente no son apreciables debido a un corte en el espectro para su mejor visualización.



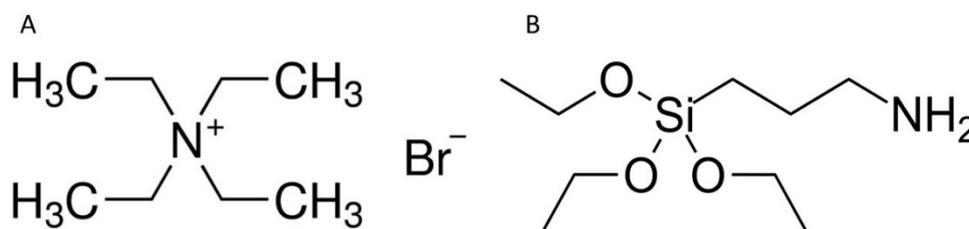
**Figura 5.10.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN AMS-6 extraído. Como disolvente se empleó una mezcla de sosa y agua, ambas deuteradas.

A partir de la figura 5.10 calcularemos la concentración de aminas en la muestra. Para ello se ha de utilizar la señal de los metilenos de la molécula TEABr (2,4 ppm) y la de la amina del APTES (-0,5 ppm) con sus correspondientes áreas. Con estos datos es posible determinar la relación molar entre el grupo funcional del sólido y el TEABr añadido, a través de la ecuación 5.1.

$$\frac{n(\text{TEABr})}{n(\text{APTES})} = \frac{\frac{\text{Área pico TEABr}}{n^\circ \text{ de H responsables de la señal}}}{\frac{\text{Área pico de APTES}}{n^\circ \text{ de H responsables de la señal}}} = \frac{\frac{m(\text{TEABr})}{M(\text{TEABr})}}{\frac{m(\text{APTES})}{M(\text{APTES})}}$$

**Ecuación 5.1.** Relación de TEABr y aminas APTES

Se pretende despejar los moles de APTES de la ecuación 5.1 para determinar la cantidad de amina. Del resto de incógnitas obtenemos su valor del espectro de la figura 5.10. Así el área integrada con valor 8 del pico de TEABr se relaciona con 8 hidrógenos correspondientes a los de los 4 metilenos del compuesto, como se puede ver en la figura 5.11.A. En el caso del pico del APTES su área integrada es igual 1,05 y su señal corresponde a los 2 hidrógenos de su amina primaria, como se ve en la figura 5.11.B. Además, se sabe la masa añadida de la molécula patrón, 6,17 mg, añadidos a 10,2 mg de muestra AMS-6. Con todo esto se puede proceder a resolver la ecuación 5.1.



**Figura 5.11.** Compuestos analizados en el  $^1\text{H}$ -RMN. TEABr (A) (*Tetraethylammonium bromide ReagentPlus*□, 99 71-91-0, s. f.), TEOS (B) (*3-Aminopropyltriethoxysilane* | 919-30-2, s. f.)

La ecuación con los valores sustituidos, conociendo el peso molecular del TEABr, quedaría:

$$\frac{6,17 \cdot 10^{-3}}{\frac{210,6}{n(\text{APTES})}} = \frac{8}{\frac{1,05}{2}}$$

Despejando la ecuación, se obtiene que los moles de APTES son igual a:

$$n(\text{APTES}) = 1,541 \cdot 10^{-5} \text{ moles de amina en } 10,20 \text{ mg de muestra}$$

Por tanto, el AMS-6 sintetizado posee  $1,511 \cdot 10^{-6}$  moles de amina o APTES por mg de nanopartícula; o 0,335 mg de APTES por mg de nanopartícula. Con estos datos puede sacarse el grado de funcionalización de las nanopartículas mediante la ecuación 5.2.

$$\text{grado de funcionalización} = \frac{m(\text{APTES})}{m(\text{AMS} - 6)} = \frac{n(\text{APTES})}{m(\text{AMS} - 6)} \cdot M(\text{APTES})$$

**Ecuación 5.2.** Ecuación para obtener el grado de funcionalización de la AMS-6

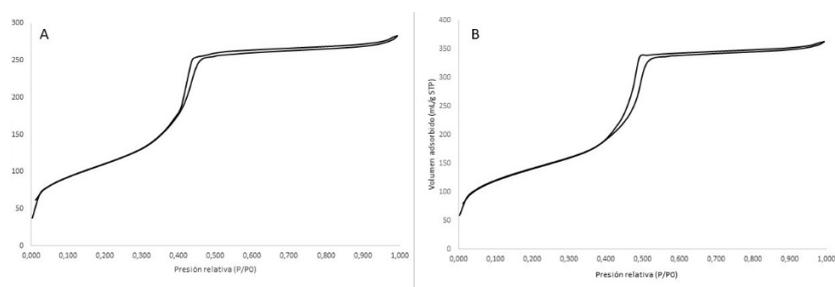
Resolviendo la ecuación anterior, se obtendría que;  $1,511 \cdot 10^{-6} \cdot 1000 \cdot 221,372 = 0,334$ . Por lo que se ha obtenido un grado de funcionalización de 0,334 o; lo que es lo mismo, el 33,4% de la masa de la AMS-6 es APTES funcionalizado.

#### 5.1.2.5- Adsorción-desorción de nitrógeno

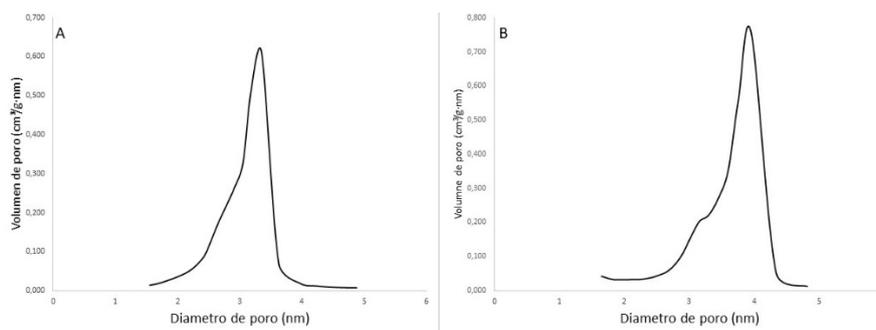
Mediante la porosimetría se pueden obtener los parámetros más significativos de la morfología de los poros del material, como la superficie específica, volumen y tamaño de poro. Por esto mismo se valoraron los poros de las nanopartículas cuyo surfactante había sido extraído mediante ácido o calcinación. Para ello se realizó un estudio de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>; con el que se obtuvieron los siguientes resultados recogidos en la tabla 5.3, así como las respectivas isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, las cuales se presentan en la figura 5.12 y los volúmenes de los poros, representados en la figura 5.13.

**Tabla 5.3.** Parámetros de poro obtenido con el estudio de las isotermas adsorción-desorción de N<sub>2</sub>; superficie específica, volumen de poro total y diámetro de poro. Los resultado se obtuvieron aplicando los modelos de BET (Brunauer et al., 1938) y BJH (Barrett et al., 1951).

	Superficie específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volumen poro total (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Diámetro de poro (nm)
AMS-6 calcinado	499,212	0,756	3,952
AMS-6 extraída	406,752	0,611	3,344



**Figura 5.12.** Isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>. Isotherma de AMS-6 extraída (A) y AMS-6 calcinada (B).



**Figura 5.13.** Representación del volumen de los poros según el diámetro de los mismos. Gráfica de AMS-6 extraída (A) y AMS-6 calcinada (B)

Como se puede observar en la tabla 5.3, la figura 5.12 y la figura 5.13, la AMS-6 calcinada posee un mayor tamaño de poro. Esto se debe a que la AMS-6 que se ha sometido a un proceso de extracción del surfactante mediante un disolvente ácido mantiene sus aminas, de forma que su tamaño de poro es menor que la nanopartícula calcinada. La AMS-6 calcinada tiene un volumen de poro de  $0,756 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$  frente a  $0,611 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$  de la AMS-6 extraída con ácido. El resto de los parámetros también son mayores en la AMS-6 calcinada.

Otra información que se puede extraer de la figura 5.12 es que como las curvas de adsorción y desorción coinciden, se considera el proceso de adsorción reversible. Además, se puede observar que hay ausencia de histéresis y la forma de la isoterma sugiere la presencia de poros uniformes. Finalmente, las dos isotermas (figura 5.12 A y B) muestran un salto entre 0,3 y 0,5 (P/P0) en la figura 5.12.A (AMS-6 extraída) y entre 0,4 y 0,5 (P/P0) en la figura 5.12.B (AMS-6 calcinada) que las caracteriza como isotermas de tipo IV. Respecto a la figura 5.13 se vuelve a ver que el tamaño de poro en la calcinada es mayor.

## 5.2.- Resultados ensayos microbiológicos

### 5.2.1.- Recta de calibrado

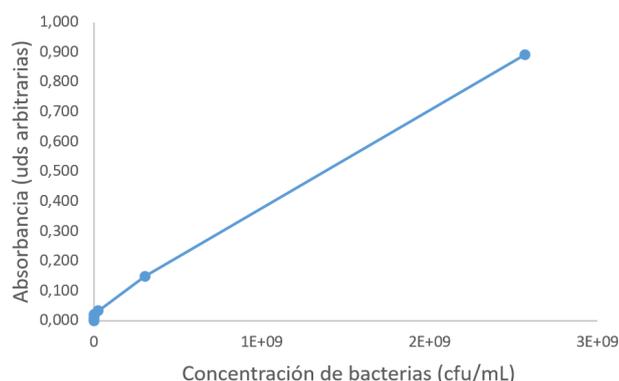
Con la recta de calibrado se podrá obtener la concentración a la que se encuentra un cultivo bacteriano previamente a la realización de un ensayo. Para obtenerla se relacionó la absorbancia de un cultivo bacteriano en MHB con su posterior recuento de bacterias. Obteniéndose así los datos recogidos en las tablas 5.4 y 5.5, que se emplearon para realizar la figura 5.14 de la que a su vez se obtiene la ecuación de la recta de calibrado, ecuación 5.3.

**Tabla 5.4.** Recuentos y su concentración real tras aplicar el correspondiente factor de dilución.

Concentración estimada (cel/mL)	Dilución	Recuento (Promedio)	Factor de dilución	Concentración real (CFU/mL)
$10^4$	$10^{-1}$	51	$10 \cdot 50$	25000
$10^5$	$10^{-2}$	58	$10^2 \cdot 50$	235000
$10^6$	$10^{-3}$	47	$10^3 \cdot 50$	3000000
$10^7$	$10^{-4}$	60	$10^4 \cdot 50$	23500000
$10^8$	$10^{-5}$	47	$10^5 \cdot 50$	303750000
$10^9$	$10^{-6}$	50	$10^6 \cdot 50$	2566666667

**Tabla 5.5.** la concentración bacteriana de *S. aureus* y la absorbancia medida a 600 nm

Concentración estimada (cel/mL)	Concentración real (CFU/mL)	logaritmo	absorbancia
10 <sup>4</sup>	25000	4,398	0,00983
10 <sup>5</sup>	235000	5,371	0,01940
10 <sup>6</sup>	3000000	6,477	0,02312
10 <sup>7</sup>	23500000	7,371	0,03291
10 <sup>8</sup>	303750000	8,482	0,14962
10 <sup>9</sup>	2566666667	9,409	0,89054



**Figura 5.14.** Recta de calibrado. Concentración de bacteria *S. aureus* frente a la absorbancia medida a 600 nm en medio MHB

$$CFU = \frac{Absorbancia}{3,4097 * 10^{-10}}$$

**Ecuación 5.3.** Ecuación recta de calibrado. Obtenida de la gráfica 1 aplicando la ecuación de una recta y fue utilizada para obtener las concentraciones bacterianas previamente a los ensayos microbianos.

Por ejemplo, en uno de los ensayos se obtuvo una absorbancia igual a 0,908873 que se correspondía a  $2,666 \cdot 10^8$  cfu/mL que es igual a  $10^{9,415}$  cel/mL.

### 5.2.2.- Ensayos antimicrobianos

Para valorar la actividad antimicrobiana de los nuevos sólidos sintetizados y cargados se emplearon tres tipos de ensayos; en plantónico, ensayos de MIC y de MBC. Se emplearon partículas de la síntesis 1 extraídas en medio ácido.

Como agente patógeno se escogió *S. aureus* ya que un gran porcentaje de las infecciones que se producen en las quemaduras son a causa de *S. aureus*, en concreto la cepa MRSA. Además, está registrada la efectividad de los tratamientos de plata sobre esta cepa y otras cepas de *S. aureus*.

#### 5.2.2.1.- Ensayo antimicrobiano en plantónico

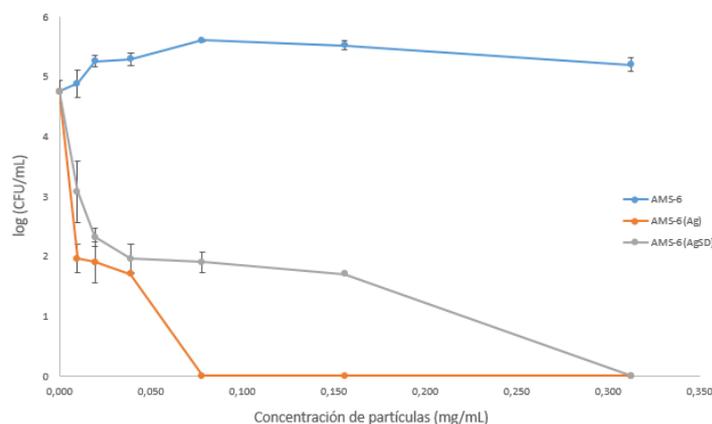
Como un objetivo de este trabajo, se procedió a valorar la efectividad de las nanopartículas cargadas. Para ello se prepararon las mismas concentraciones de los diferentes sólidos, los cuales fueron; AMS-6 sin cargar, AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD). Se emplearon concentraciones que fueron desde 5 mg/mL hasta 0,00975 mg/mL de partículas a través diluciones seriadas. El ensayo en plantónico se realizó en MHB y se sembró en placas Petri con MHA.

Los resultados obtenidos fueron diferentes según la nanopartícula empleada, como se puede apreciar en la tabla 5.6. Las nanopartículas sin carga no presentaron actividad antimicrobiana a ninguna concentración estudiada y presentaban un log(CFU) promedio de en torno a 5,18 frente

al 4,68 del control positivo. En el caso de las nanopartículas cargadas, las AMS-6(Ag) presentaban una mayor actividad antimicrobiana ya que a concentraciones de 0,078 mg/mL las partículas mostraban una actividad bactericida completa,  $\log(\text{CFU})=0$ . Mientras las AMS-6(AgSD) la actividad bactericida completa se alcanzaba a una concentración de 0,3125 mg/mL. En la figura 5.15 se puede apreciar los valores obtenidos durante el ensayo, las concentraciones de nanopartículas varían de 0 a 0,3125 mg/mL ya que fue la concentración mínima donde se vio actividad bactericida en ambas partículas cargadas.

**Tabla 5.6.** Resultados de Log(CFU) para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las diferentes nanopartículas.

Microorganismo	Sólido o Control	[Sólido] bactericida (mg/mL)	Log(CFU)
<i>S. aureus</i>	Control + 1	0,000	4,42
	Control + 2	0,000	4,94
	AMS-6	10,000	5,18
	AMS-6(Ag)	0,078	0,00
	AMS-6(AgSD)	0,313	0,00

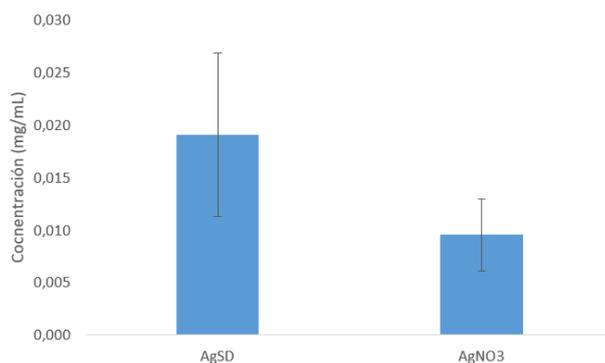


**Figura 5.15.** Valores de Log(CFU/mL) obtenidos durante el ensayo antimicrobiano con AMS-6 sin cargar y AMS-6(Ag) o AMS-6(AgSD),  $n = 3$  para cada uno. Las barras de error hacen referencia el error estándar.

#### 5.2.2.2.- Ensayo concentración mínima inhibitoria

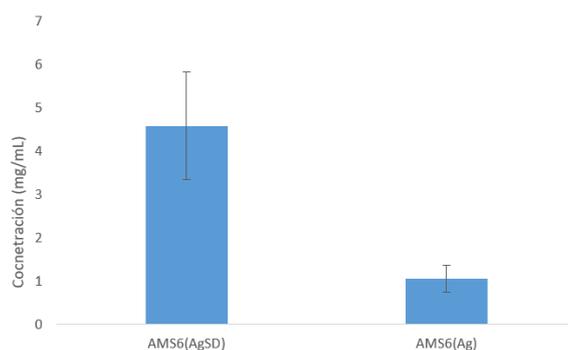
Seguidamente, se buscó determinar la MIC para cada compuesto. La MIC se define como la concentración mínima de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación overnight (Andrews, 2001). Todos los compuestos empleados se disolvieron en MHB y todos los ensayos se realizaron con *S. aureus*. Los resultados obtenidos permitieron comparar las diferentes actividades de los compuestos al estar en capsulados o no.

Para establecer la actividad antimicrobiana de cada compuesto, se utilizaron los ensayos MIC con resazurina. Los primeros compuestos en ser valorados fueron el  $\text{AgNO}_3$  y la AgSD. Ambos tratamientos resultaron ser efectivos, aunque el  $\text{AgNO}_3$  presentó un mejor desempeño como se puede ver en la figura 5.16. En concreto, los valores de MIC para el  $\text{AgNO}_3$  fueron de  $9 \pm 3$   $\mu\text{g/mL}$ . Mientras, en el caso de la AgSD, su MIC resultó ser de  $19 \pm 8$   $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados son coherentes con la bibliografía revisada (Cavassin et al., 2015).



**Figura 5.16.** Resultados de los ensayos de MIC para ambos tratamientos no encapsulados, AgSD y Ag. Valores de MIC obtenidos de todos los ensayos (n = 9). Las barras de error hacen referencia el error estándar.

Respecto a la capacidad antimicrobiana de los compuestos encapsulados, AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD), fue valorada también con respecto a su MIC. Se comprobó que se correlacionaba bien la actividad de los compuestos encapsulados con los compuestos libres ya que la AMS-6(Ag) era más activa que la AMS-6(AgSD), como se puede apreciar en la figura 5.17. Los valores obtenidos fueron una MIC de  $4,5 \pm 1,3$  mg/mL, para la AMS-6(AgSD). Mientras, para la AMS-6(Ag), la MIC obtenida fue de  $1,0 \pm 0,3$  mg/mL.

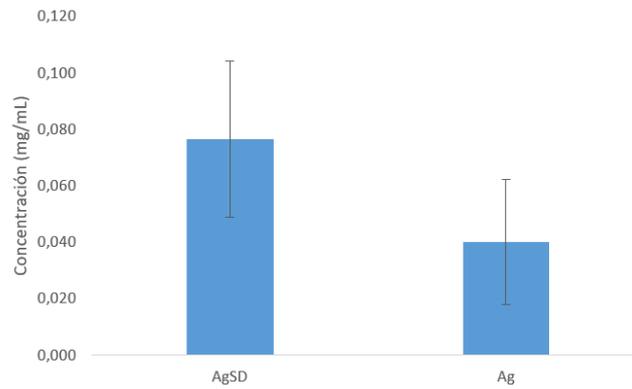


**Figura 5.17.** Resultados de los ensayos de MIC para ambos tratamientos encapsulados, AMS-6(AgSD) y AMS-6(Ag). Valores de MIC obtenidos de todos los ensayos (n = 9). Las barras de error hacen referencia al error estándar.

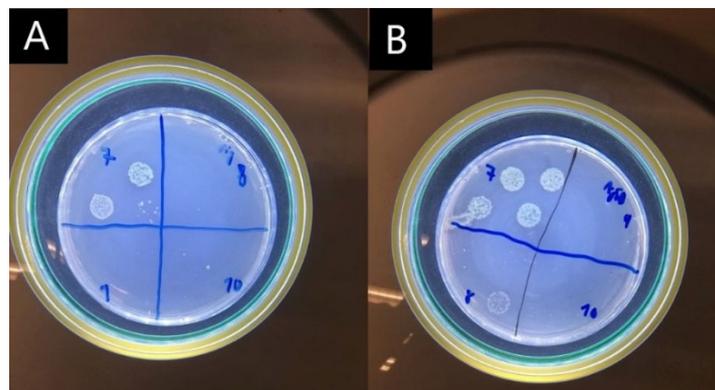
### 5.2.2.3.- Ensayo de concentración mínima bactericida

Una vez determinada la MIC, se procedió a continuar con el estudio de las propiedades antimicrobianas de los diferentes compuestos, tanto libres como encapsulados. Para ellos se realizaron ensayos de concentración mínima bactericida (MBC). La MBC es la mínima concentración de antimicrobiano que impediría el crecimiento de un organismo tras su subcultivo en un medio libre de dicho antimicrobiano. En caso de observar crecimiento en pocillos que no mostraban actividad en los ensayos de MIC, esto significa que a esa concentración el antimicrobiano tiene un papel bacteriostático y no bactericida. En cambio, en el primer pocillo que tras sembrar no se vea crecimiento se considera que a esa concentración el antimicrobiano es bactericida y que en concreto esa concentración es la MBC del compuesto.

Tanto el AgNO<sub>3</sub> como la AgSD presentan un comportamiento bactericida, aunque a concentraciones mayores que su MIC. En el caso de la Ag la MBC sería igual a  $40 \pm 22$  µg/mL. En el caso de la AgSD la MBC obtenida fue de  $76 \pm 28$  µg/mL, como se puede apreciar en la figura 5.18. Por tanto, la MBC del AgNO<sub>3</sub> es menor que la de la AgSD, lo que significa que su capacidad bactericida es mayor, esto puede verse reflejado en la figura 5.19.

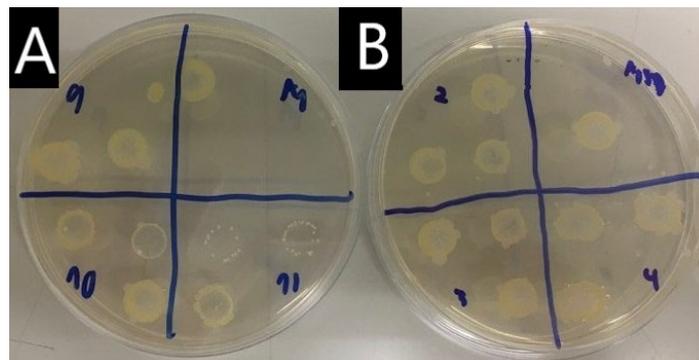


**Figura 5.18.** Resultados de los ensayos de MBC de los compuestos libre no encapsulado, AgSD y AgNO<sub>3</sub>. Valores de MBC obtenidos de todos los ensayos (n = 9). Las barras de error hacen referencia al error estándar.



**Figura 5.19.** Ejemplo de ensayo de concentración mínima bactericida. Se muestra el estudio de MBC de los compuestos libres, AgNO<sub>3</sub> (A) y de la AgSD (B).

En caso de los encapsulados durante este ensayo no se pudo obtener su MBC y por tanto las concentraciones donde se apreciaba inhibición del crecimiento en los ensayos MIC son realmente concentraciones en las que los compuestos actúan de forma bacteriostática. Esto se puede ver en la figura 5.20 Según los resultados obtenidos la MBC de la AMS-6(Ag) sería > 2,5 mg/mL. En el caso de la AMS-6(AgSD) su MBC sería > 5mg/mL.



**Figura 5.20** Ejemplo de un estudio de la concentración mínima bactericida. En este caso se muestra el estudio de las MBCs de las partículas cargadas, AMS-6(Ag) (A); y de la AMS-6(AgSD) (B).

## 6.- CONCLUSIONES

Debido a la problemática actual que presentan los tratamientos para quemaduras graves y el alto porcentaje de infecciones en las mismas surge la necesidad de obtener nuevos tratamientos para este tipo de heridas. Durante este trabajo se planteó la posibilidad de utilizar la nanomedicina como propuesta alternativa a los tratamientos actuales. Se desarrollaron dos dispositivos de liberación sostenida de fármacos antimicrobianos con potencial aplicación en el tratamiento de lesiones por quemaduras. Estos dispositivos constan de un vehículo, para la encapsulación y transporte de los fármacos seleccionados, que consistía en un sólido mesoporoso tipo AMS-6 cargados con AgNO<sub>3</sub> o AgSD para mejorar los tratamientos ya existentes. Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

- Se optimizó la síntesis del material mesoporoso tipo AMS-6 que fue caracterizado mediante las técnicas de pXRD y TEM, seleccionando que los parámetros adecuados para su síntesis correspondieron a los de la síntesis 1. Sin embargo, no se obtuvo una síntesis en la que el índice de polidispersión de la muestra fuese bajo.
- Para su uso como dispositivo de liberación de fármacos antimicrobianos, estos sólidos fueron cargados con AgNO<sub>3</sub> o AgSD obteniéndose así dos dispositivos, AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD) respectivamente.
- Posteriormente, se evaluaron las características antimicrobianas contra la bacteria *S. aureus* de los compuestos sin cargar (AgNO<sub>3</sub> y AgSD). Los resultados obtenidos mediante los ensayos antimicrobianos demostraron que la plata libre, debida al AgNO<sub>3</sub>, es el compuesto con mayor actividad antimicrobiana.
- Por otro lado, se evaluaron los nanodispositivos cargados, el AMS-6(Ag) y el AMS-6(AgSD), y se observó que presentaba mayor actividad antimicrobiana el cargado con AgNO<sub>3</sub> presentando unos valores de MIC de  $1,0 \pm 0,3$  mg/mL frente al valor de MIC de  $4,5 \pm 1,3$  mg/mL que presenta el cargado con AMS-6(AgSD). Además, los nanodispositivos AMS-6(Ag) y AMS-6(AgSD) tienen capacidad de eliminar una concentración de en torno a  $10^5$  UFC/mL de la bacteria *S. aureus* a una concentración de 78 µg/mL y 313 µg/mL respectivamente.
- Para poder realizar la comparación entre la actividad antimicrobiana de los nanodispositivos cargados con los fármacos en base plata y los fármacos libres, es necesario conocer la cantidad de fármaco que ha quedado encapsulado en el interior del nanodispositivo. Sin embargo, esa determinación de la cantidad de plata no pudo llevarse a cabo a lo largo de este trabajo por lo que será una de las próximas tareas a realizar para continuar con este trabajo de investigación.

**PERSPECTIVAS DE FUTURO:** También cabría repetir los ensayos antimicrobianos en los que la desviación estándar de los valores medios obtenidos sea elevada. Además sería adecuado realizar un ensayo de liberación sostenida para ver el perfil de liberación y así cuantificar los fármacos encapsulados. Y, finalmente, se podría plantear hacer un ensayo en un modelo adecuado ya que es in vivo donde la utilidad de los tratamientos convencionales se ve limitada.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

3-Aminopropyltriethoxysilane | 919-30-2. (s. f.). ChemicalBook. Recuperado 1 de julio de 2022, de [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8686147.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8686147.htm)

*Adsorción física de gases.* (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2022, de <http://www.labte.es/index.php/es/2013-11-03-19-54-23/propiedades-texturales/adsorcion-fisica-de-gases>

*ANÁLISIS DE LA TEXTURA POROSA DE SÓLIDOS. Servicios Técnicos de Investigación.* (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2022, de <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis-termico/analisis-de-la-textura-porosa-de-solidos.html>

ANDREWS, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)

ATIYEH, B. S., COSTAGLIOLA, M., HAYEK, S. N., & DIBO, S. A. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33(2), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.010>

ATLURI, R., HEDIN, N., & GARCIA-BENNETT, A. E. (2008). Hydrothermal Phase Transformation of Bicontinuous Cubic Mesoporous Material AMS-6. *Chemistry of Materials*, 20(12), 3857-3866. <https://doi.org/10.1021/cm702440n>

AZIZ, Z., ABU, S. F., & CHONG, N. J. (2012). A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. *Burns*, 38(3), 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.09.020>

BARRETT, E. P., JOYNER, L. G., & HALENDA, P. P. (1951). The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1), 373-380. <https://doi.org/10.1021/ja01145a126>

BELL, D. J. (s. f.). *Gold standard | Radiology Reference Article | Radiopaedia.org.* Radiopaedia. <https://doi.org/10.53347/rID-69645>

BERNARDOS BAU, A. (2011). *Desarrollo y síntesis de materiales híbridos, para la liberación controlada de moléculas bioactivas* [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/27151>

BESSEY, P. Q. (2007). Chapter 11—Wound care. En D. N. Herndon (Ed.), *Total Burn Care (Third Edition)* (pp. 127-135). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3274-8.50014-3>

*Bragg's Law For Diffraction.* (s. f.). Recuperado 19 de junio de 2022, de <https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/intranet/pendulum/braggs/>

BRUNAUER, S., EMMETT, P. H., & TELLER, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309-319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>

*Burns.* (s. f.). Recuperado 18 de mayo de 2022, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>

CAVASSIN, E. D., DE FIGUEIREDO, L. F. P., OTOCH, J. P., SECKLER, M. M., DE OLIVEIRA, R. A., FRANCO, F. F., MARANGONI, V. S., ZUCOLOTTO, V., LEVIN, A. S. S., & COSTA, S. F. (2015). Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against

multidrug resistant bacteria. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, 64. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0120-6>

CHEN, G., ROY, I., YANG, C., & PRASAD, P. N. (2016, enero 22). *Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy* (world) [Review-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>

CHEN, L., LIU, J., ZHANG, Y., ZHANG, G., KANG, Y., CHEN, A., FENG, X., & SHAO, L. (2018). The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. *Nanomedicine*, 13(15), 1939-1962. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0076>

*Cloruro de lauroilo, 98 %, Thermo Scientific | Fisher Scientific*. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2022, de <https://www.fishersci.es/shop/products/lauroyl-chloride-98-thermo-scientific/10308903>

*Cristalografía. Redes directa y recíproca*. (s. f.). Recuperado 15 de junio de 2022, de [https://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_04.html](https://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_04.html)

*Difracción de RX*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://www.uv.es/uvweb/instituto-ciencia-materiales-icmuv/es/icmuv/tecnicas-disponibles/difraccion-rx-1285918028148.html>

*Difractograma de Rayos X-UPV*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de [https://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm03/pfcm3\\_4\\_1.html](https://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm03/pfcm3_4_1.html)

*Difractometría de Rayos X (Polvo)*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/difractometra-de-rayos-x-polvo>

*Equipos*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/scsie-burjassot-paterna/difraccion-rayos-polvo/equipos-1285878643389.html>

*Espectrofotómetro Ultravioleta-visible (UV-vis)*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/scsie-burjassot-paterna/espectroscopia-atomica-molecular/equipos/espectrofotometro-ultravioleta-visible-uv-vis-1285876881946/OCTRekurs.html?id=1286169638907>

*Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear*. (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2022, de <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-resonancia-magnitica-nuclear>

*Espectroscopia.pdf*. (s. f.). Recuperado 9 de junio de 2022, de <https://www.uv.es/jcastell/Espectroscopia.pdf>

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) of the EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY and INFECTIOUS DISEASES (ESCMID). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix-xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>

FADEEL, B., & GARCIA-BENNETT, A. E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 362-374. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>

GARCIA-BENNETT, A. E., TERASAKI, O., CHE, S., & TATSUMI, T. (2004). Structural Investigations of AMS-n Mesoporous Materials by Transmission Electron Microscopy. *Chemistry of Materials*, 16(5), 813-821. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/CM035074Z](https://doi.org/10.1021/CM035074Z)

HOZAYEN, W. G., MAHMOUD, A. M., DESOUKY, E. M., EL-NAHASS, E.-S., SOLIMAN, H. A., & FARGHALI, A. A. (2019). Cardiac and pulmonary toxicity of mesoporous silica nanoparticles is associated with excessive ROS production and redox imbalance in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2527-2538. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.093>

KHUNDKAR, R., MALIC, C., & BURGE, T. (2010). Use of Acticoat™ dressings in burns: What is the evidence? *Burns*, 36(6), 751-758. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.04.008>

*L-alanina, 99 %, pura, Fisher Chemical | Fisher Scientific.* (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2022, de <https://www.fishersci.es/shop/products/l-alanine-99-pure/10714941>

MATLOCK ET AL. - *Analyzing Differences in Bacterial Optical Density.pdf.* (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2022, de <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CAD/posters/nanodroptryPOSTER.pdf>

*Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo: Servicio de Microscopía Electrónica: UPV.* (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2022, de <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html>

*Microscopía electrónica de transmisión: Servicio de Microscopía Electrónica: UPV.* (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2022, de <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753329normalc.html>

MILES, A. A., MISRA, S. S., & IRWIN, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38(6), 732-749. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2199673/>

MUNTEANU, A., FLORESCU, I., & NITESCU, C. (2016). A modern method of treatment: The role of silver dressings in promoting healing and preventing pathological scarring in patients with burn wounds. *Journal of Medicine and Life*, 9(3), 306-315. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154321/>

MURPHY, P. S., & EVANS, G. R. D. (2012). Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plastic Surgery International*, 2012, 190436. <https://doi.org/10.1155/2012/190436>

*NCATS Inxight Drugs—SILVER SULFADIAZINE.* (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2022, de <https://drugs.ncats.io/drug/W46JY43EJR>

NHERERA, L. M., TRUEMAN, P., ROBERTS, C. D., & BERG, L. (2017). A systematic review and meta-analysis of clinical outcomes associated with nanocrystalline silver use compared to alternative silver delivery systems in the management of superficial and deep partial thickness burns. *Burns*, 43(5), 939-948. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2017.01.004>

*N-Lauroyl-L-alanine.* (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2022, de <https://www.keyorganics.net/n-lauroyl-l-alanine-52558-74-4-c15h29no3.html>

*N-Lauroyl-L-alanine =99.0 TLC 52558-74-4.* (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <http://www.sigmaaldrich.com/>

NORBURY, W., HERNDON, D. N., TANKSLEY, J., JESCHKE, M. G., & FINNERTY, C. C. (2016). Infection in Burns. *Surgical Infections*, 17(2), 250-255. <https://doi.org/10.1089/sur.2013.134>

- OAKS, R. J., & CINDASS, R. (2022). Silver Sulfadiazine. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556054/>
- ORTEGA, P., LUIS COPA-PATIÑO, J., ANGELES MUÑOZ-FERNANDEZ, M., SOLIVERI, J., GOMEZ, R., & MATA, F. J. DE LA. (2008). Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(18), 3264-3269. <https://doi.org/10.1039/B809569H>
- Precipitation of Silver Chloride*. (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2022, de <https://sciencedemonstrations.fas.harvard.edu/presentations/precipitation-silver-chloride>
- Presentación*. (s. f.). Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/scsie-burjassot-paterna/espectroscopia-atmica-molecular/presentacion-1285876881824.html>
- PubChem. (s. f.). *Hazardous Substances Data Bank (HSDB): 685*. Recuperado 12 de junio de 2022, de [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/685#section=Solubility-\(Complete\)&fullscreen=true](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/685#section=Solubility-(Complete)&fullscreen=true)
- ¿Qué es una placa de 96 pocillos? - BALLYA. (s. f.). <https://Ballyabio.Com/Es/>. Recuperado 15 de junio de 2022, de <https://ballyabio.com/es/%C2%BFQu%C3%A9-es-una-placa-de-96-POCILLOS%3F/>
- RASHAAN, Z. M., KRIJNEN, P., KLAMER, R. R. M., SCHIPPER, I. B., DEKKERS, O. M., & BREEDERVELD, R. S. (2014). Nonsilver treatment vs. silver sulfadiazine in treatment of partial-thickness burn wounds in children: A systematic review and meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration*, 22(4), 473-482. <https://doi.org/10.1111/wrr.12196>
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | Universidad de Burgos*. (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2022, de <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/resonancia/resonancia-magnetica-nuclear-rmn>
- RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J., & MINOR, L. (2004). Cell Viability Assays. En S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Ingles, P. W. Iversen, S. C. Kales, ... X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- ROLDÁN, M. V., PELLEGRINI, N. S., & DE SANCTIS, O. A. (2012). Optical Response of Silver Nanoparticles Stabilized by Amines to LSPR based Sensors. *Procedia Materials Science*, 1, 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2012.06.080>
- ROUQUEROL, J., AVNIR, D., FAIRBRIDGE, C. W., EVERETT, D. H., HAYNES, J. M., PERNICONE, N., RAMSAY, J. D. F., SING, K. S. W., & UNGER, K. K. (1994). Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 66(8), 1739-1758. <https://doi.org/10.1351/pac199466081739>
- RYU, H. J., SEONG, N., SO, B. J., SEO, H., KIM, J., HONG, J.-S., PARK, M., KIM, M.-S., KIM, Y.-R., CHO, K.-B., SEO, M. Y., KIM, M.-K., MAENG, E. H., & SON, S. W. (2014). Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days. *International Journal of Nanomedicine*, 9(Suppl 2), 127-136. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57929>
- SELÇUK, C. T., DURGUN, M., ÖZALP, B., TEKIN, A., TEKIN, R., AKÇAY, C., & ALBALIK, U. (2012). Comparison of the antibacterial effect of silver sulfadiazine 1%, mupirocin 2%, Acticoat and otenidine dihydrochloride in a full-thickness rat burn model contaminated with multi drug

resistant *Acinetobacter baumannii*. *Burns*, 38(8), 1204-1209. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.04.009>

*Silver Sulfadiazine: Side Effects, Dosages, Treatment, Interactions, Warnings*. (s. f.). RxList. Recuperado 18 de mayo de 2022, de [https://www.rxlist.com/consumer\\_silver\\_sulfadiazine\\_silvadene/drugs-condition.htm](https://www.rxlist.com/consumer_silver_sulfadiazine_silvadene/drugs-condition.htm)

STRØMME, M., BROHEDE, U., ATLURI, R., & GARCIA-BENNETT, A. E. (2009). Mesoporous silica-based nanomaterials for drug delivery: Evaluation of structural properties associated with release rate. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(1), 140-148. <https://doi.org/10.1002/wnan.13>

*Tetraethyl orthosilicate*. (s. f.). American Chemical Society. Recuperado 29 de mayo de 2022, de <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/tetraethyl-orthosilicate.html>

*Tetraethylammonium bromide ReagentPlus* , 99 71-91-0. (s. f.). Recuperado 21 de junio de 2022, de <http://www.sigmaaldrich.com/>

*Topical agents and dressings for local burn wound care—UpToDate*. (s. f.). Recuperado 18 de mayo de 2022, de <https://www.uptodate.com/contents/topical-agents-and-dressings-for-local-burn-wound-care/print>

TRZECIAK, K., CHOTERA-OUUDA, A., BAK-SYPIEN, I. I., & POTRZEBOWSKI, M. J. (2021). Mesoporous Silica Particles as Drug Delivery Systems—The State of the Art in Loading Methods and the Recent Progress in Analytical Techniques for Monitoring These Processes. *Pharmaceutics*, 13(7), 950. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070950>

VENTOLA, C. L. (2012). The Nanomedicine Revolution. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(9), 512-525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462600/>

WILLIAMS, F. N., HERNDON, D. N., HAWKINS, H. K., LEE, J. O., COX, R. A., KULP, G. A., FINNERTY, C. C., CHINKES, D. L., & JESCHKE, M. G. (2009). The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. *Critical Care*, 13(6), R183. <https://doi.org/10.1186/cc8170>

YUN, J.-W., KIM, S.-H., YOU, J.-R., KIM, W. H., JANG, J.-J., MIN, S.-K., KIM, H. C., CHUNG, D. H., JEONG, J., KANG, B.-C., & CHE, J.-H. (2015). Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 681-693. <https://doi.org/10.1002/jat.3125>