
Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina

Maria C. Llinàs, David Sánchez-García*

Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, E-08017 Barcelona (Spain)

Silica nanoparticles: preparation and applications in biomedicine

Nanopartícules de sílice: preparació i aplicacions en biomedicina

Recibido: 15 de julio de 2013; revisado: 4 de diciembre de 2013; aceptado: 5 de diciembre de 2013

RESUMEN

Actualmente, un importante número de avances científicos se fundamentan en la utilización de nanopartículas como superficies de actuación, vehículos de transporte, en procesos relacionados con aplicaciones en catálisis, sistemas de información, nuevos materiales o biomedicina. Esta revisión se centra en las nanopartículas de sílice mesoporosas, las cuales están caracterizadas por su elevada superficie específica, su buena biocompatibilidad, su fácil obtención en múltiples tamaños y formas, así como su fácil funcionalización.

Palabras clave: nanotecnología, administración de fármacos, nanopartículas de sílice mesoporosas.

SUMMARY

Currently, a large number of scientific advances are based on the use of nanoparticles as functional surfaces or transport vehicles, in processes related to applications in catalysis, information systems, new materials or biomedicine. This review focuses on mesoporous silica nanoparticles, which are characterized by their high specific surface, its good biocompatibility, easy preparation in multiple sizes and shapes, as well as its easy functionalization.

Key words: nanotechnology, drug delivery, mesoporous silica nanoparticles.

RESUM

Actualment, un gran nombre d'avenços científics es basen en l'ús de nanopartícules com a superfícies d'actuació o vehicles de transport, en processos relacionats amb aplicacions en catàlisi, sistemes d'informació, nous materials o biomedicina. Aquesta revisió se centra en nanopartícules de sílice mesoporoses, que es caracteritzen per la seva alta superfície específica, la seva bona biocompatibilitat, fàcil obtenció en múltiples mides i formes, així com la seva fàcil funcionalització.

Mots clau: nanotecnologia, administració de fàrmacs, nanopartícules de sílice mesoporoses.

*Autor para la correspondencia: david.sanchez@iqs.edu

1. NANOPARTÍCULAS

En los últimos años, el uso de las nanopartículas (NP's) tanto en la investigación como en la industria ha aumentado de forma exponencial. Según un informe de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), la manufacturación de productos que utilizan nanopartículas pasará del 0,1% en 2013, a un 15% en 2015 con aplicaciones en el transporte, energía y medio ambiente, electrónica, biotecnología, ciencias de la salud, sector textil y construcción⁽¹⁾. Las NP's se definen como partículas que tienen al menos una de las dimensiones en el rango comprendido entre 1 y 100 nm⁽²⁾. En la Figura 1 se comparan los tamaños de diversas NP's con una molécula de agua y una célula. Como se puede apreciar las NP's poseen un tamaño comprendido entre el de pequeñas proteínas y los virus.

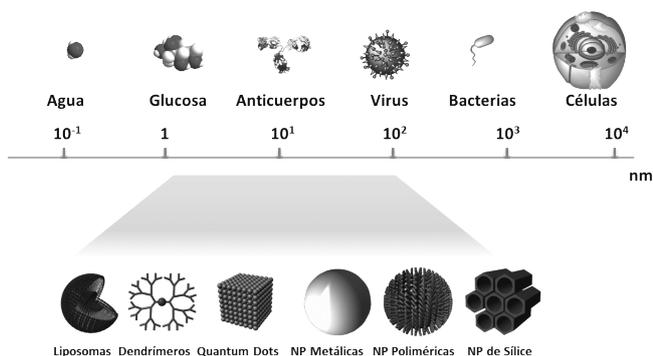


Figura 1: Escala de tamaños

Dentro del término NP's se engloban diversas familias de nanobjetos: dendrímeros, liposomas, sistemas poliméricos, micelas, virus, "quantum dots", nanotubos de carbono y todo tipo de nanopartículas de metales de transición y sílice entre las más estudiadas⁽³⁻⁵⁾. Generalmente, las nanopartículas se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza inorgánica u orgánica (Tabla 1). Así, las nano-

partículas orgánicas están formadas por materiales tales como polímeros, estructuras repetitivas, bicapas lipídicas, mientras que los materiales inorgánicos estarían formados por metales y materiales inertes como el dióxido de titanio, la hidroxiapatita o la sílice.

2. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA

Desde hace una década las nanopartículas de sílice mesoporosa (MNP's) han atraído la atención de la comunidad científica. Este hecho es debido a sus excepcionales propiedades físico-químicas como son su resistencia mecánica, estabilidad química, biocompatibilidad y versatilidad sintética^(6,7). Estas NP's están constituidas por una matriz de sílice y se caracterizan por la presencia de poros de un diámetro comprendido entre los 2 y 50 nm⁽⁸⁾. Esta singularidad proporciona a estas NP's dos dominios diferenciados: una superficie externa y otra interior en los poros (Figura 2). Las posibilidades que abren estas propiedades las hacen idóneas para ser utilizadas en un amplio campo de aplicaciones que van desde la biotecnología y nanomedicina a la ciencia de los materiales. Las principales características de las NP's de sílice mesoporosa son:

- Elevada área superficial (>1000 m²·g⁻¹) que permite almacenar una gran cantidad de carga (35%).
- Elevado volumen de poro (>1 cm³·g⁻¹), gran porosidad y elevado orden del poro.
- Tamaño de poro modificable con una estrecha distribución (2-10 nm).
- Buena estabilidad química y térmica.
- No tóxicas y biocompatibles con el organismo humano.
- Dos superficies funcionalizables (interna y externa)
- Fácilmente modificables morfológicamente (control en tamaño, poro y forma).
- Fácilmente sintetizables.
- Mesoestructura estable.

Tabla 1: Principales tipos de nanopartículas y sus aplicaciones

Nanopartículas orgánicas	Nanopartículas poliméricas	Utilizadas en aplicaciones médicas. No obstante, presentan una biodistribución no específica y una baja capacidad de carga.
	Dendrímeros	Macromoléculas definidas, que presentan una estructura altamente ramificada formada por un núcleo y múltiples ramas. Su estructura molecular les permite cargar diferentes agentes activos.
	Liposomas	Nanosistemas esféricos formados por una bicapa lipídica que permiten la encapsulación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. A pesar de estar ampliamente estudiados, una de sus principales desventajas es su rápida eliminación.
	Micelas	Agregados coloidales de moléculas anfifílicas. Las micelas están formadas por una parte interna hidrofóbica y una externa hidrofílica que permite la internalización de fármacos de carácter apolar para su vehiculización.
Nanopartículas inorgánicas	Nanopartículas de sílice	Las nanopartículas de sílice son inertes, biodegradables y presentan una buena biodistribución. Son fácilmente sintetizables y se pueden obtener de distinta forma y tamaño.
	Nanopartículas de oro	Nanopartículas metálicas que presentan unas propiedades ópticas y electrónicas que dependen totalmente de su forma y tamaño. No presentan toxicidad intrínseca. Además son fácilmente funcionalizables mediante la formación de puentes Au-SR.
	Nanopartículas de óxido de hierro	Nanopartículas de óxido de hierro, típicamente de magnetita (Fe ₃ O ₄), biocompatibles y fácilmente biodegradables. Tienen gran potencial en biomedicina dada su capacidad intrínseca de ser monitorizadas <i>in vivo</i> por técnicas de resonancia magnética nuclear.
	Quantum dots (QD)	Nanopartículas activas que se utilizan generalmente como sondas para imagen, ya que presentan elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia, elevada fotoestabilidad y una emisión fluorescente que puede ser variable mediante el tamaño. Sin embargo, los QD no son biodegradables ni biocompatibles con el organismo, lo que restringe bastante su uso en aplicaciones médicas.
	Nanotubos de carbono	Monocapas de grafeno enrolladas en forma de cilindros. Presentan una elevada superficie específica que permite anclar una amplia variedad de moléculas terapéuticas.

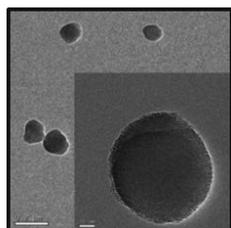


Figura 2: Representación esquemática de una MNP y micrografía de MNP realizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Su elevada superficie y gran volumen de poro permite una elevada carga de componentes, tales como fármacos, sensores o proteínas, los cuales dotarán de funcionalidad los soportes inorgánicos. Por otra parte, las moléculas huésped en el interior de los poros estarán protegidas de una posible degradación en ambientes hostiles, como son el estómago y los intestinos, en el caso de aplicaciones biológicas⁽⁶⁾.

3. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE SÍLICE

La preparación de MNP's fue comunicada por primera vez por científicos de la Mobil Company en 1992 en el marco de un proyecto de la compañía para encontrar materiales con poros de mayor tamaño que el que presentan las zeolitas. Es por ello que este tipo de nanopartículas son conocidas como MCM (Mobil Composition of Matter) y más en concreto como MCM-41⁽⁹⁾. Su metodología de síntesis se basa en la condensación de precursores de sílice (silicato sódico, tetraetilortosilicato o silicato de tetrametilamonio) en presencia de surfactantes catiónicos en condiciones básicas. Se trata de una adaptación del método descrito por Stöber en 1968 para la obtención de nanopartículas de sílice⁽¹⁰⁾, pero con la diferencia de que se le incorpora un tensioactivo catiónico. Se combina así el proceso de sol-gel, una técnica muy utilizada para preparar vidrios inorgánicos, con surfactantes catiónicos que permiten la obtención de estructuras ordenadas y monodispersas mediante la formación típica de micelas, que actuarán a modo de molde o plantilla y darán origen a la formación de poros^(11,12). El procedimiento estándar consiste en mezclar un precursor de silicato, generalmente tetraetilortosilicato (TEOS), con un surfactante catiónico, siendo el más utilizado el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C en medio básico (pH = 11). Las nanopartículas se forman mediante el proceso de sol-gel catalizado en medio básico, según dos reacciones clave, hidrólisis y condensación⁽¹³⁾ (Esquema 1). La primera etapa del proceso consiste en la hidrólisis del alcóxido. En esta etapa se obtiene una suspensión coloidal que contiene partículas de tamaño inferior a 100 nm a la vez que se forman grupos silanol (Si-OH) y se libera el alcohol correspondiente⁽¹⁴⁾. A continuación los grupos silanol polimerizan por condensación, formando estructu-

ras tridimensionales unidas por enlaces siloxano (Si-O-Si) con eliminación de agua y alcohol concomitante. En esta segunda etapa de condensación se forma un gel, más o menos compacto y denso^(11,12). La presencia en esta fase de micelas, formadas por el surfactante es crítica ya que actúan a modo de molde y darán origen a la formación de los poros. En efecto, el surfactante catiónico atrae las cargas negativas de las especies de sílice, las cuales se concentran alrededor de las micelas formando una estructura de sílice tubular. La nanopartícula va aumentando de tamaño hasta que la carga neta negativa, que introducen las especies de sílice, es tan elevada que ésta deja de crecer. Hay que señalar que el tamaño, la forma y la regularidad de las nanopartículas dependen de diversas variables como son la temperatura, la velocidad de adición, la agitación y la cantidad de catalizador utilizado respecto a la de TEOS⁽¹⁵⁾. De todos estos factores se ha determinado que el que más afecta al tamaño de la MNP es la proporción de base respecto a la cantidad de TEOS, seguido de la temperatura⁽¹⁶⁾. La formación de las MNP's puede seguirse visualmente ya que a medida que avanza la polimerización aumenta la turbidez de la suspensión de MNP's como consecuencia del crecimiento de éstas. Alternativamente, también puede seguirse la evolución de las NP's a través de la dispersión que sufre un haz de luz al atravesar la disolución coloidal (efecto Tyndall) (Figura 3).

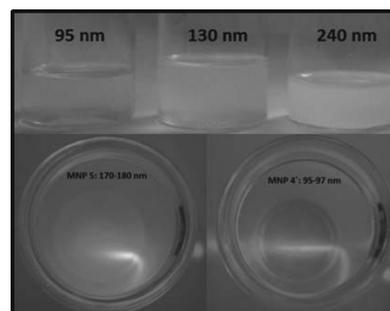
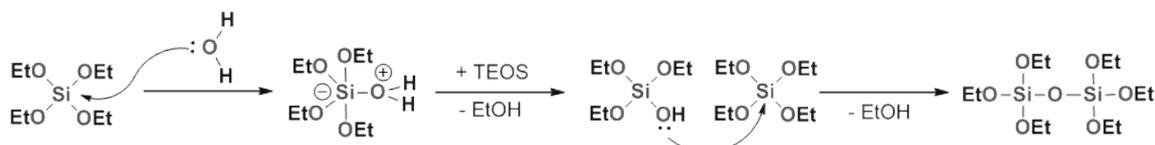


Figura 3: Turbidez y efecto Tyndall en soluciones coloidales de MNP's en función del tamaño de partícula

Finalmente, se debe liberar el surfactante del interior de los poros. Para ello se pueden seguir tres métodos: reflujó en alcohol acidulado con ácido clorhídrico, un tratamiento con nitrato amónico o mediante calcinación. Éstos tratamientos permiten la rotura de la interacción electroestática que existe entre los grupos de la cabeza del surfactante catiónico y los silicatos aniónicos, lo que facilita la eliminación del surfactante en los mesoporos y la formación final de las nanopartículas mesoporosas (Figura 4). Para aplicaciones biomédicas, las MNP's deben presentar un tamaño uniforme que esté comprendido, idealmente, entre 50-100 nm ya que por debajo de este rango las nanopartículas resultan ser algo citotóxicas y difíciles de obtener, mientras que por encima se trata de nanopartículas demasiado grandes que o bien no podrían ser inyectadas o serían fácilmente eliminadas del organismo^(16b, 16c, 17).



Esquema 1: Mecanismo de polimerización del TEOS

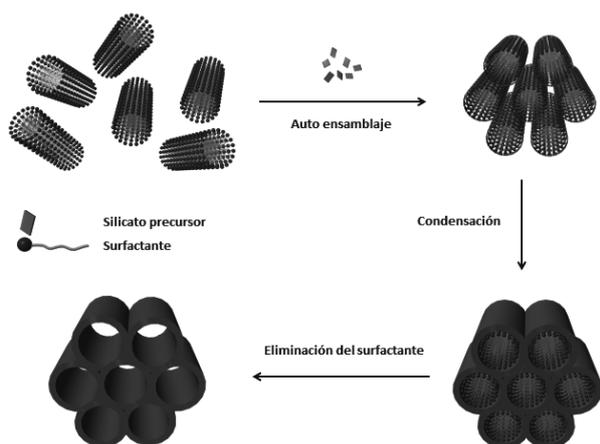


Figura 4: Fases para la preparación de MNP's

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MNP'S

La caracterización de MNP's requiere determinar el tamaño, tanto de la NP como de los poros y su morfología general⁽¹⁸⁾. Los métodos más utilizados para caracterizar NP's son: dispersión de luz dinámica (DLS), isothermas de adsorción y desorción de N₂ (BET, BJH), difracción de rayos X de ángulo pequeño (XRD) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las técnicas del DLS y de TEM permiten determinar el tamaño global de las nanopartículas, mientras que las técnicas de BET, BJH y de XRD se utilizan para caracterizar los poros. A continuación se van a describir brevemente dichas técnicas de caracterización.

4.1 TAMAÑO DE LAS MNP'S: DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) permite relacionar el desplazamiento aleatorio de las partículas con el diámetro hidrodinámico de éstas. Este diámetro dependerá de la fuerza iónica del medio, de la concentración de la disolución, de la temperatura y de su índice de refracción. En medios de elevada fuerza iónica el tamaño obtenido es menor al real de la MNP, mientras que en medios de baja fuerza iónica se obtienen valores del diámetro de partícula mayores. Si además las nanopartículas presentan una capa de moléculas que recubren su superficie, la velocidad de difusión global se ralentiza y el radio hidrodinámico tampoco corresponderá con el tamaño real de la partícula, obteniéndose un valor superior (Figura 5)⁽¹⁹⁾.

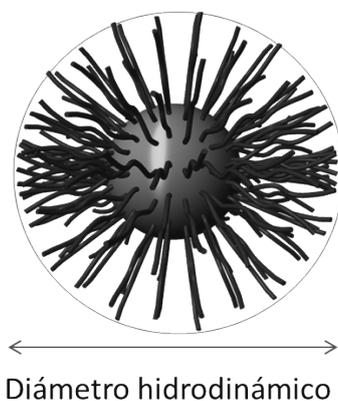


Figura 5: Diámetro hidrodinámico de una NP funcionalizada en su superficie.

Esta técnica permite estimar el tamaño de las nanopartículas tomándolas como un conjunto. De hecho, el valor obtenido es un promedio de toda la muestra, lo que permite estimar su polidispersidad. La obtención de una distribución estrecha se corresponde a una muestra homogénea, mientras que la obtención de varios picos significa la existencia de diversas poblaciones de NP's de distinto tamaño (Figura 6).

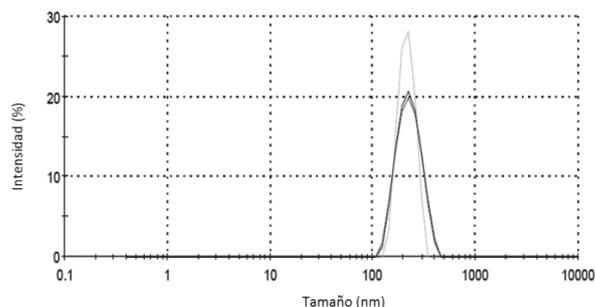


Figura 6: Distribución de tamaños medida por DLS

Generalmente, los mismos equipos de DLS incorporan un sistema de medida del potencial zeta (Figura 7). Este potencial está relacionado con la carga superficial de las nanopartículas y es muy útil para evaluar la estabilidad y el grado de agregación de las NP's. Así, si se obtiene un elevado valor absoluto de potencial zeta, las nanopartículas tenderán a repelerse entre sí y no flocularán. Sin embargo, si las nanopartículas presentan unos bajos valores de potencial zeta éstas acabarán floculando ya que no existe ninguna fuerza que lo impida. En general, la línea divisoria entre suspensiones estables e inestables se establece en el rango de +30 mV o -30mV. Por otra parte, un potencial positivo es altamente recomendable para favorecer la internalización de las nanopartículas en membranas celulares para aplicaciones biológicas.

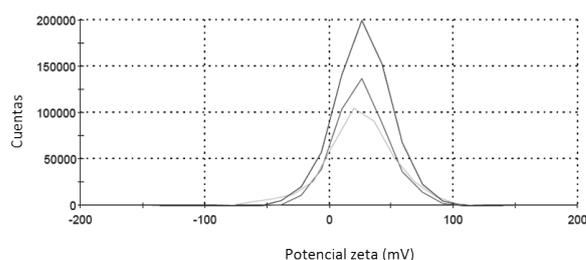


Figura 7: Distribución de potencial-Z de una muestra de MNP's

4.2 SUPERFICIE ESPECÍFICA Y POROSIDAD: MÉTODOS DE BET Y BJT

Un parámetro fundamental en la caracterización de sólidos porosos es su superficie específica⁽²⁰⁾. Este valor puede estimarse utilizando el método de Brunauer, Emmett y Teller (BET) basado en la capacidad de los sólidos en absorber gases en su superficie que viene gobernada por la siguiente ecuación [Eq.1]:

$$\frac{1}{V \left(\frac{p_0}{p} - 1 \right)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C-1)}{V_m C} \left(\frac{p}{p_0} \right) \quad [Eq.1]$$

Dónde

V volumen de un gas (típicamente N₂) adsorbido a la presión p;

- V_m volumen requerido para cubrir la superficie del adsorbente con una capa monomolecular de adsorbato;
- p presión de equilibrio;
- p_o presión de saturación del adsorbato líquido utilizado;
- C constante de BET;

De la representación gráfica de los datos experimentales sobre un gráfico $1/V[(p_o/p)-1]$ frente a (p/p_o) se obtiene una curva que es lineal en el intervalo $0,05 < (p/p_o) < 0,35$ de la cual pueden extraerse V_m y C . De estos valores se calcula la superficie específica S_{BET} a partir de la fórmula [Eq. 2]:

$$S_{BET} = \frac{(V_m N s)}{V \alpha} \quad [Eq. 2]$$

Dónde

- V_m volumen requerido para cubrir la superficie del adsorbente con una capa monomolecular de adsorbato;
- N número de Avogadro;
- s superficie de una moléculas de adsorbato;
- V volumen molar del adsorbato;
- α masa del adsorbente.

Suponiendo que las partículas son esféricas y que presentan una distribución de tamaño estrecha, el área superficial específica proporciona un diámetro medio de la NP denominado diámetro de BET.

La caracterización de los poros se efectúa mediante el método propuesto por Barret, Joyner y Halenda (BJH)⁽²¹⁾ para el cálculo del diámetro y volumen de los poros. Estos parámetros se pueden determinar a partir de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno utilizando la ecuación de Kelvin [Eq. 3] para poros cilíndricos:

$$\ln\left(\frac{p}{p_o}\right) = -2 \frac{\sigma V_m}{r RT} \quad [Eq. 3]$$

Dónde

- V_m volumen molar del adsorbato líquido;
- σ tensión superficial del adsorbato líquido;
- r radio de Kelvin;

La medida del volumen de los poros ofrece, indirectamente, una estimación del grado de funcionalización que se ha dado en la superficie de los poros, por comparación entre el volumen de los poros de las MNP's funcionalizadas y sin funcionalizar.

4.3 ESTRUCTURA MESOPOROSA: DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

La difracción de rayos X de ángulo pequeño (XRD) es una técnica no-destruktiva que permite estudiar la estructura interna mesoporosa de las MNP's. Los difractogramas dan información sobre la periodicidad y el orden interno de las nanopartículas porosas^(20, 22). Esta técnica resulta especialmente útil para verificar la integridad de la estructura mesoporosa de las MNP's después de efectuar manipulaciones químicas sobre ellas que pueden erosionar su estructura.

4.4 MORFOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS: MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) permite visualizar directamente la estructura y tamaño de una nanopartícula en concreto o de un conjunto de ellas. De forma visual es posible determinar si la muestra es morfológicamente homogénea. En el caso particular de las MNP's permite la observación de los poros y su periodicidad. Así,

cuando la nanopartícula se encuentra perpendicular al plano de visualización se observan los poros como líneas o canales (Figura 8a), mientras que si las nanopartículas se encuentran en el mismo plano de visualización lo que se observa son círculos periódicos (Figura 8b).

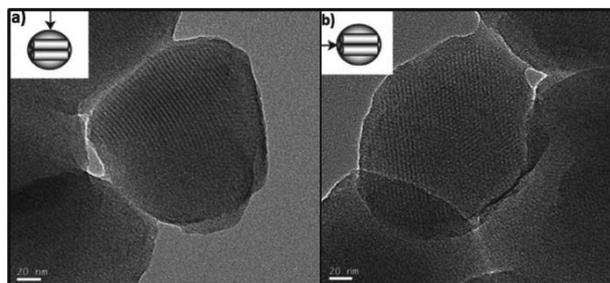


Figura 8: Micrografía de MNP's realizada mediante TEM de alta resolución: a) plano perpendicular al de visualización b) mismo plano

Además de poder observar la morfología y periodicidad de los poros en las nanopartículas, la técnica TEM también permite obtener el valor del diámetro de éstos a través de la transformada de Fourier (Figura 9).

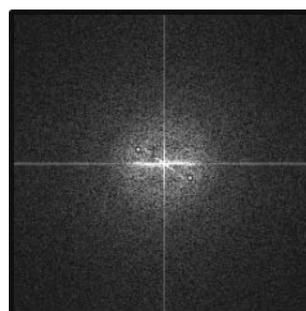


Figura 9: Transformada de Fourier realizada mediante TEM sobre una muestra de MNP's proporcionando un diámetro medio de poro de 4 nm.

Además, algunos modelos de microscopios también permiten realizar el análisis elemental de la muestra, lo cual permite obtener información sobre la composición y funcionalización de las NP's.

5. DECORACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE MNP'S

Las MNP's presentan tres posibles dominios de funcionalización: la superficie de la NP, la parte interna de los mesoporos y la matriz de sílice de la NP. Existen entonces, tres estrategias de funcionalización que permiten incorporar cualquier agente activo en una MNP, mediante oclusión, injerto, o co-condensación^(23,10).

5.1 OCLUSIÓN

La oclusión se utiliza generalmente con moléculas fluorescentes, a modo de sondas, o agentes de contraste que permiten la localización y seguimiento de los nanovehículos en el organismo^(24,25). En este tipo de funcionalización, el agente activo se encuentra disperso en la matriz polimérica sin estar unido covalentemente^(7,26). La oclusión de un agente en el interior de la matriz de la NP permite su protección contra factores externos, minimizándose así su degradación (Figura 10).

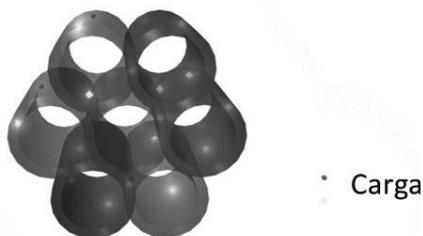


Figura 10: Anclaje en la matriz de la nanopartícula

5.2 MÉTODO DEL INJERTO

El injerto (“grafting”) es un método post-sintético que permite modificar la superficie de la NP e incorporar grupos funcionales por silanización⁽²⁷⁾. En este procedimiento los grupos silanol superficiales (Si-OH), que pueden estar presentes en elevada concentración, actúan como puntos de anclaje por tratamiento con un siloxano funcionalizado con el grupo deseado. La silanización transcurre ya sea a través de grupos libres de (= Si-OH) o de grupos silanol geminales (=Si(OH)₂).

5.3 MÉTODO DE CO-CONDENSACIÓN

El método de co-condensación se basa fundamentalmente en el proceso de sol-gel⁽²⁸⁾. La diferencia estriba en la adición de un siloxano funcionalizado junto con el precursor de sílice (TEOS). En comparación con el método de post-injerto en el que la distribución de los grupos funcionales tiende a ser heterogénea, el método de co-condensación es capaz de distribuir homogéneamente grupos orgánicos en la superficie interna de los poros. Otra ventaja del método de co-condensación sobre el método del injerto es que se puede controlar más fácilmente la morfología de las MNP's (Figura 11).

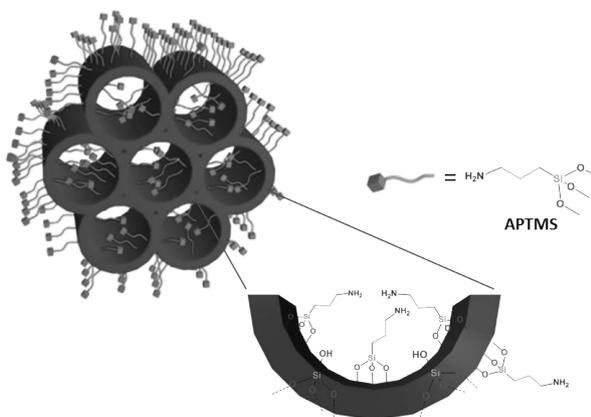


Figura 11: Co-condensación de una MNP con aminopropiltrimetilsiloxano (APTMS)

En cualquier caso, cada uno de los dos métodos de funcionalización tiene ciertas ventajas. Si lo que se desea es la funcionalización directa de la superficie en un solo paso de síntesis el método de grafting parece el más adecuado. Sin embargo, si se desea la obtención de una superficie homogénea y uniforme el método de co-condensación resulta más práctico.

5.4 FUNCIONALIZACIÓN REGIOSELECTIVA

Existe la posibilidad de funcionalizar las MNP's de forma regioselectiva y discriminar entre la superficie externa de las nanopartículas y sus poros. Esta regioselectividad se

puede alcanzar, simplemente, eliminando el tensioactivo y, posteriormente, aplicando el método del injerto tratando con un silano (p.ej. APTMS). La superficie externa de la NP, más accesible al reactivo, se funcionalizará preferentemente respecto a la interior. Un método alternativo, quizás más eficiente, es silanizar la MNP en dos fases con y sin surfactante (Figura 12).

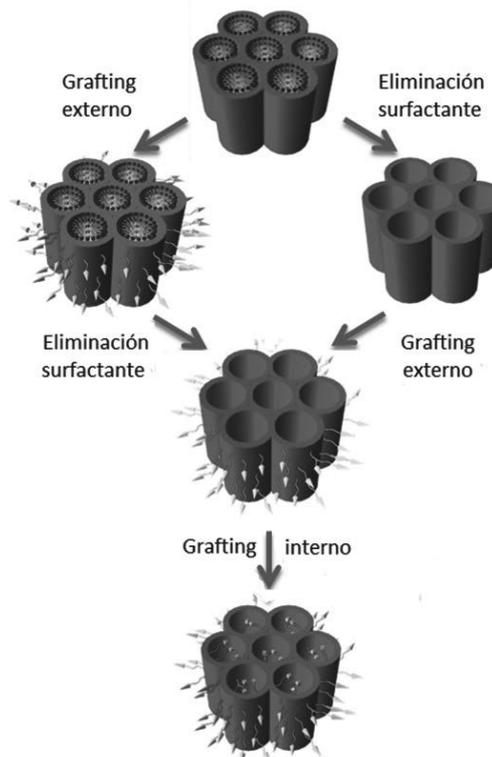


Figura 12: Método selectivo para funcionalizar las dos superficies de las MNP's

5.5 POSTFUNCIONALIZACIÓN

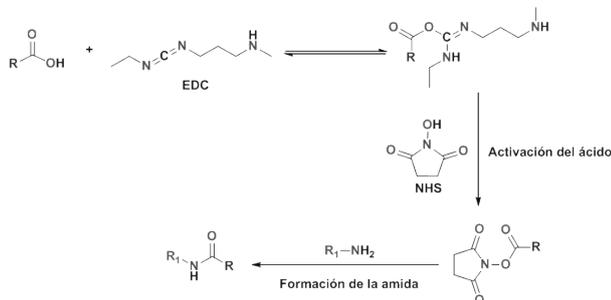
Con el fin de conferir mayor complejidad a las MNP's y preparar materiales funcionales se han descrito protocolos de post-funcionalización que permiten incorporar a la NP prácticamente cualquier grupo funcional, macromolécula e incluso otras NP's. Básicamente, estos protocolos se pueden dividir en dos tipos: los que implican la formación de enlaces covalentes con la MNP's y los basados en interacciones de carácter electrostático.

5.5.1 FORMACIÓN DE ENLACES COVALENTES CON MNP's

Una vez la MNP ha sido funcionalizada mediante injerto o co-condensación es posible utilizar las diversas técnicas desarrolladas en bioconjugación con el fin de decorar la MNP con moléculas o biomoléculas de interés⁽²⁹⁾. A continuación, se describen algunas de las estrategias de acoplamiento más interesantes en el campo de las nanopartículas: formación de amidas, tioureas y cicloadición de Huisgen.

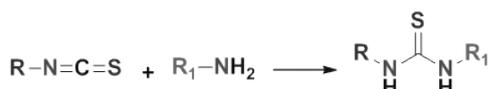
Normalmente para la formación de amidas se requiere la participación de un reactivo activador del ácido. Un protocolo muy utilizado se conoce como reacción de Steglich o método de la carbodiimida. Para ello el ácido carboxílico

se activa mediante la formación del éster de la *N*-hidroxi-succinimida correspondiente. Esta activación se realiza en presencia de un agente de acoplamiento como la 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Finalmente la amina reacciona con el éster activado para proporcionar la amida con excelentes rendimientos (>90%) (Esquema 2).



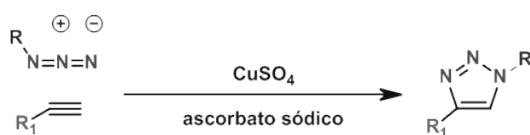
Esquema 2: Formación de una amida

Alternativamente es posible utilizar la gran reactividad y selectividad del grupo isotiocianato frente a aminas primarias para formar tioureas⁽³⁰⁾. Este protocolo es ampliamente utilizado en bioquímica para el acoplamiento de proteínas y conjugación de anticuerpos. La reacción es prácticamente cuantitativa y se pueden utilizar DMSO o EtOH como disolventes (Esquema 3).



Esquema 3: Formación de una tiourea

Otra ruta muy común en bioconjugación es la cicloadición alquino-azida catalizada por Cu(I), basada en el concepto de química click o también conocida como "CuAAC"⁽³¹⁻³³⁾. Este tipo de química implica la cicloadición de un alquino y una azida para formar un anillo de 1,2,3-triazol, que sirve como un fuerte nexo entre la nanopartícula y el agente biofuncional (esquema 4).



Esquema 4: Reacción de formación de 1,3-triazoles

Este proceso ha demostrado ser altamente versátil y adecuado para la conjugación de una variedad de especies, desde moléculas pequeñas hasta proteínas⁽³⁴⁾.

5.5.2 INTERACCIÓN ELECTROESTÁTICA

La elaboración de sistemas complejos que doten de funcionalidad a las NP's puede beneficiarse de la aplicación de conceptos de la química supramolecular. En particular de todo tipo de interacciones débiles (puentes de hidrógeno, formación de complejos metálicos y pares iónicos entre otras) y asociaciones entre macromoléculas (polímeros y biomoléculas). Un ejemplo relevante de aplicación biológica es el recubrimiento de MNP's cargadas positivamente en su superficie con aminas cuaternizadas y recubiertas con cadenas de ADN aniónicas⁽³⁵⁻³⁷⁾.

6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS

Con el fin de estudiar y analizar la presencia de grupos funcionales en la superficie de las NP's se dispone de diversas técnicas que no difieren de los métodos comunes del laboratorio: espectroscopía de absorción y fluorescencia, espectroscopía de infrarrojo (IR), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental orgánico (AE) y resonancia magnética en fase sólida.

6.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA

Los espectros de absorción y fluorescencia son una buena opción para confirmar rápidamente la funcionalización de las nanopartículas, a partir de su suspensión en un disolvente adecuado⁽³⁸⁾. Estas técnicas son especialmente indicadas para el estudio de sistemas que incorporan sensores fluorescentes o colorantes. En la Figura 13, se muestra como ejemplo el espectro de absorción de MNP's funcionalizadas con isocianato de fluoresceína (FITC).

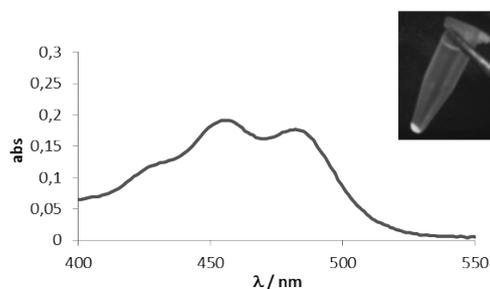


Figura 13: Espectro de absorción de MNP's funcionalizadas con FITC (EtOH)

6.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAROJO (IR)

La utilización de la espectroscopía de IR está muy indicada para el estudio de MNP's funcionalizadas dado que permite reconocer fácilmente y de forma no destructiva⁽³⁹⁾ la presencia de carbonilos, tioureas, azidas, aminas, ésteres o ácidos. Como ejemplo, en la Figura 14 se muestra el espectro de IR de nanopartículas funcionalizadas con aminas primarias. A continuación las NP's se tratan con isocianato de fluoresceína (FITC) para generar el conjugado correspondiente. Si se comparan los espectros de IR de las NP's funcionalizadas (Figura 14 b) con el de las mismas NP's sin funcionalizar (Figura 14 a), se puede observar la aparición de toda una serie de bandas entre 1600 cm⁻¹ y 1200 cm⁻¹ que corresponden a la tensión de la lactona (1575 cm⁻¹) y al aumento de las flexiones C-H alrededor de 1400 cm⁻¹.

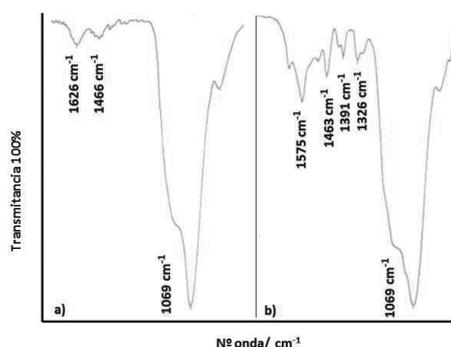


Figura 14: IR MNP's sin funcionalizar a) y funcionalizadas con FITC b)

6.3 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA) y ANÁLISIS ELEMENTAL (AE)

La termogravimetría es una técnica destructiva de análisis que consiste en monitorizar los cambios de peso de una muestra en función de la temperatura y el tipo de atmósfera (oxidante, reductora). En particular, los estudios de TGA sobre MNP's permiten determinar su contenido en materia orgánica y estimar su grado de funcionalización⁽²¹⁾. A modo de ejemplo, en la Figura 15 se muestra el TGA de una muestra de nanopartículas no funcionalizadas que se comparan con unas nanopartículas funcionalizadas con grupos amino por co-condensación con APTES (aminopropiltriethylsilano). Así, como se puede observar en la Figura 15a), se produce una primera pérdida de masa que corresponde a la pérdida de agua. En cambio las nanopartículas funcionalizadas con grupos amino además de la pérdida de agua, presentan otra pérdida importante de masa entre 300 °C y 550 °C. Comparando la cantidad de materia orgánica que se encuentra presente en las MNP's sin funcionalizar y funcionalizadas se estima que el porcentaje de carga de materia orgánica proveniente del APTES es del 17%. Es decir, hay alrededor de $2,8 \cdot 10^{-7}$ mol de grupos amino por miligramo de MNP's.

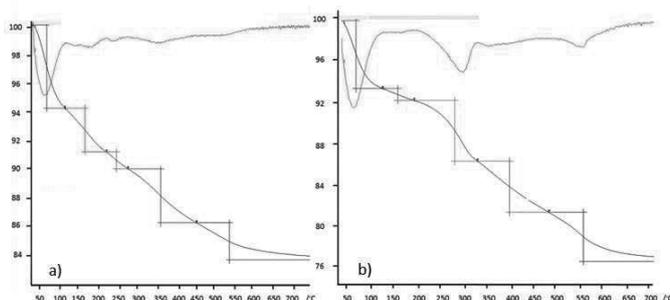


Figura 15: TGA de MNP's sin grupos APTES a) y con APTES b)

También es posible realizar un estudio análogo, aunque no tan preciso, de las MNP's funcionalizadas utilizando el análisis elemental por combustión (AE). En efecto, esta técnica permite estimar la presencia de la fracción orgánica por comparación del porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las MNP's sin funcionalizar con el de las funcionalizadas. En el ejemplo de la Tabla 2, se comparan MNP's sin funcionalizar, con MNP's funcionalizadas por co-condensación con APTES. En este caso se puede observar que se ha introducido un 1,9 %, de nitrógeno y la fracción orgánica ha aumentado aproximadamente el doble. Además se puede calcular que cada miligramo de MNP's equivale aproximadamente a $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol de grupos amino.

Tabla 2: AE MNP's y MNP's-(CH₂)₃NH₂

Peso / mg	C / %	H / %	N / %
MNP's			
1,090	3,36	1,33	--
1,006	3,24	1,26	--
MNP's-(CH₂)₃NH₂			
1,127	6,39	2,08	1,9
1,068	6,17	2,04	1,9

6.4 RESONANCIA MAGNÉTICA EN ESTADO SÓLIDO (RMN-MAS)

A diferencia de lo que ocurre con las muestras en disolución, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de muestras sólidas no está tan extendida. La razón proviene del gran ensanchamiento de las señales del espectro debido a las interacciones dipolo-dipolo entre los momentos magnéticos de los núcleos vecinos que caracteriza los espectros de sólidos. Una técnica comúnmente empleada, que minimiza estas interacciones y reduce la anchura de las señales, consiste en la rotación de la muestra con un ángulo de 54,44° con respecto a la dirección del campo magnético. Ésta técnica se conoce como RMN de rotación en ángulo mágico (RMN-MAS, Magic Angle Spinning). El desarrollo de ésta y otras técnicas han permitido el uso del RMN en estado sólido para el estudio estructural de sustancias poco solubles, como algunos polímeros, vidrios, cerámicas y resinas, entre otros, siendo una buena alternativa para materiales de baja cristalinidad que no pueden ser estudiados por técnicas de difracción⁽⁴⁰⁾. La aplicación de la técnica de RMN-MAS a MNP's permite observar los protones provenientes tanto de la superficie externa como de la interna. Así en el caso de MNP's funcionalizadas con grupos APTES es posible observar los tres grupos metileno acoplados entre sí. Esta técnica también permite conocer la existencia de algún tipo de interacción entre las moléculas y la sílice o incluso que tipo de conformación puede ser la más probable en función del tipo de interacciones de los protones con el medio⁽⁴¹⁾.

7. APLICACIONES DE MNP'S EN BIOMEDICINA: NANOPLATAFORMAS TERANÓSTICAS

Aunque las MNP's se desarrollaron inicialmente para catálisis, rápidamente se descubrió su potencial para otras muchas aplicaciones tales como sondas de imagen, sensores, materiales ópticos, fotocatalisis, pilas de combustible, sistemas eléctricos y sobretodo en el ámbito de la investigación médica. Es precisamente en este campo en el que los científicos han mostrado un mayor interés por las MNP's como materiales biotecnológicos^(4, 42) debido a su elevado potencial para albergar diferentes moléculas huéspedes gracias a su elevada superficie específica y particular geometría. Estas características y su baja toxicidad hacen de las MNP's prometedores vehículos útiles para la liberación de fármacos (Controlled Drug Release)⁽⁴³⁾. Estos vehículos se conciben como nanoplataformas capaces de desempeñar una doble función de diagnóstico y terapia al mismo tiempo, lo que hoy en día se conoce bajo el concepto de "teranóstica"⁽⁴⁴⁾ (derivado de terapia y diagnosis) (Figura 16).

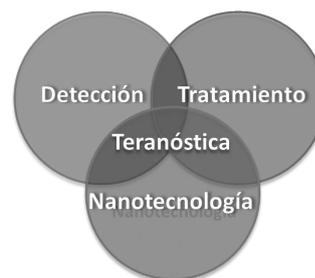


Figura 16: Concepto de Teranóstica

Por tanto se desea diseñar NP's con capacidad para **detectar, visualizar y tratar**⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Para dotar de todas estas funciones a las NP's es preciso funcionalizarlas y conjuagarlas con los agentes activos necesarios (Tabla 3).

Tabla 3: Agentes activos utilizados para funcionalizar MNP's

Molécula	Propiedades
Fármaco	Tratamiento enfermedades
Anticuerpos	Selectividad del transporte
ADN/SIRNA	Transducción genética
Fotosensibilizadores	Terapia fotodinámica (PDT)
Proteínas	Centro activo, selectividad
Polímeros catiónicos	Cruzar membranas
Polímeros biodegradables	Biodistribución y estabilidad
Agentes de contraste	Imagen por Resonancia Magnética (IRM)
Fluoróforo	Localización y reconocimiento
Sensor de iones o pH	Sensor, diagnóstico
Fosfolípidos	Encapsulación moléculas

El modelo típico de estas nanoplataformas (Figura 17) consiste en incorporar un fármaco en el interior de la MNP de forma reversible y decorar la superficie con elementos que mejoren su biodisponibilidad (polietilenglicol (PEG)⁽⁴⁸⁻⁵²⁾ y polímeros catiónicos para cruzar membranas citoplasmáticas⁽⁵³⁾), aumenten su selectividad (anticuerpos que permiten una gran selectividad hacia la zona afectada^(16,17,54)) y localicen la NP (agentes de contraste,^(30,31) moléculas fluorescentes o nanocristales paramagnéticos⁽²⁴⁾). Adicionalmente, la incorporación de receptores de aniones y cationes ofrece información sobre la composición del entorno químico ya sea el pH del medio (niveles bajos asociados a células con un elevado metabolismo como las células tumorales) o la presencia de ciertos aniones o cationes⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾.

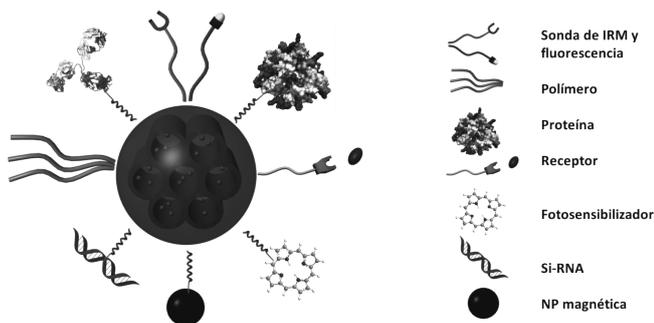


Figura 17: Ejemplo de una nanoplataforma

Otra modalidad de nanovehículo descrito en la literatura consiste en MNP's recubiertas por cadenas de SiRNA unidas a la superficie de la nanopartícula por interacciones iónicas. Una vez la MNP se ha internalizado, la nanoplataforma se disocia liberando el SiRNA. Esta tecnología se ha utilizado en la transfección celular⁽²⁶⁾.

7.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FARMACOS

Un importante requisito para el diseño de sistemas de liberación de fármacos es que presenten una eficiente habilidad para transportar la carga a la región adecuada y liberarla dosificadamente. En este contexto, las MNP's se presentan como una buena alternativa a los vehículos ac-

tuales⁽⁶⁰⁾ (p.ej. liposomas y polímeros biodegradables) ya que es posible incorporar elevadas cantidades de carga en sus mesoporos y a continuación bloquear reversiblemente su salida, permitiendo un transporte selectivo y una liberación eficaz (Figura 18).

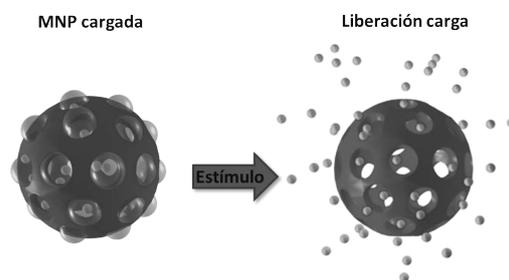


Figura 18: Liberación de carga controlada

Para conseguir este objetivo es necesario diseñar nanopuertas inteligentes que se abran como respuesta a un estímulo^(4,42,61). Principalmente, se han utilizado dos tipos de estímulos^(62,63): los estímulos internos como cambios de pH, medios reductores y actividad enzimática, que dependen de la homeostasis de la célula, y los estímulos externos como son la luz, los ultrasonidos o los campos magnéticos, que pueden aplicarse según se desee. Además, los estímulos externos tienen la ventaja que pueden controlarse en tiempo y localización (Tabla 4).

Tabla 4: Tipo de nanopuertas que se pueden utilizar

Nanopuertas sensibles a:	Mediante
pH	Enlaces lábiles (hidracinas, ésteres, tioles)
Temperatura	Polímeros termosensibles
Reacciones redox	Puentes disulfuro
Luz	Isómeros <i>cis-trans</i>
Campos magnéticos	Aplicación de un campo magnético sobre nanopartículas metálicas
Enzimas	Glucosa, enlace biotina-avidina, enlace glicosídico, interacción con aptámeros

A continuación se describen tres sistemas de apertura de las nanopuertas: apertura mediante un grupo bloqueador, apertura mediante polímero y apertura mediante válvulas^(64,65).

7.1.1 APERTURA POR ELIMINACIÓN DE UN GRUPO BLOQUEANTE

Se trata de anclar un grupo bloqueador en los poros de la MNP mediante un enlace reactivo capaz de escindirse o sufrir isomerización a través de un estímulo, liberándose así la carga contenida (Figura 19). Este tipo de control mecánico se basaría en enlaces covalentes (por ejemplo, tioéteres que son escindidos en medios reductores o amidas degradables por enzimas específicas⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾), grupos voluminosos (por ejemplo, NP's de Au o nanocristales de CdS) o moléculas fotoisomerizables, como los azobencenos⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾.

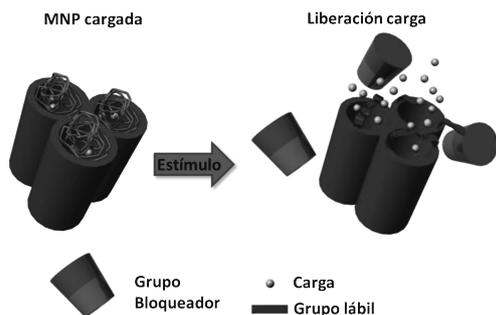


Figura 19: Liberación de carga mediante un grupo bloqueador

7.1.2 APERTURA MEDIANTE POLÍMEROS

Los polímeros se han utilizado como controles mecánicos ya sea mediante absorción o unión covalente a la superficie de las MNP's. Su mecanismo de acción se basa en envolver fuertemente la superficie externa de las nanopartículas taponando la salida de los poros^(62,70,71). A través de diferentes estímulos, los polímeros pueden inflarse, enrollarse o eliminarse lo que permite la apertura de los poros bloqueados y la liberación de la carga (Figura 20).

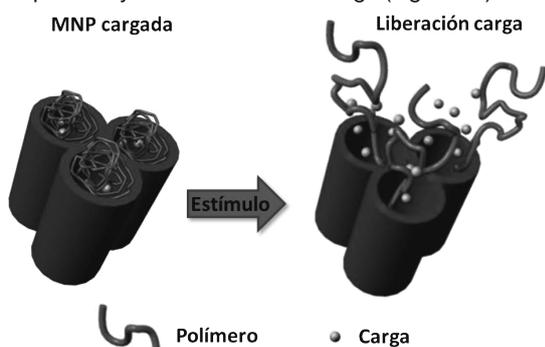


Figura 20: Ejemplo de liberación de carga mediante polímero

7.1.3 APERTURA MEDIANTE VÁLVULAS

El concepto de una nanoválvula supramolecular incluye el uso de una molécula inmovilizada unida covalentemente a la matriz de sílice (eje) junto con una molécula cíclica que actuará a modo de tapón^(62, 72,73). En el estado cerrado, la molécula cíclica se une al eje y este conjunto sirve como barrera de las aperturas de los poros. Por otra parte, la disociación y la retirada de la tapa hace que la válvula este en la posición abierta y se libere la carga del poro (Figura 21).

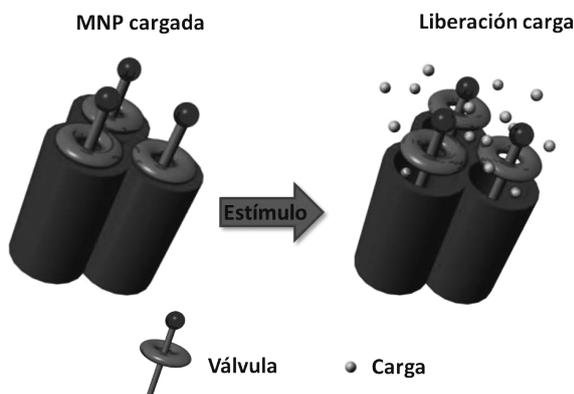


Figura 21: Liberación de carga mediante válvula

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Con el fin de preparar MNP's para su utilización en aplicaciones biomédicas como nanoplataformas, una amplia gama de propiedades, factores y condiciones de carácter físico, químico, biológico y fisiológico deben cumplirse⁽⁷⁴⁾:

- Deben ser biocompatibles y biodegradables
- Deben permitir una elevada carga de agentes activos
- Deben presentar un mecanismo de entrega de la carga específico en el lugar adecuado excluyendo la liberación en células normales y tejidos
- No debe liberarse el fármaco de forma prematura
- Deben presentar un mecanismo de liberación controlado para proporcionar una dosis eficaz

Aunque gran parte de estos requisitos se han alcanzado, desgraciadamente las interacciones que sufren las NP's en el organismo son extraordinariamente complejas, lo que explica, en gran medida, la dificultad del proceso de optimización y evaluación al que deben someterse las nanoplataformas para que estén listas para ser usadas en aplicaciones clínicas. Aun así grandes progresos se han conseguido en poco más de una década (Figura 22).

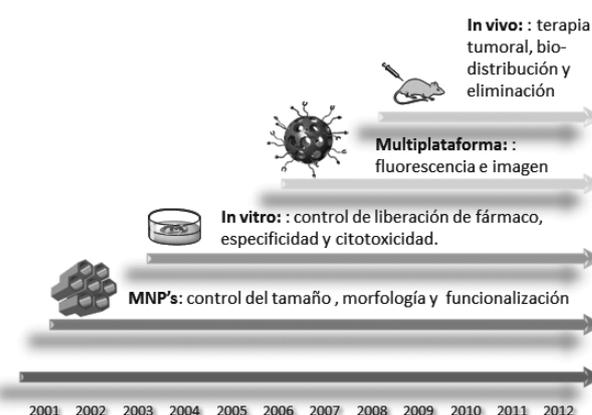


Figura 22: Avance en el estudio de las MNP's

Sin duda, una cuestión fundamental que rodea el uso de las MNP's es su toxicidad. Ésta dependerá siempre de los sustituyentes y agentes activos que se encuentren anclados a las nanopartículas. Por lo que, en cada caso, se deberá estudiar la toxicidad de las nanopartículas funcionalizadas.

Otro aspecto crítico es la tendencia de las NP's a formar agregados. Cualquier agregación que ocurra en el torrente sanguíneo puede obstruir los capilares y resultar en una embolia. En general, el hígado y el bazo son los principales órganos donde se acumulan las MNP's⁽⁷⁵⁾. Se cree que, mayoritariamente, la eliminación de las nanopartículas de sílice ocurre a través de su descomposición en ácido orto silícico y su posterior excreción a través del sistema renal⁽⁶⁾. Se han observado nanopartículas de sílice mesoporosa intactas en la orina pero el proceso de excreción por el cual ocurre todavía no es conocido.

Si las nanopartículas son administradas mediante inyección por vía intravenosa, el tiempo de circulación en sangre y su biodistribución depende principalmente del diámetro efectivo de las nanopartículas y de sus propiedades de superficie. Se sabe que las nanopartículas de gran tamaño, superiores a 100 nm de diámetro, o nanopartículas agregadas son rápidamente absorbidas por el

sistema retículo-endotelial (RES)⁽⁷⁴⁾. Del mismo modo, una adsorción de proteínas no específicas en la superficie externa de las nanopartículas también produce aumento del diámetro efectivo y puede conducir a mismo fenómeno de absorción por el RES. Por lo tanto, resulta muy importante controlar el tamaño y modificar adecuadamente la superficie de las MNP's para superar con éxito los ensayos *in vivo*.

9. CONCLUSIONES

Las MNP's se caracterizan por presentar unas cavidades mesoporosas que permiten alojar y proteger una amplia variedad de moléculas orgánicas, mientras que en la superficie externa se pueden funcionalizar con agentes que mejoren su biodistribución, solubilidad, selectividad y especificidad. Éstos agentes pueden ser adsorbidos o covalentemente enlazados tanto en las paredes interiores de los mesoporos como en su superficie externa. Las MNP's se presentan como unos buenos candidatos para su aplicación clínica como nanoplataformas multifuncionales para el diseño de nanodispositivos capaces de desempeñar una doble función de diagnóstico y terapia (teranóstica). No obstante, todavía hay variables que deben ser estudiadas como su estabilidad y biocompatibilidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.oecd.org/science/nanosafety/37770473.pdf> 17/06/2013
2. Deepak, T., Yashwant, P., Michel, D., *Drugs and the pharmaceutical sciences* vol. 166, *Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An overview*. Chapter 1. *Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview* p.1-32. Edited by Deepak T., Michel D., Yashwant, P. (2007).
3. Mai, W. X., Meng, H.: *Integr. Biol.*, **5**, 19-28 (2013).
4. Vallet-Regí, M.: *ISRN Materials Science*, 1-20, (2012).
5. Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., Farokhzad, O. C.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **83**, 761-769 (2008).
6. Mamaeva, V., Sahlgren, C., Linden, M.: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 689-702, (2013).
7. Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Trewyn, B. G., Lin, V. S. -Y.: *J. Mater. Chem.*, **20**, 7924-7937 (2010).
8. Rosenholm, J. M., Sahlgren, C., Lind M.: *Nanoscale*, **2**, 1870-1883 (2010).
9. Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(27), 10834-10843 (1992).
10. Stöber, W.; Fink, A. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **26**, 62-69 (1968).
11. Ramírez Palma, M. T., Huirache Acuña, R., Espinosa Acosta, G., Hernández Padrón, G.: *Ciencia Ergo Sum*, **17**, 183-188 (2010).
12. Zanella, R.: *Mundo. Nano*, **5**, 69-81 (2012).
13. Wu, S. -H., Mou, C. -Y., Lin, H. -P.: *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 3862-3875 (2013).
14. Tewodros, A.; Tao, Z.: *Chem. Res. Toxicol.*, **25**, 2265-2284 (2012).
15. Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Lin, V. S. -Y.: *Small*, **6**(18), 1952-1967 (2010).
16. a. Chiang, Y. -D., Lian, H. -Y., Leo, S.-Y., Wang, S. -G., Yamauchi, Y., Wu, K. C.-W.: *J. Phys. Chem. C.*, **115**, 13158-1316 (2011). b. Santamaría, J., Yagüe, C., Moroa, M., Grazú, V.: *Chem. Eng. J.*, **137**, 45-53 (2008). c. Lin, Y-S , Haynes C.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 4834-4842 (2010).
17. Park, Y. -H., Bae, H. C., Jang, Y., Jeong, S. H., Lee, H. N., Ryu, W. -I., Yoo, M. G., Kim, Y. -R., Kim, M. -K., Lee, J. K., Jeong, J., Son, S. W.: *Mol. Cell. Toxicol.*: **9**, 67-74 (2013).
18. Scott E. McNeil. Editor "Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery" Editorial Humana Press (2011).
19. Akbari, B.; Tavandashti, M. P., Zandrahimi, M.: *IJM-SE.*, **8**, 48-56 (2011).
20. Mou, C. -Y., Lin, H. -P.: *Pure Appl. Chem.*, **72**(1-2), 137-146 (2000).
21. Chang, B., Chen, D., Wang, Y., Chen, Y., Jiao, Y., Sha, X., Yang, W.: *Chem. Mater.*, **25**, 574-585 (2013).
22. Popat, A., Liu, J., Lua, G. Q., Qiao, S. Z.: *J. Mater. Chem.*, **22**, 11173-11178 (2012).
23. Yulin, H.: "Functionalization of mesoporous silice nanoparticles and their applications in organometallic and organometallic catalysis". *PhD Dissertation*. Iowa State University (2009).
24. Rossi, L. M., Shi, L., Quina, F. H., Rosenzweig, Z.: *Langmuir*, **21**, 4277-4280 (2005).
25. Rossi, L. M., Silva, P. R., Vono, L. L., Baptista, M. S.: *Langmuir*, **24**, 12534-12538 (2008).
26. Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C.-W. Lin, V. S. -Y.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **60**, 1278-1288 (2008).
27. Carniato, F., Tei, L., Cossi, M., Marchese, L., Botta, M.: *Chem. Eur. J.*, **16**, 10727-10734 (2010).
28. Yildirim, A., Ozgurab, E., Bayindir, M.: *J. Mater. Chem. B*, **1**, 1909-1920 (2013).
29. Thanh, N. T. K., Green, L. A. W.: *Nano Today*, **5**, 213-230, (2010).
30. Clarke, O. J., Boyle, R. W.: *Chem. Commun.*, 2231-2232 (1999).
31. Dickschat, A. T., Behrends, F., Bühner, M., Ren, J., Weiß, M., Eckert, H., Studer, A.: *Chem. Eur. J.* **18**, 16689-16697 (2012).
32. Chandran, S. P., Srinivas, S.; Prasad, B. L. V.: *Curr. Sci.*, **95**(9), 1327-1333 (2008).
33. Lia, N., Binder, W. B.: *J. Mater. Chem.*, **21**, 16717 (2011).
34. Thirumurugan, P., Matosiuk, D., Jozwiak, K.: *Chem. Rev.*, doi.org/10.1021/cr200409f (2013).
35. Climent, E., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Soto, J., Maquieira, A., Amorós, P.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 7281 -7283 (2010).
36. He, W. -T., Xue, Y. -N., Peng, N., Liu, W. M., Zhuo, R. -X., Huang, S. -W.: *J. Mater. Chem.*, **21**, 10496-10503 (2011).
37. Ozalp, V. C., Eyidogan, F., Oktem, H. A.: *Pharmaceuticals* **4**, 1137-1157 (2011).
38. Climent, E., Martínez-Máñez, R., Maquieira, A., Sancenón, F., Marcos, M. D., Brun, E. M., Soto, J., Amorós, P.: *Chemistry Open*, **1**, 251 - 259 (2012).
39. Ma, W. -F., Wu, K. -Y., Tang, J., Li, D., Wei, C., Guo, J., Wang, S. -L. Wang, C. -C.: *J. Mater. Chem.*, **22**, 15206-15214 (2012).
40. Trebosc, J., Wiench, J. W., Huh, S., Lin, V. S. -Y., Pruski, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3057-3068 (2005).

41. Nedd, S., Kobayashi, T., Tsai, C.-H., Slowing, I. I., Pruski, M., and Gordon, M. S.: *J. Phys. Chem. C.*, **115**, 16333-16339 (2011).
42. Colilla, M., González, B., Vallet-Regí, M.: *Biomater. Sci.*, **1**, 114-134 (2013).
43. Cotí, K. K., Belowich, M., Liong, M.; Ambrogio, M. W., Lau, Y. A., Khatib, H. A., Zink, J. I., Khashab, N. M., Stoddart, J. F.: *Nanoscale*, **1**, 16-39 (2009).
44. Chen, N. -T., Cheng, S. -H., Souris, J. S., Chen, C. -T., Mou, C. -Y., Lo, L. -W.: *Mater. Chem. B*, **1**, 3128-3135 (2013).
45. Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M.: *Trend. Biotechnol.* **26**(11), 612-621 (2008).
46. Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B.G., Lin, V.S.: *Small*, **6**(18), 1952-1967 (2010).
47. McNeil, S. E.: *J. Leukocyte Biol.* **78**, 585-594 (2005).
48. Tsai, C.-P., Chen, C. -Y., Hung, Y., Chang, F.-H., Mou, C. -Y.: *J. Mater. Chem.*: **19**, 5737-5743 (2009).
49. Tansub, W., Tuitemwong, K., Limsuwan, P., Theparoonrat, S., Tuitemwong, P.: *J. Nanomater.*, 1-20 (2012).
50. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. Shin, D. M.: *Clin. Cancer Res.*, **14**(5), 1310-1316 (2008).
51. Haag, R.: *Angew. Chem. Int. Ed.*: **43**, 278-282 (2004).
52. Park, J. T., Seo, J. A., Ahn, S. H., Kim, J. H., Sang Kang, W.: *J. Ind. Eng. Chem.*: **16**, 517-522 (2010).
53. Delehanty, J. B., Boeneman, K.; Bradburne, C. E., Robertson, K., Bongard, J. E., Menditz, I. L.: *Ther. Deliv.*: **3**, 411-433 (2010).
54. Cheng, S. -H., Lee, C. -H., Chen, M. -C., Souris, J. S., Tseng, F. -G., Yang, C. -S., Mou, C. -Y., Chend, C. -T., Lo L. -W.: *J. Mater. Chem.*, **20**, 6149-6157 (2010).
55. Moro, A. J., Schmidt, J., Doussineau, T., Lapresta-Fernandez, A., Wegener, J., Mohr, G.: *J. Chem. Commun.*, **47**, 6066-6068 (2011).
56. Gao, W., Chan, J. M., Farokhzad, O. C.: *Mol. Pharm.*, **7**, 1913-1920 (2010).
57. Veale E. B., Gunnlaugsson, T.: *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B.*, **106**, 376-406 (2010).
58. Jeong, Y., Yoon, J.: *Inorg. Chim. Acta*, **381**, 3-14 (2012).
59. Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Micheloni, M.: *Coord. Chem. Rev.*, **256**, 170-192 (2012).
60. Angelos, S., Liong, M., Choi, E., Zink, J. I.: *Chem. Eng. J.* **137**, 4-13 (2008).
61. Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F., Zink, J.: *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2590-2605 (2012).
62. Hechta, M., Climent, E., Biyikal, M., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Ruracka, K., *Coord. Chem. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.020> (2013)
63. Descalzo, A. B., Martínez-Martinez, R., Sancenón, F., Hoffmann, K., Rurack, K.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 5924-5948 (2006).
64. Wang, C., Li, Z., Cao, D., Zhao, Y. -L., Gaines, J. W., Bozdemir, O. A., Ambrogio, M. W., Frasconi, M., Botros, Y. Y., Zink, J. I., Stoddart, J. F.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 5460-5465, (2012).
65. Trewyn, B. G., Giri, S., Slowing, I. I., Lin, V. S. -Y.: *Chem. Commun.*, 3236-3245 (2007).
66. Nadrah, P., Maver, U., Jemec, A., Tisler, T., Bele, M., Goran Drazic, G., Mojca Bencina, M., Pintar, A., Plainsek, O., Gaberscek, M.: *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 3908-3915 (2013).
67. Cui, Y., Dong, H., Cai, X., Wang, D., Li, Y.: *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 3177-3183 (2012).
68. Coll, C., Bernardos, A., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F.: *Acc. Chem. Res.* **46**(2), 339-349 (2013).
69. Mal, N. K., Fujiwara, M., Tanaka, Y., Taguchi, T., Matsukata, M.: *Chem. Mater.*, **15**, 3385-3394 (2003).
70. Fu, Q. Rao, G. V. -R, Ista, L. K., Wu, Y., Andrzejewski, B. P., Sklar, L. A., Ward, T. L., Lopez, G.P.: *Adv. Mater.*, **15**, 1262-1266 (2003).
71. Yang, Y., Yan, X., Cui, Y., He, Q., Li, D., Wang, A., Feia, J. Li, J.: *J. Mater. Chem.*, **18**, 5731-5737 (2008).
72. Zhao, Y., Li, Z., Kabehie, S., Botros, Y. Y., Stoddart, J. F., Zink, J. I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 13016-13025 (2010).
73. Nguyen, T. D., Tseng, H. R., Celestre, P. C., Flood, A. H., Liu, Y., Stoddart, J. F., Zink, J. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 10029-10034 (2005).
74. Lin, Y.-S., Hurley, K. R., Haynes, C. L.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 364-374 (2012).
75. Yu, T., Greish, K., McGill, L. D.; Ray, A., Ghandehari, H.: *ACS Nano*, **6**, 2289-2301 (2012).