



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia



TRABAJO FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE MATERIALES PARA SU
USO COMO SENSORES DE ÁCIDOS GRASOS
EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.**

Alumna: Macarena Palmero Llopis



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

**DESARROLLO DE MATERIALES PARA SU USO COMO
SENSORES DE ÁCIDOS GRASOS EN APLICACIONES
BIOMÉDICAS.**

Alumna: Macarena Palmero Llopis

Fecha: Septiembre de 2016

Departamento de Química Inorgánica

Tutoras: Svetlana Ivanova y María Isabel Domínguez Leal

Trabajo de Fin de Grado de carácter experimental

RESUMEN

Actualmente la obesidad es una de las enfermedades más prevalentes en los países desarrollados, provocando un notable aumento en los factores de riesgo de las enfermedades no transmisibles. Los ácidos grasos juegan un papel fundamental tanto en la nutrición del organismo como en su función, siendo los encargados de proporcionar energía y de mantener la concentración de glucosa necesaria en determinadas situaciones. En personas obesas, estas moléculas están altamente acumuladas, llegando a producir serias alteraciones en el organismo, tales como cardiopatías, aumento del riesgo de contraer enfermedades cerebrovasculares, diabetes, etc.

Estudios recientes han demostrado la relación entre la diabetes y la obesidad, siendo ésta un factor de riesgo del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, debido al aumento de ácidos grasos, los cuales son tanto causa como consecuencia de la aparición de resistencia a la insulina. Por ello, sería de utilidad un sensor que permitiese la determinación rápida y simple de la concentración de ácidos grasos libres en sangre.

De este modo, en este trabajo de fin de grado, se plantea el desarrollo de un sensor basado en un colorante sensible a ácidos grasos y soportado en sílice mesoporosa. La concentración de ácidos grasos libres será relacionada con la absorción en el UV-Visible del colorante seleccionado.

Palabras clave: ácidos grasos; sílice; sensor; diabetes.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Ácidos grasos.....	1
1.2 Ácidos grasos procedentes del metabolismo de la insulina.....	2
1.3 Biosensores.....	4
1.4 Nanopartículas de sílice mesoporosa.....	4
1.5 Aplicaciones biomédicas de la sílice mesoporosa.....	6
1.6 Colorantes.....	7
2. Objetivos.....	8
3. Metodología.....	9
3.1 Modificación de la acidez de la sílice.....	9
3.1.1 Prueba con NH ₃	10
3.1.2 Prueba con aminas.....	10
3.2 Síntesis de partículas esféricas de sílice con capa mesoporosa.....	11
3.2.1. Síntesis de partículas esféricas de sílice.....	11
3.2.2. Síntesis de partículas esféricas con capas mesoporosas.....	11
3.3. Estudio de la interacción entre los ácidos grasos y el colorante.....	13
3.3.1. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con el colorante en fase líquida.....	13
3.3.2. Estudio de la interacción del ácido graso con el colorante soportado en la sílice.....	14
3.3.2.1. Sílice mesoporosa comercial con indicador azul de bromotimol.....	14
3.3.2.2. Sílice mesoporosa modificada con colorante fluorescente.....	14
3.4. Métodos de caracterización.....	15

3.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	15
3.4.2. Espectroscopía UV-Visible.....	15
3.4.3. Difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS).....	16
4. Resultados y discusión.....	17
4.1. Modificación de sílice mesoporosa.....	17
4.1.1. Prueba con amoniaco.....	17
4.1.2. Pruebas con aminas.....	17
4.2. Estudio de la formación de la capa mesoporosa de sílice.....	18
4.3. Estudio de la respuesta del colorante a la presencia de ácidos grasos en medio líquido.....	21
4.4. Estudio de la respuesta del colorante soportado sobre sílice a la presencia de ácidos grasos.....	23
4.4.1. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con azul de bromotimol soportado en sílice.....	23
4.4.2. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con el colorante fluorescente soportado en sílice mesoporosa.....	25
5. Conclusiones.....	27
6. Bibliografía.....	28

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Ácidos grasos.

Cuando se habla del término “grasa”, se hace referencia a los lípidos, compuestos formados por C, H y O, cuya función principal es servir como fuente de energía para nuestro organismo. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos, que pueden estar saturadas o insaturadas por dobles enlaces. La β -oxidación es una ruta metabólica de los ácidos grasos para la obtención de acetil coenzima A (acetil-CoA), ruta central para la producción de energía en muchos órganos y tejidos. Existen varias vías donde el acetil-CoA puede oxidarse: a través del ciclo del ácido cítrico, para la obtención de una mayor carga energética, o en el hígado, donde puede utilizarse para la formación de cuerpos cetónicos, combustibles hidrosolubles que se transportan al cerebro cuando no hay glucosa disponible.

Los ácidos grasos pueden proceder de la dieta, de grasas almacenadas en el tejido adiposo (tejido especializado constituido por células denominadas adipocitos) o de grasas sintetizadas a partir de un órgano, como son los triglicéridos, ya que estos compuestos no se encuentran de forma libre en el organismo. Los triglicéridos se forman por la esterificación del glicerol con ácidos grasos y cubren la mitad de las necesidades energéticas de algunos órganos, especialmente el hígado, el corazón y el músculo esquelético (Nelson y Cox, 2014).

En la actualidad, la obesidad y el sobrepeso se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, siendo más prevalente en los países desarrollados. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en todo el mundo la obesidad se ha más que duplicado en los niños y cuadruplicado en los adolescentes desde 1980 (Zeng y Gao, 2016). La OMS define obesidad como *“una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”*. Por tanto, una primera aproximación a la obesidad es el resultado de la ingesta de más calorías en la dieta que las utilizadas en las actividades corporales. A continuación se presentan algunas estimaciones recientes de la OMS a nivel mundial:

- En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos.
- En general, en 2014 alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos.
- En 2014, el 39% de los adultos de 18 o más años (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso.

- Entre 1980 y 2014, la prevalencia mundial de la obesidad se ha más que doblado (OMS, 2016).

Tanto los factores genéticos como metabólicos, son claves en el desarrollo de problemas de obesidad. A medida que aumentan las tasas de obesidad también lo hacen los riesgos de padecer enfermedades como hipertensión, cardiovasculares, artritis, diabetes tipo 2, deterioro cognitivo y algunos tipos de cáncer (Cefalu y cols., 2015).

1.2. Ácidos grasos procedentes del metabolismo de la insulina.

La obesidad está asociada a varias alteraciones metabólicas, entre las que se incluyen la resistencia a la insulina, la dislipemia aterogénica, o la enfermedad del hígado graso no alcohólico, por lo que es uno de los principales factores de riesgo de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), aumentando significativamente las probabilidades de contraerla. Sin embargo, no siempre tener obesidad conlleva desarrollar la DM2, ya que hay personas obesas con perfiles metabólicos normales (Cefalu y cols., 2015).

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente cantidad de insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la que produce. La insulina es una hormona liberada por las células β -pancreáticas que controla las funciones energéticas del metabolismo de los glúcidos y de los lípidos. Cuando esta hormona se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que van a mediar sus acciones biológicas. El principal efecto de la diabetes no controlada es el aumento de la concentración de glucosa en sangre, es decir, hiperglucemia, que con el tiempo puede llegar a producir graves daños en los nervios y vasos sanguíneos (OMS, 2016).

La diabetes tipo I (también denominada insulino dependiente), se caracteriza por una producción insuficiente de insulina, debido a que estos individuos tienen pocas células β -pancreáticas, por lo que no se puede provocar la captación de glucosa por el músculo esquelético, corazón o tejido adiposo.

La diabetes tipo 2 (también denominada insulino resistente), consiste en una utilización insuficiente de la insulina, debido a que se crea una resistencia por parte de las células hacia ésta, es decir, las células dejan de responder ordinariamente a la insulina. Así mismo, la resistencia a la insulina tiene un efecto perjudicial significativo sobre la salud y el desarrollo de enfermedades crónicas (Nelson y Cox, 2014).

La resistencia a la insulina es la consecuencia de una deficiente señalización de la misma, por un defecto de la unión entre la insulina y su receptor. Los ácidos grasos son tanto causa como consecuencia de la aparición de resistencia a la insulina. El tejido adiposo está formado por un conjunto de células denominadas adipocitos, las cuales en situaciones normales liberan adipoquinas, entre ellas la leptina (proteína que modera el apetito) para la regulación del metabolismo energético, provocando el almacenamiento intracelular de triglicéridos (TG). Sin embargo, en los individuos obesos los adipocitos están rellenos de TG y el tejido adiposo no puede afrontar un aumento superior a la demanda de almacenamiento, produciéndose una acumulación “ectópica” de TG en lugares anormales (Cefalu y cols., 2015). Por otra parte, la leptina crea además resistencia a la insulina en el tejido adiposo. En condiciones normales, la insulina inhibe la lipólisis de TG, al crearse dicha resistencia, la lipasa sensible a hormonas (HSL) se ve estimulada para la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol.

El exceso de liberación de ácidos grasos circulantes, procedentes de la lipólisis de TG almacenados en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, va a desencadenar lipotoxicidad en los diferentes tejidos, promoviendo una respuesta inflamatoria que va a dar lugar a la resistencia de insulina tanto en el hígado, como en el músculo esquelético (Abdul-Ghani y DeFronzo, 2008).

La concentración de ácidos grasos libres en sangre se encuentra en un intervalo de entre $7,5 \cdot 10^{-5}$ y $3,75 \cdot 10^{-4}$ M (Cummings y cols., 1987), un aumento de esta concentración va a provocar hiperglucemia por dicha resistencia en los tejidos, interfiriendo en la captación de glucosa por los transportadores debido a defectos en la unión insulina-receptor (IR) y por la estimulación de la gluconeogénesis en el hígado, producida por la acumulación de acetil-CoA, proveniente de la β -oxidación de ácidos grasos (Johnson y cols., 2016).

El diagnóstico de enfermedades es un factor clave en la medicina para detectar la naturaleza exacta del estado de la enfermedad, con el objetivo de proporcionar un tratamiento eficaz y mejorar la calidad de vida del paciente. En este sentido, y como alternativa a los dispositivos de glucosa en sangre, la concentración plasmática de ácidos grasos libres se utiliza como un marcador de diagnóstico para la identificación de personas en mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, antes de la aparición de defectos de resistencia a la insulina y secreción de insulina. Esto es de particular importancia en la realización de los primeros diagnósticos, no sólo para la DM2, sino también para la correcta evaluación del grado de infarto de miocardio, arteriopatías y otras enfermedades relacionadas con la obesidad. De este modo,

sería de interés el desarrollo de un sensor capaz de medir concentraciones de ácidos grasos libres en sangre.

1.3. Biosensores.

La IUPAC define biosensor como “*dispositivo que se utiliza en reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas asiladas, inmunosistemas, tejidos, órganos o células para detectar compuestos químicos por medio de señales eléctricas, térmicas u ópticas*” (Nič y cols., 2009).

Los biosensores se basan en la interconexión de un elemento de reconocimiento a un transductor físico que convierte la reacción biológica en una señal medible, la cual puede ser generada por las reacciones de oxidación y reducción electroquímica (Parkash y Shueb, 2015).

La colorimetría se encuentra entre los métodos para el desarrollo de sensores, basada en la fluorescencia o en señales electroquímicas generadas por una reacción redox, donde el cambio de color del analito puede ser detectado visualmente por el ojo humano y cuantificado mediante espectroscopía UV-visible, la cual consiste en la absorción de radiaciones electromagnéticas a una longitud de onda definida (Tomita y cols., 2016).

Se han investigado múltiples enfoques para la determinación de ácidos grasos libres en sangre. Una alternativa sencilla es la asociación de colorantes sensibles a ácidos grasos a partículas mesoporosas, con el fin de detectar ópticamente los cambios de color basados en una reacción ácido-base (Idros y cols., 2015).

1.4. Nanopartículas de sílice mesoporosa.

El óxido de silicio (SiO_2) es un material compuesto por átomos de silicio y oxígeno, comúnmente llamado sílice. Este material se encuentra ampliamente distribuido sobre la corteza terrestre. Tradicionalmente, la sílice ha sido asociada con la aparición de enfermedades que afectan al hombre, entre la más conocida, la silicosis. Sin embargo, también existen formas de sílice en la naturaleza que no son tóxicas, como es la sílice mesoporosa.

Actualmente, los avances realizados en la Nanotecnología y Biología Molecular han permitido la obtención de nuevos sistemas basados en materiales híbridos en los que se anclan moléculas orgánicas a un esqueleto inorgánico (Coll y cols., 2013). Por sus propiedades, las

nanopartículas de sílice mesoporosa son un material idóneo para ser empleado en la preparación de este tipo de materiales.

Las nanopartículas se definen como las partículas cuyas dimensiones están entre 1 y 100 nm (Llinàs y Sánchez-García, 2014) y se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza inorgánica u orgánica. Así, las nanopartículas orgánicas están formadas por materiales tales como polímeros o bicapas lipídicas, mientras que los materiales inorgánicos estarían formados por metales y materiales inertes como el dióxido de titanio, hidroxiapatita o la sílice (Vila-Jato, 2001); (Rosenholm y cols., 2012); (Wing, 2006).

Desde hace más de una década, las nanopartículas de sílice mesoporosa han atraído la atención de los científicos debido a sus propiedades físico-químicas. Son materiales inertes, con resistencia mecánica, biodegradables y con una buena biodisposición. Además, son fácilmente sintetizables y se pueden obtener de distinta forma, tamaño y porosidad. La presencia de poros proporciona a la matriz de sílice dos tipos de dominios diferenciados: una superficie externa y otra interior en los poros (Jato, 2001).

Sus características principales son:

- Elevada área superficial ($>1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), lo que le permite almacenar una gran cantidad de carga (35%).
- Gran porosidad, con poros ordenados y de elevado volumen.
- Buena estabilidad, tanto química como térmica.
- Estructura estable.
- No son tóxicas.
- Biocompatibles con el organismo humano.
- Tamaño, forma y porosidad fácilmente modificables.
- Dos superficies funcionalizables (interna y externa).
- Gran facilidad de síntesis a través del método sol-gel, ya que esta ruta permite obtener materiales de gran pureza y homogeneidad, siendo a su vez muy versátil para aplicaciones biomédicas (Jato, 2001).

Estas propiedades las hacen idóneas para ser utilizadas en un amplio campo de aplicaciones, que van desde la biotecnología y biomedicina hasta la ciencia de los materiales (Jato, 2001).

El método sol-gel es una alternativa versátil para la síntesis de nanopartículas de sílice, ya que va a permitir controlar el tamaño de poro a través de la elección del tipo de surfactante y la incorporación de moléculas biológicamente activas o la encapsulación de materiales poliméricos. Una de las estrategias empleadas para modificar las propiedades físico-químicas es la incorporación de compuestos orgánicos en su superficie, los cuales reaccionan con los grupos silanol de la sílice, permitiendo su funcionalización y por consiguiente, el desarrollo de varias aplicaciones tanto en ciencia como en clínica, convirtiendo a la sílice en un buen candidato como biomaterial para su aplicación en biotecnología y biomedicina (Sánchez-Salcedo y cols., 2008).

1.5. Aplicaciones biomédicas de la sílice mesoporosa.

El campo de la biomedicina ha experimentado una gran evolución debido al aumento de las patologías, y por consiguiente, un aumento en el desarrollo de técnicas de diagnósticos biomoleculares para la mejoría de la calidad de vida y el aumento de esperanza de vida en nuestra sociedad. Las aplicaciones biomédicas de dichos materiales mesoporosos abarcan un amplio rango de sistema para la liberación de fármacos y genes, ingeniería de tejidos, terapia celular o sistema de diagnósticos, entre otros (Vallet-Regí, 2006).

Entre las diferentes aplicaciones, se encuentra el diseño de materiales cerámicos porosos avanzados para la regeneración de tejido óseo. El papel fundamental de la regeneración ósea es desempeñado por las células, por lo que resulta imprescindible la obtención de piezas con una porosidad diseñada similar a la del hueso natural, permitiendo así que el tejido formado pueda cumplir sus diferentes funciones fisiológicas (Owens y cols., 2016).

La liberación controlada de fármacos es una forma de administración que permite suministrar una cantidad terapéutica de un fármaco en un área específica del organismo, lográndose mantener y alcanzar la concentración de fármaco deseada en el tejido diana sin sobrepasar el umbral de toxicidad, aumentando así su eficacia terapéutica y reduciendo su toxicidad. En las últimas décadas, los materiales mesoporosos se han convertido en candidatos de vital importancia en el desarrollo de dichas terapias médicas, destacando en el tratamiento contra el cáncer, ya que muchos antineoplásicos tienen mala solubilidad, estabilidad química y absorción celular, presentando un estrecho margen terapéutico debido a la aparición frecuente de efectos adversos. Por tanto, el desarrollo de sistemas vectoriales se hace adecuado para la entrega de moléculas, con la ventaja de llevar a cabo una alta carga de fármaco al tejido diana, facilitando su biodisponibilidad, absorción y eficacia (Carturan y cols., 2004).

La sílice amorfa es buena candidata como matriz con porosidad controlada para la bioencapsulación, es decir, *“la inmovilización de material biológico tal como proteínas, nutrientes, enzimas y su posterior difusión en el organismo (...) a la vez que se evita el contacto entre células y especies de mayor tamaño, como pueden ser vectores de la respuesta inmunológica que las destruya al considerarlas como invasoras (...) minimizando así el riesgo de rechazo inmunológico”* (Owens y cols., 2016). .

Varias propiedades de los materiales sol-gel, sobre todo los que están compuestos a base de sílice, los hacen particularmente adecuados para el desarrollo de biosensores de aplicación en técnicas de diagnóstico.

- En primer lugar, son transparentes en el UV y el rango espectral visible, lo que permite emplear técnicas de detección comunes, tales como absorción, reflexión, fluorescencia, quimioluminiscencia, etc.
- En segundo lugar, son materiales químicamente inertes, resistentes a la degradación térmica y a la biodegradación.
- En tercer lugar, pueden ser dotados con una amplia variedad de elementos de detección (Owens y cols., 2016).

1.6. Colorantes.

Entre los diferentes métodos para el desarrollo de sensores colorimétricos, se emplea el uso de colorantes adsorbidos en la superficie de nanopartículas de sílice. Estas nanopartículas ofrecen una gran superficie de detección, la posibilidad de integrar grupos funcionales, y la capacidad para inmovilizar en una red mesoporosa moléculas orgánicas activas (Idros y cols., 2015). La adsorción de un colorante adecuado sobre sílice mesoporosa podría estabilizar el colorante, proporcionando una manera práctica de medir la concentración de ácidos grasos en sangre.

La figura 1 muestra la fórmula molecular de un colorante fluorescente sensible a la presencia de ácidos grasos sintetizado, para su uso en este trabajo, por investigadores de la Facultad de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sofía. Al protonarse la molécula en presencia de ácidos, el doble enlace desaparece haciendo que la densidad electrónica del nitrógeno se desplace quedándose sin electrones deslocalizados, lo que provoca la modificación su absorción UV-Visible, virando a amarillo y perdiendo fluorescencia. El inconveniente que se presenta es que la sílice es ácida por lo que reaccionaría con el colorante. Por ello, se hace necesario modificar la sílice tratándola con un compuesto básico.

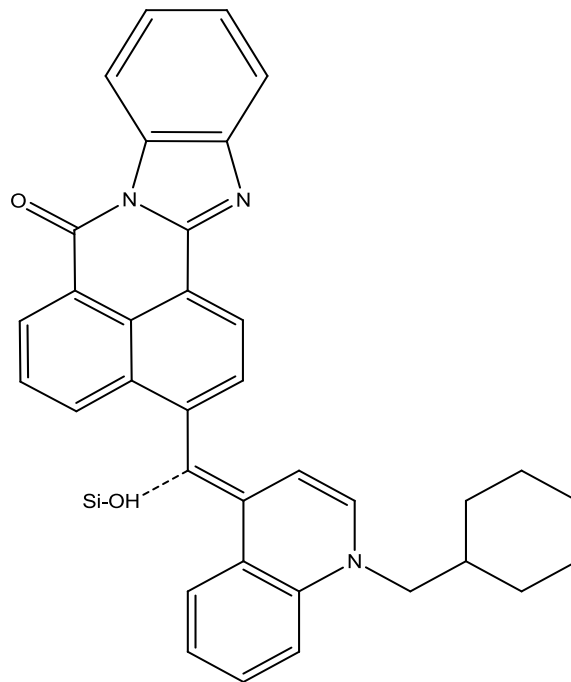


Figura 1: Fórmula molecular del colorante: (E)-3-((1-benzylquinolin-4(1H)-ylidene)methyl)-7H-benzo[de]benzo[4,5]imidazol[2,1-a]isoquinolin-7-on. Peso molecular: 501.58 g/mol.

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la preparación de un sensor para el control de los niveles de ácidos grasos en sangre, como biomarcadores del metabolismo energético asociados a la diabetes tipo 2. Este dispositivo se basa en un colorante sensible a la presencia de ácidos soportado sobre sílice mesoporosa modificada. Los objetivos parciales que se plantean son:

- Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa.
- Modificación de la acidez de las nanopartículas de sílice mesoporosa.
- Estudio de la interacción entre la sílice mesoporosa y el colorante seleccionado.
- Estudio de la respuesta del colorante en presencia de distintas concentraciones de ácidos grasos, tanto en disolución como adsorbido sobre la sílice.

3.- METODOLOGÍA

En primer lugar se estudia, empleando sílice comercial, la modificación de la sílice con el fin de neutralizar su acidez. En una segunda etapa, se sintetizan nanopartículas de sílice mesoporosa, modificándose de acuerdo al método elegido en la primera etapa. Por último, se estudia mediante espectroscopia UV-Visible la respuesta del colorante adsorbido en la sílice frente a la presencia de ácidos grasos.

3.1. Modificación de la acidez de la sílice.

Como se ha explicado en el apartado *Colorantes*, se produce una reacción entre la sílice y el colorante, al ser ésta ácida. Por ello, la superficie de la sílice debe ser modificada para dar lugar a la adsorción del colorante sin que éste reaccione. En este caso, se utiliza inicialmente pellets de sílice Saint-Gobain (área superficial de 250 m²/g), a la cual, se le realiza una serie de pruebas para determinar qué método es el más efectivo para reducir su acidez.

Para comprobar si la modificación de la sílice ha sido efectiva se emplea el azul de bromotimol (C₂₇H₂₈Br₂O₅S), figura 2, molécula compleja utilizada como indicador de pH en zonas próximas a la neutra, debido a que tiene un intervalo de viraje del amarillo al azul entre valores de 6,0 y 7,3 (aproximadamente).

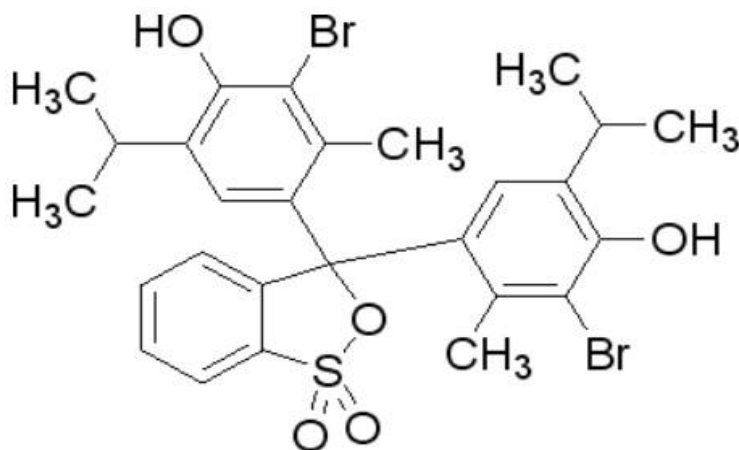


Figura 2: Azul de bromotimol. Peso Molecular: 624,38 g/mol.

Para confirmar que el indicador de prueba seleccionado es adecuado, se añaden unas gotas de colorante sobre un pellet y sobre SiO₂ Saint-Gobain pulverizada. Como se observa en la figura 3, la respuesta con el colorante azul de bromotimol es válida, ya que vira a amarillo al reaccionar con la sílice que es ácida.

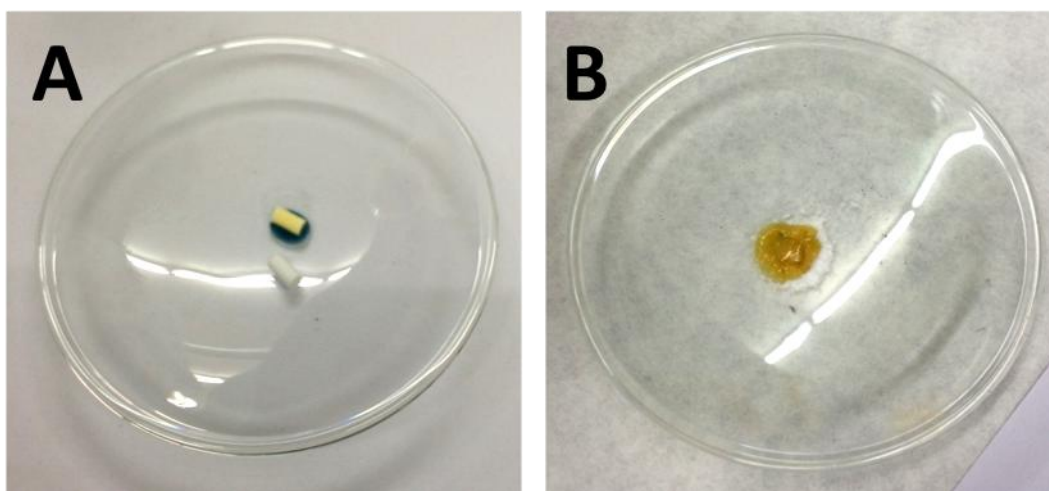


Figura 3: Sílice comercial en pellet (A) y pulverizada (B) con azul de bromotimol.

A continuación, se explican las distintas pruebas realizadas para disminuir la acidez de la sílice:

3.1.1. Prueba con NH_3 .

- Se introduce 1 mL NH_3 Panreac AppliChem (25% v/v) en un vaso de precipitado y se le añade 4 mL H_2O y 1 g SiO_2

Para facilitar la evaporación del agua, se coloca 20 minutos en la placa a 100 °C con agitación, y posteriormente, se introduce en la estufa hasta que el sólido esté totalmente seco.

- A continuación, se toma 1 mL de NH_3 , se añade directamente en 0,2 g de SiO_2 y se deja secar durante 2 horas aproximadamente.

3.1.2. Prueba con aminas.

En esta prueba se usan dos tipos de aminas:

1. *Etilendiamina monohidrato Merck* ($PM=78,11$ g/mol).

- Se pesa 1 g de SiO_2 y se añade en un vaso de precipitado donde se mezcla con 4 mL de etilendiamina.

- La mezcla se mantiene en una placa durante 20 minutos en agitación a 100 °C (Markowitz y cols., 1999).

2. [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano Sigma Aldrich (PM=255,39 g/mol)

- Se introducen 2 g de SiO₂ en un matraz de tres bocas, a una temperatura de 120 °C durante 30 minutos en una atmósfera de nitrógeno y con agitación.
- A continuación, se añaden 50 mL de una disolución 0,1 M de metilamina en tolueno.
- La mezcla se mantiene en reflujo a 120 °C durante 24 horas con agitación.
- El sólido se retira con la ayuda del tolueno, se filtra y se deja secar a temperatura ambiente (Penkova y cols., 2009).

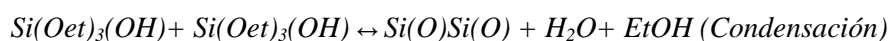
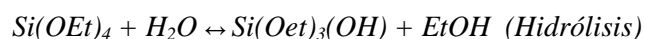
3.2. Síntesis de partículas esféricas de sílice con capa mesoporosa.

El proceso sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil que permite obtener materiales porosos de sílice para su empleo como biomateriales en aplicaciones biomédicas. La síntesis de partículas esféricas de sílice se realiza en dos etapas. En primer lugar, se sintetizan de acuerdo al método Stöber (Llinàs y Sánchez-García, 2014) partículas no porosas monodispersas. En la segunda etapa, las partículas se recubren con una capa mesoporosa, permitiendo la formación de los poros deseados y manteniendo la homogeneidad (Fernández, 2014).

3.2.1. Síntesis de partículas esféricas de sílice.

El método Stöber se basa, en la hidrólisis y condensación de un precursor de sílice, en este caso TEOS Alfa Aesar (tetraetilortosilicato), el cual se añade lentamente en un medio líquido constituido por etanol, agua y una disolución acuosa de amoníaco para obtener las partículas esféricas. Mientras que el alcohol actúa como co-disolvente para homogeneizar la disolución, la disolución de NH₄OH ejerce de catalizador para el control de pH, favoreciendo la formación de partículas de sílice monodispersas.

Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



3.2.2. Síntesis de partículas esféricas con capas mesoporosas.

Una vez controlado el tamaño de partícula, se procede a realizar la síntesis completa, recubriendo las partículas con una capa mesoporosa. Esta capa, como se explica anteriormente,

es de vital importancia debido a su funcionalización tanto interna como externa y a su gran área superficial, la cual va a permitir la adición del colorante.

Para la formación de la capa mesoporosa, es necesaria la realización de una segunda etapa de síntesis donde, además de TEOS se añade un surfactante que actúa como agente director de estructura para dar lugar a la formación de los poros. En este ensayo, se utilizará el C₁₆-TAB Alfa Aesar como director de estructura. La etapa de eliminación de este compuesto orgánico se puede realizar mediante dos vías: extracción con disolvente o calcinación, la cual se va emplear en este caso. La calcinación es la metodología más común, y consiste en someter la muestra a un tratamiento térmico a 600 °C, con una velocidad de calentamiento de 2 °C/minuto, de manera que el compuesto orgánico es eliminado. La eliminación del surfactante fomenta a la condensación de los grupos silanol, lo cual es de gran interés para su posterior funcionalización.

La síntesis realizada en este proyecto se recoge de forma esquemática en la figura 4.

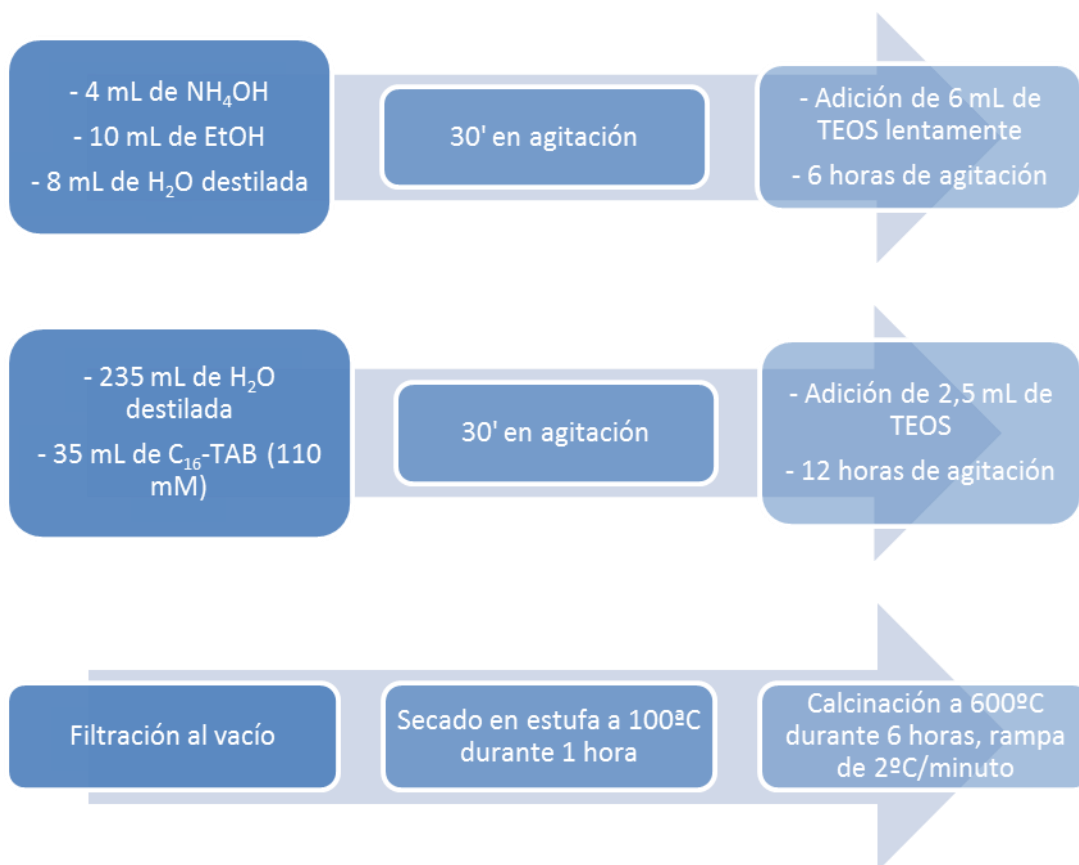


Figura 4: Esquema de la síntesis de partículas de sílice con capa mesoporosa.

3.3. Estudio de la interacción entre los ácidos grasos y el colorante.

Para estudiar la reacción entre el colorante y los ácidos grasos, se simulan las condiciones fisiológicas de la sangre. Para ello, se utiliza una disolución tampón básica con una determinada concentración de ácidos grasos, en este caso, se ha usado ácido heptanoico Sigma Aldrich (figura 5).

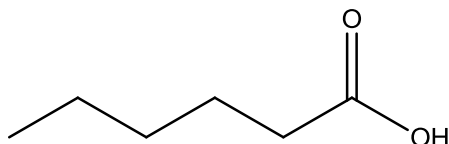


Figura 5: Fórmula molecular del ácido heptanoico.

- Para la preparación de un litro de disolución tampón se toman 10 mL de tris-hidroximetil-amino-metano 1M y 2 mL de EDTA 0,5 M y se enrasa con agua desionizada hasta el volumen final.
- Para la preparación de la disolución inicial de ácido graso se miden 0,013 mL de ácido heptanoico y se lleva a un matraz de 250 mL, enrasando con disolución tampón, obteniendo una concentración $3,75 \cdot 10^{-4}$ M. A partir de esta disolución, por dilución se obtienen el resto de concentraciones empleadas.

3.3.1. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con el colorante en fase líquida.

Inicialmente se preparan dos muestras de ácido graso (M4 y M5) correspondientes a los límites inferior y superior del intervalo de concentración en sangre ($7,5 \cdot 10^{-5}$ y $3,75 \cdot 10^{-4}$ M) (Cummings y cols., 1987). Al no apreciarse una diferencia clara entre las absorciones de ambas muestras (Apartado *Resultados y discusión*, figura 11) se preparan tres diluciones a partir de la muestra del límite inferior ($7,5 \cdot 10^{-5}$), empleando tampón fisiológico.

De este modo, en total se prepara una serie de 5 muestras, con un volumen final de 1 mL (tabla 1). A cada muestra se le añade una gota de azul de bromotimol, midiéndose la respuesta del colorante mediante espectroscopía UV-Visible.

Tabla 1: Preparación de muestras de ácido graso con disolución tampón.

Muestra	Ácido graso (µL)	Disolución tampón (µL)	[Ácido graso]
M0	-	1000	-
M1	50	950	$1,87 \cdot 10^{-5}$ M
M2	100	900	$3,75 \cdot 10^{-5}$ M
M3	150	850	$5,62 \cdot 10^{-5}$ M
M4	200	800	$7,5 \cdot 10^{-5}$ M
M5	1000	-	$3,75 \cdot 10^{-4}$ M

3.3.2. Estudio de la interacción del ácido graso con el colorante soportado en la sílice.

Se hacen ensayos con la sílice comercial, empleando como colorante el azul de bromotimol y con las nanopartículas de sílice sintetizadas, utilizando en este caso el colorante fluorescente. La interacción del analito (ácido graso) y el colorante soportado en la sílice es medida en el UV-Vis.

3.3.2.1. Sílice mesoporosa comercial con indicador azul de bromotimol.

Se pesa 180 mg de sílice y se impregna en el colorante azul de bromotimol mediante goteo, aproximadamente unas 12 gotas, para saturar el sólido de colorante.

Se preparan 6 placas de vidrio, cada una de ellas con 30 mg de SiO₂ con colorante. A cada placa se le añade 125 µL de ácidos grasos a diferentes concentraciones (tabla1). Las respuestas se medirán mediante espectroscopía UV-Visible.

3.3.2.2. Sílice mesoporosa modificada con colorante fluorescente.

Se prepara una disolución de 20 ppm del colorante (E)-3-((1-benzylquinolin-4(1H)-ylidene)methyl)-7H-benzo[de]benzo[4,5]imidazol[2,1-a]isoquinolin-7-one en diclorometano.

Se pesan 140 mg de SiO₂ sintetizada, se impregna con 100 mL de la disolución de colorante y se evapora en el rotavapor. El sólido seco se reparte en 5 placas de vidrio. A cada placa se le añade un volumen de 200 µL de una de las disoluciones de ácido graso preparadas (tabla 1). Se deja secar la muestra y se mide en el UV.

3.4. Métodos de caracterización.

La caracterización de un sólido tiene como finalidad conocer cualitativamente y cuantitativamente su composición y estructura química, propiedades físicas, químicas, texturales, etc.

En este trabajo se analizan las características de la sílice mesoporosa empleando los siguientes métodos de caracterización:

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
- Espectroscopía UV-Visible
- Difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

3.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las observaciones por TEM se realizaron en un microscopio Philips CM200, operado a 200kV. Las muestras se dispersaron en etanol con ayuda de ultrasonidos y se depositaron sobre una rejilla de cobre cubierta con una película de carbono amorfo.

3.4.2. Espectroscopía UV-Visible.

Las medidas de la absorción en el visible se llevaron a cabo en un espectrómetro UV-Visible Avantes modelo AvaLight-DH-S-BAL equipado con sensor de líquidos y sólidos de fibra óptica para longitudes de onda de 100 a 1000 nm.

El color que se observa en una muestra corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite dentro de la región visible del espectro, siendo el color observado el complementario al absorbido. La complementariedad de colores se representa en el círculo cromático (figura 6). De este modo, un colorante azul (como los empleados en este trabajo) absorbe radiación visible en la región del amarillo (con longitudes de onda entorno a los 600 nm). De este modo, mediante espectrometría UV-Visible puede medirse la absorción de un compuesto en la región visible del espectro. Al reaccionar los colorantes con ácidos el color azul vira a amarillo, con lo que la absorción a 600 nm debe caer a medida que la concentración de ácidos grasos aumenta y más colorante reacciona pasando de azul a amarillo.



Figura 6: Círculo cromático.

3.4.3. Difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

La difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS) es una técnica analítica empleada para la caracterización estructural de materiales en el rango de los nanómetros. Normalmente la muestra es irradiada con un haz de rayos X monocromático y a partir de la distribución de intensidades a muy bajo ángulo es posible obtener información sobre tamaño o distribución de tamaños de partículas, forma de partículas y estructura interna.

Esta técnica se emplea en partículas con un tamaño comprendido entre 0.5 y 50 nm en materiales tales como: cristales líquidos, películas de polímeros, microemulsiones, catalizadores, proteínas, virus etc. Es por tanto la técnica adecuada para detectar orden a corto alcance en materiales amorfos tales como sílices mesoporosas.

El equipo necesario para realizar este tipo de análisis tiene diferencias notables respecto a un difractómetro convencional. Normalmente se trabaja en transmisión con un haz de rayos X muy fino, de manera que pueda ser interceptado sin bloquear la intensidad dispersada.

Las medidas en este trabajo se hicieron en un difractómetro PanAnalytical X'Pert Pro en el rango 2θ de 0,5 a 4°.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Modificación de sílice mesoporosa.

Tras aplicar distintos métodos de tratamiento para disminuir la acidez de la superficie de la sílice, se procede a comprobar cuál de ellos es el adecuado para que se produzca la adsorción del colorante sin su modificación por reacción con la sílice.

4.1.1. Prueba con amoníaco.

En la figura X se muestra la adición del colorante azul de bromotimol a la sílice comercial seca, tratada con 4 mL de agua y 1 mL de NH_3 , antes de introducirla en la estufa. El colorante se mantiene azul, por lo que deducimos que el amoníaco está reaccionado con los grupos silanol de la sílice, disminuyendo su acidez. Esta modificación se mantiene estable 2 horas aproximadamente. Tras secar la muestra totalmente en la estufa, podemos observar en la figura 7 que el color vira a amarillo.

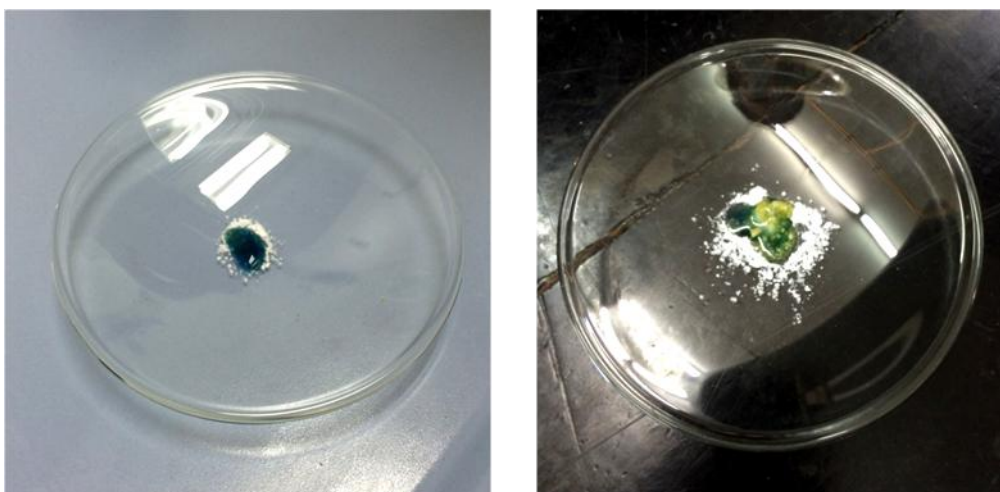


Figura 7: Azul de bromotimol añadido sobre sílice comercial tratada con amoníaco antes y después de secarla en la estufa.

4.1.2. Pruebas con aminas.

1. *Etilendiamina monohidrato*: Al añadir a la sílice modificada con etilendiamina el indicador azul de bromotimol, éste conserva la coloración azul como se puede apreciar en la imagen A de la figura 8. El color se mantiene aproximadamente dos semanas. Por tanto,

podemos deducir que los grupos silanol de la sílice han sido neutralizados con la amina, no interactuando con el colorante y dando lugar a un pH básico, mayor de 7,3.

2. [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano: En la imagen B (figura 8) se observa que al añadir azul de bromotimol a la sílice modificada con metilamina, el colorante adquiere un tono verdoso, por tanto, esta modificación puede descartarse al no resultar efectiva.

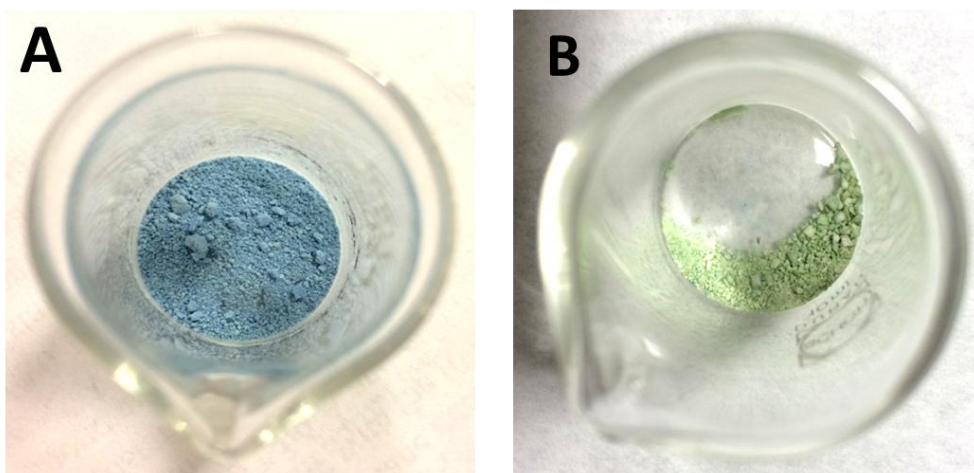


Figura 8: la imagen A corresponde al tratamiento con etilendiamina y la imagen B con metilamina.

4.2. Estudio de la formación de la capa mesoporosa de sílice.

En la figura 9, se recogen las micrografías obtenidas por TEM de las nanopartículas de sílice mesoporosa sintetizadas, en la imagen A se observa la superficie de dos partículas sin mesoporosidad, a diferencia de las imágenes B y C, donde se contempla un gran desarrollo de la capa mesoporosa alrededor de las partículas esféricas de sílice. Esto es debido a que la duración de la segunda etapa de la síntesis (generación de la capa mesoporosa) fue mayor de lo indicado en la bibliografía.

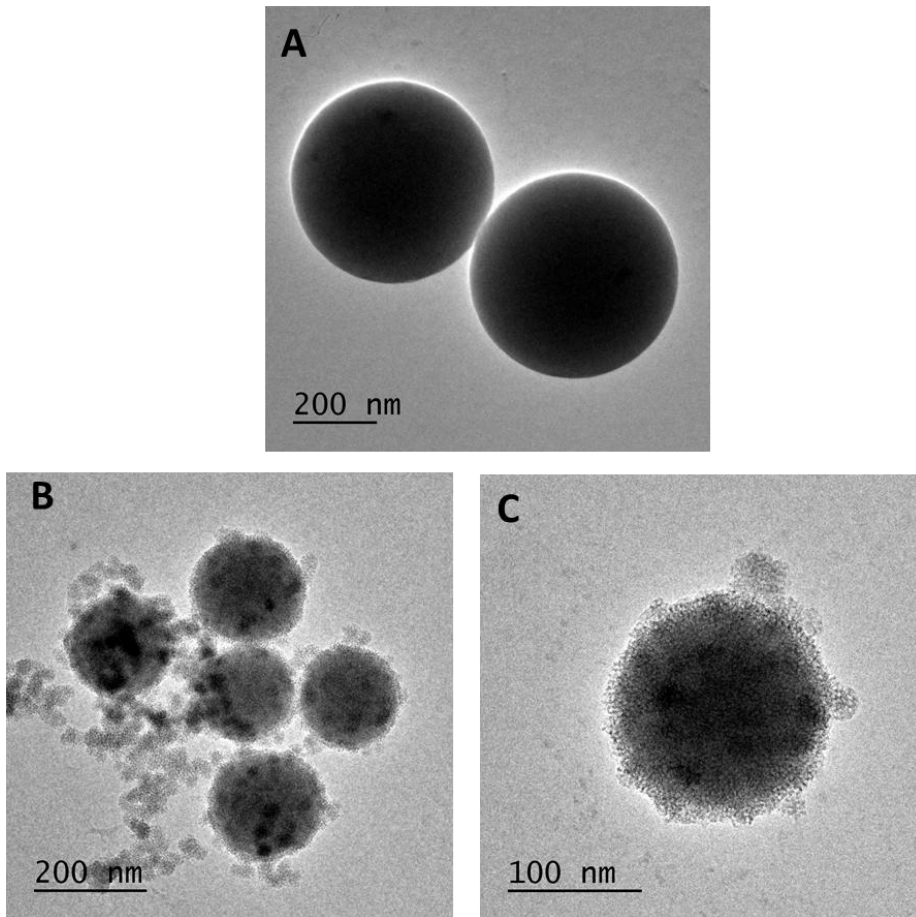


Figura 9: imágenes de TEM de nanopartículas esféricas de sílice.

La difracción de rayos X a bajo ángulo de la sílice mesoporosa (Figura 10A) confirma la presencia de mesoporos de sílice hexagonales, con la presencia de difracción típica del plano (100) centrado en $2\theta=1,747$, y correspondiente a un distancia interplanar de 5,05nm.

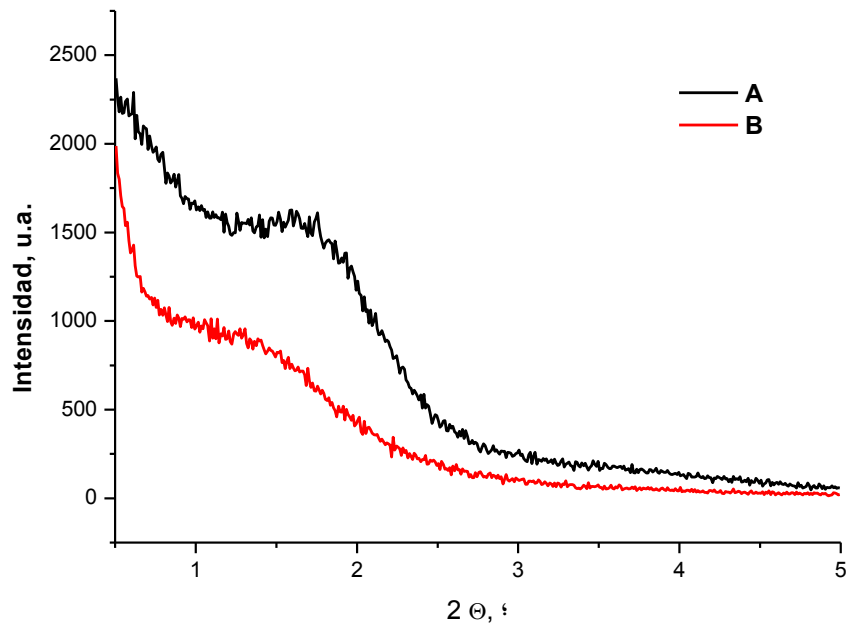


Figura 10: imagen de difracción de rayos X a bajo ángulo de sílice mesoporosa.

En la figura 11, se observan cambios en la parte mesoporosa como consecuencia de la funcionalización de la sílice con la etilendiamina confirmado por la pérdida de señal de ordenamiento en RX, Figura 10B.

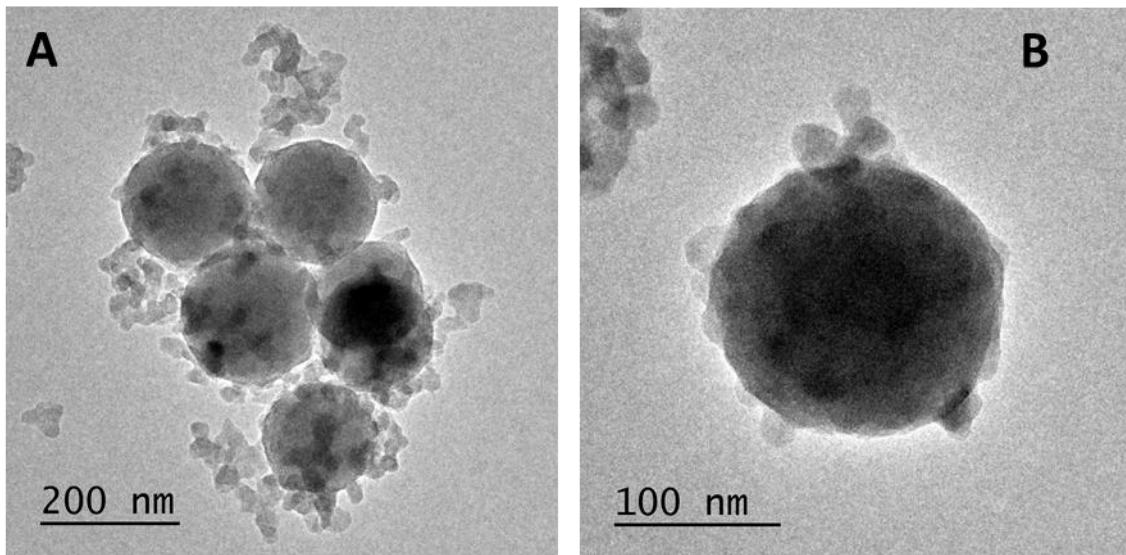


Figura 11: imágenes de TEM de nanopartículas esféricas de sílice funcionalizadas.

4.3. Estudio de la respuesta del colorante a la presencia de ácidos grasos en medio líquido.

La respuesta del colorante frente a distintas concentraciones de ácidos grasos en la disolución tampón, simulando las condiciones fisiológicas de la sangre, se puede observar en la figura 12, donde se aprecia una escala de colores desde el amarillo hasta el azul, correspondiendo la concentración más alta de ácido graso a la muestra M5 (tabla 1), por tanto al eppendorf amarillo.

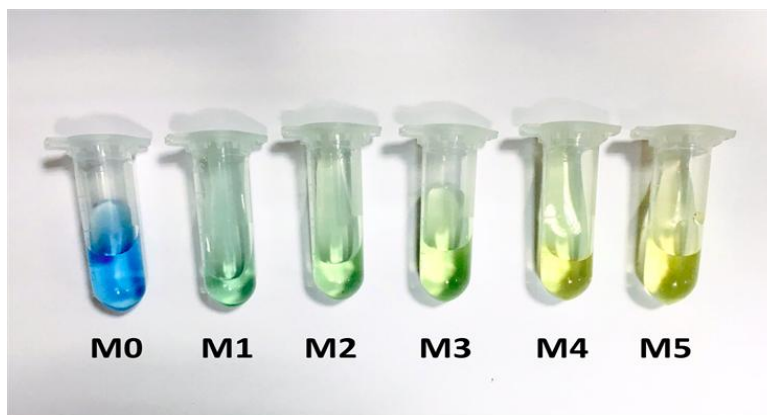


Figura 12: Gradiente creciente de concentración de ácidos grasos disueltos en la solución fisiológica con la adición del indicador de pH (azul de bromotimol).

Para comprobar la respuesta ácido-base del indicador se realiza el análisis mediante espectroscopía UV-Vis de la serie de muestras M1 a M5 (tabla 1), observándose en la figura 13 una absorción en torno a los 600 nm que va cayendo en intensidad a medida que aumenta la concentración de ácidos grasos; en cambio, a unos 450 nm aproximadamente, que corresponde a longitud de onda en la región azul del visible, la señal sube conforme aumenta la concentración de ácidos grasos.

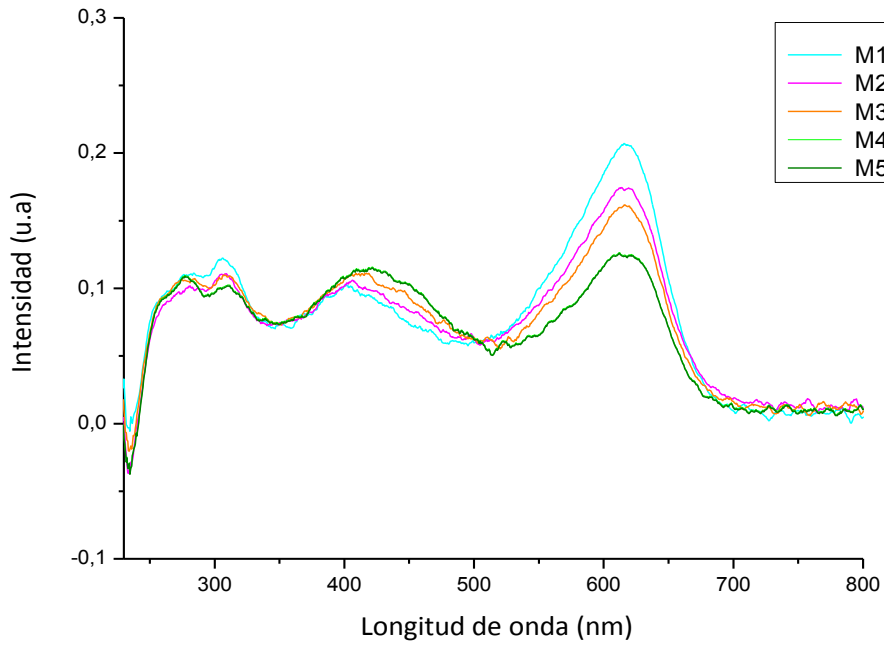


Figura 13: Espectro de absorción UV-Vis para las muestra reflejadas en la tabla 2.

Representando la absorbancia a 600 nm, se observa una respuesta lineal (figura 14) de la señal respecto a la concentración de ácido graso desde la muestra M1 hasta M4 (tabla 1). M5, a pesar de ser mucho más concentrada en ácidos grasos muestra una absorción ligeramente inferior de la de M4, indicando una relación linear diferente en el rango más concentrado. Como punto de inflexión se puede considerar la concentración $7,5 \cdot 10^{-4}$ M. Sin embargo para afirmar esta suposición se hace necesario la medida de muestras con concentraciones intermedias entre M4 y M5.

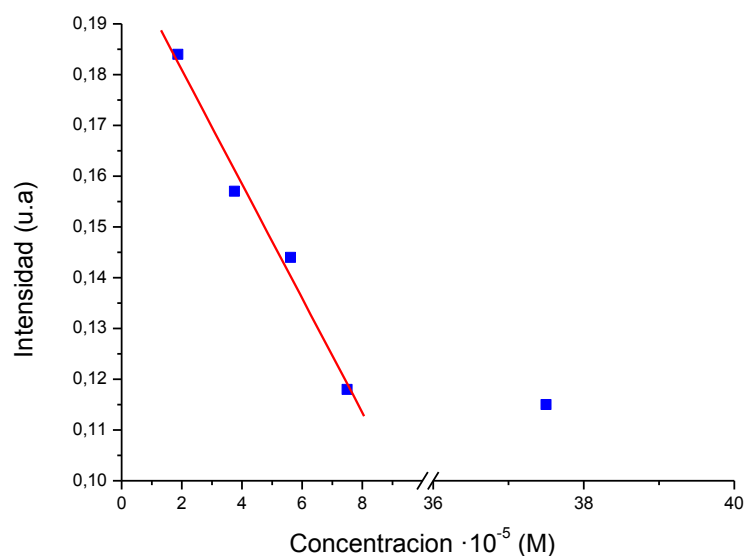


Figura 14: Relación de absorción UV-Visible frente a las muestras reflejadas en la tabla 2.

4.4. Estudio de la respuesta del colorante soportado sobre sílice a la presencia de ácidos grasos.

4.4.1. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con azul de bromotimol soportado en sílice.

La sílice comercial es impregnada con el indicador azul de bromotimol mediante goteo. Se realizan pruebas añadiendo sobre porciones de igual peso de sílice funcionalizada y saturada de colorante, volúmenes iguales de disoluciones de ácido graso de distinta concentración. Se emplearon las mismas concentraciones de ácidos grasos y en el mismo orden creciente que en la tabla 1.

Tras realizarse el análisis por espectroscopía UV-Vis, y una vez descartada la muestra M3 que presentaba un resultado anómalo, se observa el mismo comportamiento que en fase líquida, al aumentar la concentración de ácidos grasos la intensidad de la absorción a 600 nm va cayendo (al ir virando el colorante de azul a amarillo), figura 15.

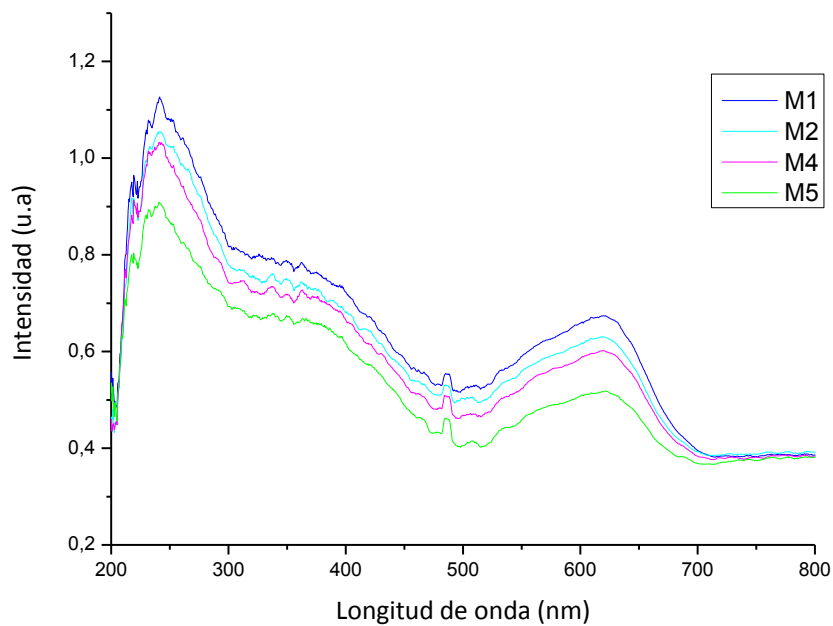


Figura 15: Espectro de absorción UV-Vis de ácidos grasos en un soporte sólido de sílice comercial frente al colorante.

Al igual que el caso anterior, se mide la absorbancia para las distintas muestras y se representa sus concentraciones en ácidos grasos frente a la intensidad de la señal a 600 nm, obteniendo una regresión lineal entre los puntos M1 y M5 (figura 16).

De este modo, la sílice comercial tratada con etilendiamina puede ser empleada como soporte sólido para el colorante azul de bromotimol, lográndose una respuesta lineal frente al contenido en ácidos grasos en el intervalo estudiado.

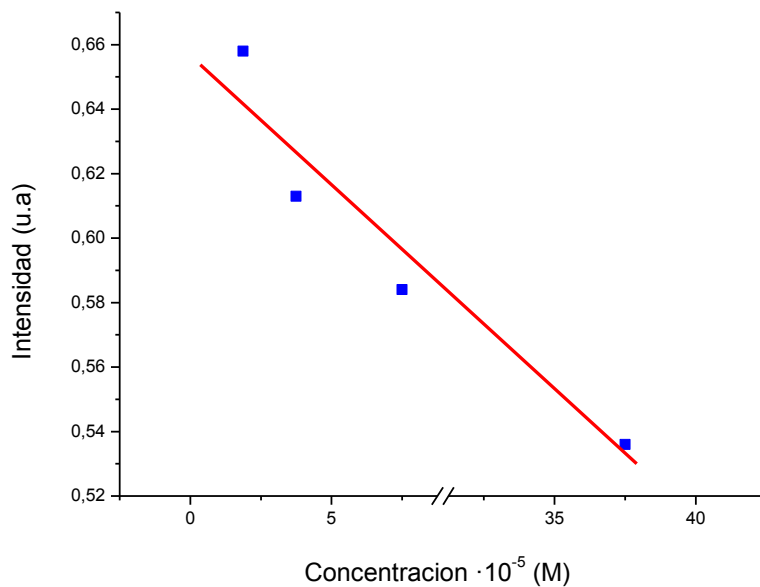


Figura 16: Relación de absorción UV-Visible frente a las muestras reflejadas en la tabla 2.

4.4.2. Estudio de la interacción de los ácidos grasos con el colorante fluorescente soportado en sílice mesoporosa.

Se repite el mismo ensayo que en el caso anterior, pero en este caso utilizamos la sílice mesoporosa sintetizada y modificada con etilendiamina.

Al igual que en los casos anteriores, la intensidad de la señal a 600 nm cae cuanto mayor es la concentración del ácido graso puesto en contacto con el colorante, observándose gráficamente una respuesta lineal entre las muestras M2 y M5 (figura 17).

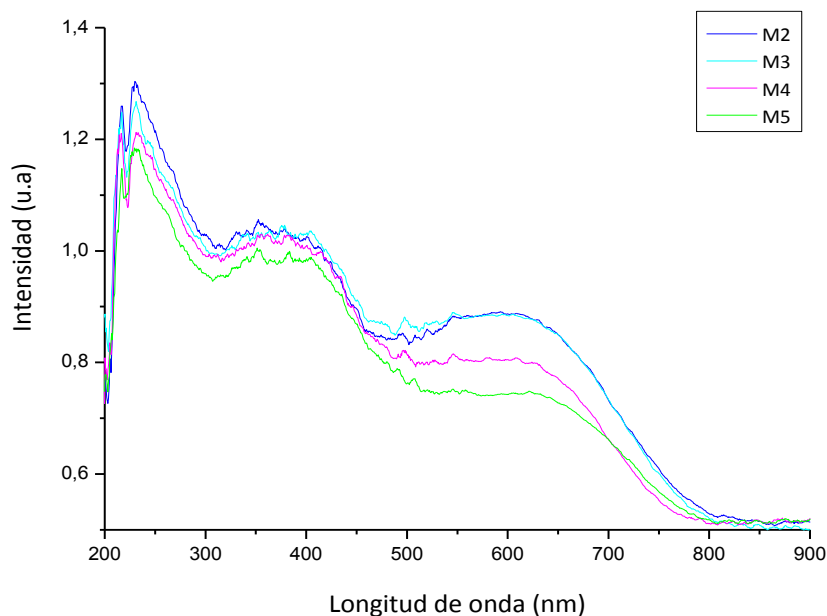


Figura 17: Espectro de absorción UV-Vis para las muestras de ácidos grasos de la tabla 2 en un soporte de sílice sintetizada.

Posteriormente, se mide la absorbancia a 600 nm para las distintas muestras y se representa frente a la concentración de ácidos grasos (figura 18). Como resultado se obtiene una recta de regresión lineal en el intervalo de concentraciones de ácido graso de interés cuando se usa el colorante fluorescente.

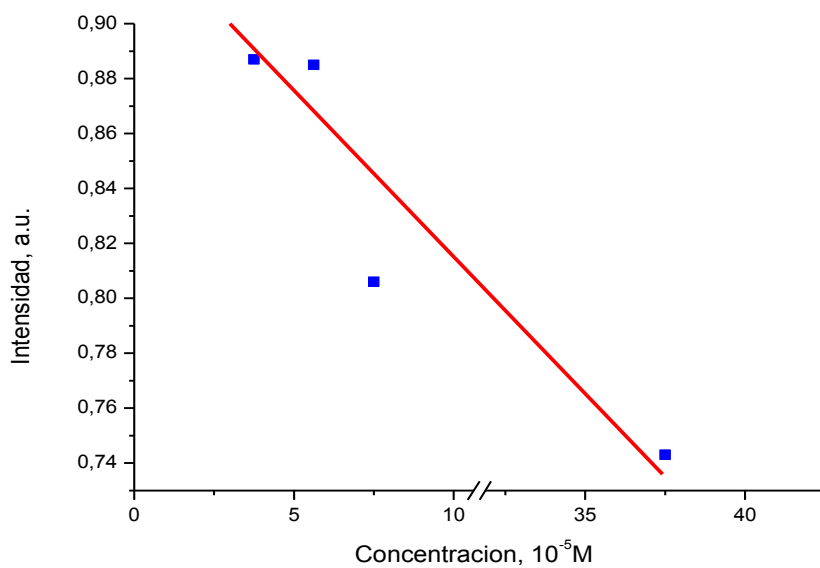


Figura 18: Relación absorción en el UV-Vis frente a las muestras reflejadas en la tabla 2.

De modo general, los dos colorantes adsorbidos sobre la sílice mesoporosa muestran una alta dispersión de puntos y un ajuste lineal poco preciso. La posible presencia de un punto de inflexión en el rango de concentraciones estudiadas puede explicar este hecho. No obstante, estos primeros resultados indican que este método podría ser una alternativa viable para la detección de ácidos grasos en condiciones fisiológicas, siendo necesario ampliar el número de muestras en el intervalo de concentraciones estudiado para poder realizar un mejor ajuste.

5.- CONCLUSIONES

En este trabajo fin de grado se planteó el desarrollo de un sensor para la medición de ácidos grasos libres en sangre basado en un colorante sensible a la presencia de ácidos soportado sobre nanopartículas de sílice mesoporosa.

Como paso previo al soporte del colorante, y para evitar la reacción del mismo, se ha funcionalizado la sílice con el fin de eliminar su acidez, siendo el método más efectivo su tratamiento etilendiamina.

Respecto al uso de colorantes para la detección de ácidos grasos, tanto el indicador azul de bromotimol como el colorante fluorescente soportados dan una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones ensayado.

En los últimos años, se ha producido un gran avance en el campo de los materiales con aplicaciones biomédicas, entre ellas el diagnóstico clínico de enfermedades, tales como la diabetes tipo 2, siendo fundamental para proporcionar un adecuado tratamiento al paciente y mejorar su calidad de vida. El presente trabajo supone un primer paso en el desarrollo de un sensor que permita el control del nivel de ácidos grasos libres en sangre, aunque se debe seguir investigando al respecto para mejorar las técnicas de detección con el fin de desarrollar un dispositivo de uso inmediato.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep.* 2008; 8(3): 173-8.
- Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *Journal of Materials Chemistry.* 2004; (14): 2087-2098.
- Cefalu WT, Bray GA, Home PD, Garvey WT, Klein S, Pi-Sunyer FX, et al. Advances in the Science, Treatment, and Prevention of the Disease of Obesity: Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care.* Agosto de 2015; 38(8): 1567-82.
- Coll C, Bernardos A, Martínez-Máñez R, Sancenón F. Gated Silica Mesoporous Materials in Sensing Applications. *Acc Chem Res.* 2013; 46(2): 339-49.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch HWJ, Penaylor C, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood, *Gut,* 1987, 28, 1221-1227.
- Fernández AM. Síntesis de materiales híbridos como sensores de ácidos grasos procedentes del metabolismo de la insulina. Trabajo de Fin de Grado. Sevilla: Instituto de Ciencias Materiales de Sevilla; 2014.
- Idros N, Ho MY, Pivnenko M, Qasim MM, Xu H, Gu Z, et al. Colorimetric-Based Detection of TNT Explosives Using Functionalized Silica Nanoparticles. *Sensors (Basel).* 2015;15(6):12891-905.
- Johnson AR, Qin Y, Cozzo AJ, Freemerman AJ, Huang MJ, Zhao L, et al. Metabolic reprogramming through fatty acid transport protein 1 (FATP1) regulates macrophage inflammatory potential and adipose inflammation. *Molecular Metabolism.* 2016; 5(7): 506-26.
- Llinàs MC, Sánchez-García D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *AFINIDAD LXXI.* 2014; 565.
- Markowitz M, Schoen P, Kust P, Gaber B. Surface acidity and basicity of functionalized silica particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 1999; 150(1-3):85-94.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principios de Bioquímica* 5ta. Ed. Omega. 2009; 373: 938-941.

- Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A. IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book [Internet]. 2.1.0. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2009 [citado 20 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org>
- OMS | Diabetes [Internet]. WHO. [citado 23 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- OMS | Obesidad y sobrepeso [Internet]. WHO. [citado 23 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Owens GJ, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, et al. Sol–gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. abril de 2016; 43-45.
- Parkash O, Hanim Shueb R. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. *Viruses*. 19 de octubre de 2015;7(10):5410-27.
- Penkova A, Martínez Blanes J.M., Cruz S.A, Centeno M.A, Hadjiivanov K, Odriozola J.A, Gold nanoparticles on silica monospheres modified by amino groups. 2009, 530-534.
- Rosenholm JM, Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine--recent advances. *Nanomedicine (Lond)*. 2012; 7(1):111-20.
- Sánchez-Salcedo S, W. J.-R. (2008). Hierarchical pore structure of calcium phosphate scaffolds by a combination of gel-casting and multiple tape-casting methods. *Acta Biomater* , 913-922.
- Tomita Y, Morita Y, Suga H, Fujiwara D. DNA module platform for developing colorimetric aptamer sensors. *BioTechniques*. 2016; 60(6): 285–292.
- Vallet-Regí, M. (2006). Revisiting ceramics for medical applications. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* , 5211-5220.
- Vila Jato JL. (2001). *Tecnología Farmacéutica*. Madrid: Síntesis S.A.
- Wing, C. E. G. Las nanoparticulas: Pequeñas estructuras con gran potencial, *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*. 2006: 24.
- Zeng N, Gao Z. Exergaming and obesity in youth: current perspectives. *Int J Gen Med*. 2016; 9:275-84.