

Universidad de Granada
Departamento de Química Inorgánica



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS DE COORDINACIÓN
POROSOS COMO AGENTES LIBERADORES DE FÁRMACOS**

Programa Oficial de Doctorado en Química

Sara Rojas Macías

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sara Rojas Macías
D.L.: GR 2220-2014
ISBN: 978-84-9083-293-6

La doctoranda Sara Rojas Macías y los directores de la Tesis Doctoral, Elisa M^a Barea Martínez y Jorge Andrés Rodríguez Navarro, garantizamos, al firmar esta Tesis, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, durante la redacción de esta Tesis, se han respetado los derechos de otros autores que han sido citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 22 de Septiembre de 2014

La Doctoranda

Fdo. Sara Rojas Macías

Los Director/es de la Tesis

Fdo.: Elisa Barea Martínez
Profesora Titular de Química Inorgánica de la Universidad de Granada

Fdo.: Jorge Andrés Rodríguez Navarro
Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad de Granada

AGRADECIMIENTOS

Hace ya siete años decidí venir a Granada a estudiar, y cuatro desde que empecé esta Tesis Doctoral. Sin duda, estos últimos años han marcado mi vida de una forma especial ya que en Granada empecé mi etapa en el mundo de la investigación, que tan complicado parece al principio pero que finalmente se acaba volviendo adictivo. A lo largo de mi vida he trabajado en diferentes áreas, pero en ninguna he estado tan motivada como en el laboratorio.

Este giro inesperado de la vida no hubiese sido posible sin la oportunidad que me brindaron mis directores de Tesis, Elisa Barea y Jorge A. Rodríguez Navarro. Han demostrado tener una gran confianza en mí, una persona que no conocían de nada, y a la que han apoyado y ayudado durante estos años. Trabajar con vosotros ha sido muy enriquecedor, dándome la libertad de investigar y de realizar estancias en el extranjero que tan productivas han sido para mí. Me voy con la cabeza llena de conocimientos y es gracias a vosotros.

Me gustaría agradecer muy especialmente el apoyo de mis compañeros de laboratorio. A Elsa, mi maestra de laboratorio, gracias por enseñarme y por compartir conmigo tantos descubrimientos felices (aunque también decepciones). A Carmen, por ayudarme durante los primeros días y ser tan buena conmigo. A Elena, por compartir conmigo muchas experiencias, dentro y fuera del laboratorio. A Natalia, mi vecina y amiga, por estar siempre ahí, gracias por tu apoyo. Y a Quico, con quien he compartido la última parte de esta Tesis y que tanta paciencia ha tenido conmigo. Gracias a todos por acompañarme.

Asimismo, agradezco a todo el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada. A los profesores, que me han facilitado tanto las cosas y me han hecho sentir como una más de esta gran familia, especialmente a Juanma, Antoñillo y Miguel A., con los que he compartido “salita”, y que han demostrado ser excelentes docentes, pero sobre todo personas. También mostrar mi agradecimiento al profesor Juan Manuel Salas,

con el que he compartido viajes y congresos, y al que estoy muy agradecida por sus siempre sabias palabras. A Mari Carmen y Antonio de la Torre, que siempre me han recibido con una gran sonrisa y me han ayudado a resolver cualquier problema que se presentara. Que sería de mí sin vosotros!

A todos los becarios de la Universidad de Granada, especialmente a Noelia, Cala, Silvia, Víctor, Fernando, Miguel, Fran, Ana, Chiqui, Alicia, Maikel e Iris, por las risas y por todos los buenos momentos, pero también por escucharme y apoyarme cuando más lo he necesitado, por los viernes, las comidas en la sala de becarios, los congresos y viajes... Es difícil resumir en unas frases lo que habéis hecho por mí. Muchas gracias a todos.

Dar las gracias al Prof. Enrique Oltra, a su doctoranda Natalia Muñoz del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, y al Prof. Norberto Masciocchi, Dr. Simona Galli, Dr. Angelo Maspero y Dra. Valentina Colombo de la Università dell'Isabria, por todo su trabajo, fundamental para la realización de esta Tesis Doctoral.

Furthermore, I would like to thank Prof. Russell Morris for his kindness during my stage in Saint Andrews. It was a pleasure to work in your group, especially with Paul S. Wheatley, who helped me with the measurements. Moreover, I want to thank Damiano, Sam, Laura, Yuyang, Morven and Katarzyna for sharing lab and experiences with me. Me gustaría agradecer especialmente, a Javi y Sonia, mis dos compañeros de Bilbao que me hicieron sentir como en casa (esas tortillas de patatas!).

Du même, je tiens à remercier au Dr. Serre pour m'avoir si gentiment accueilli au sein de son équipe des Solides Poreux à l'Institut Lavoisier de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines. Así como a la Prof. Patricia Horcajada a la que he podido recurrir cuando se ha presentado cualquier duda o problema, y que siempre se ha mostrado muy cercana conmigo. Extiendo mi gratitud a los compañeros de laboratorio, Mónica, Tania, Teresa, Martin, Pauls, Farid, Lucy... Gracias por hacer mi estancia tan agradable, ha sido genial conocerlos y compartir experiencias con vosotros. Ha

vuestro lado todo ha sido fácil.

Asimismo, extiendo mi agradecimiento al departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada, por la disponibilidad de su instrumentación. Gracias a los Técnicos del centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, especialmente a Alfredo Molina, Miguel Ángel Salas, Alí Haidour Benamin, Javier Cifuentes y Bendición Funes por su imprescindible aportación a esta Tesis, así como la amabilidad que siempre han tenido conmigo.

Agradezco sinceramente el apoyo de mis amigos de toda la vida, David, Soto, Mario y Ana. A pesar de que el tiempo y el espacio nos han separado, siempre os he sentido cerca. A mis amigos de la carrera de química Airy, Sonia y Pastor. Una mención especial se merecen las “Xungues” por repetir cada año y hacer un viaje que nos hace sentir lo que vivimos durante nuestros años de carrera. A Ana y Alba, gracias por enseñarme y compartir tantas aventuras, gracias por estar a mi lado. A mis amigos de Cádiz y Granada, pero sobre todo a mis amigos de Cúllar, me habéis llenado de alegría durante estos últimos años, haciéndome sentir una andaluza más.

Quisiera agradecer de forma muy especial el apoyo de mi familia. A mis padres, Pepi y Jorge, por dejarme experimentar en esta vida y entenderme en mis decisiones. A mis hermanos Miriam y Jordi, y a mi cuñada Tania, por acompañarme y hacer que cada momento con vosotros sea especial, por vuestra sinceridad, por apoyarme siempre. A las “petites” de la casa, Ivet, Lucía y Berta, con vosotras ha sido fácil convertirme en “la princesa destronada”. En poco tiempo me habéis dado mucho, us estimo. A Paco, mi compañero de la vida, con el que se me llenan los ojos, la boca y el corazón. Granada contigo está iluminada. Gracias por estar siempre a mi lado.

Finalmente, agradezco la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto CTQ2008-00037/PPQ y CTQ2011-22787), de la Junta de Andalucía (Proyectos: P07-FQM-3213, P09-FQM-4981 y Beca de Formación de Personal Investigador) y de la Acción COST CM1105.

A mi familia

Abreviaturas

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

NAMI-A: [trans-RuCl₄(DMSO)Im]-[ImH]

RAPTA-C: [Ru(*p*-cimeno)Cl₂(pta)]

pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano

CO: monóxido de carbono

NO: monóxido de nitrógeno

CO-RMs: compuestos liberadores de CO

NOS: NO sintetasas

EPR: permeación y retención mejorada

DDS: sistemas liberadores de fármacos

PEG: polietilenglicol

PCPs: polímeros de coordinación porosos

MOFs: redes metalorgánicas

CUS: centros metálicos coordinativamente insaturados

bdc: benceno-1,4-dicarboxilato

btc: benceno-1,3,5-tricarboxilato o ácido trimésico

FCS: fluido corporal simulado

PBS: tampón fosfato salino

phen: 4,7-fenantrolina

dhBDC: 2,5-dihidroxibenceno-1,4-dicarboxilato

PDI: índice de polidispersión

BSA: suero de albumina

SIF: fluido corporal simulado

lis-SIF: fluido corporal simulado de baja fuerza iónica

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	9
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 Antecedentes y estado actual de la cuestión	19
1.2 Metalodrogas antitumorales	24
1.2.1 Del platino al rutenio	26
1.2.2 Gases terapéuticos	48
1.3 Terapias avanzadas	57
1.3.1 Quimioterapia dirigida (tratamientos diana)	59
1.3.2 Liberación controlada de fármacos	65
1.3.3 Bioaplicaciones de MOFs	75
1.4 Nuestra Investigación	93
1.4.1 Química biosupramolecular de asociaciones multinucleares de coordinación	93
1.4.2 MOFs: aplicaciones en almacenamiento y separación de gases y captura de compuestos orgánicos volátiles	96
1.5 Objetivos	102
1.6 Referencias bibliográficas	104
2 REDES METALORGANICAS POROSAS COMO AGENTES PORTADORES Y LIBERADORES DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS	113
2.1 $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil})\text{bispirazolato})_6]_n$ para la incorporación y liberación de RAPTA-C	115
<i>Discusión y resultados</i>	115
<i>Conclusiones</i>	131
<i>Referencias bibliográficas</i>	133
2.2 CPO-27-Ni en terapias combinadas de NO y RAPTA-C	135
<i>Discusión y resultados</i>	138
<i>Conclusiones</i>	148
<i>Referencias bibliográficas</i>	149

2.3	Nanopartículas de MIL-100(Fe):	151
	<i>Discusión y resultados</i>	157
2.3.1	Incorporación de RAPTA-C	158
2.3.2	“El barco en la botella” para la incorporación de $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimenno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantrono}]_2\text{Cl}_2$ ”	162
	<i>Conclusiones</i>	176
	<i>Referencias bibliográficas</i>	178
2.4	Nanopartículas de ZnBDP_X	181
	<i>Discusión y resultados</i>	186
2.4.1	Caracterización de los nanomateriales	186
2.4.2	Aplicación en la incorporación de fármacos RAPTA-C y Mitoxantrona	209
	<i>Conclusiones</i>	219
	<i>Referencias bibliográficas</i>	221
	CONCLUSIONES	223
	CONCLUSIONS	231
	ANEXO A- Detalles experimentales	239
	ANEXO B- Lista de publicaciones relacionadas con esta Tesis	279

RESUMEN

De forma general, a pesar de que existen una gran variedad de fármacos con actividad anticancerígena, en muchos casos su efectividad se ve limitada por su rápida biodegradación y eliminación del organismo. Además, muchos compuestos bioactivos poseen una baja solubilidad en medio acuoso, debido a su elevado peso molecular y/o a la presencia de grupos hidrofóbicos en sus estructuras, por lo que son reconocidos y eliminados por el sistema inmune. Por lo tanto, la administración de estas moléculas bioactivas en pacientes requiere el desarrollo de métodos que consigan su transporte y liberación en medio fisiológico de forma específica, prolongada y a un ritmo controlado. El diseño de nuevas moléculas bioactivas y tratamientos inteligentes ha dado lugar al desarrollo de agentes portadores no tóxicos, es decir, lo que se conoce como sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, *drug-delivery systems*). En este sentido, recientemente, se ha propuesto un nuevo tipo de materiales inorgánicos porosos conocidos como polímeros de coordinación porosos (PCPs) o redes metalorgánicas (MOFs) para dicha aplicación. Los MOFs están basados en iones metálicos conectados mediante espaciadores orgánicos de forma que se genere una red porosa accesible a moléculas huésped. Estos compuestos presentan algunas características que los hacen prometedores como sistemas de liberación de fármacos: *i)* un elevado volumen de poro con una alta capacidad de adsorción; *ii)* la posibilidad de funcionalizar de forma adecuada los poros, donde pueden tener lugar interacciones matriz-huésped que permitan la reversibilidad del proceso de adsorción; *iii)* la posibilidad de utilizar metales biocompatibles y ligandos bioactivos en sí mismos para su síntesis; *iv)* una estabilidad adecuada para aplicaciones biológicas, de forma que son lo suficientemente estables para liberar el fármaco adsorbido en el tiempo deseado pero que, finalmente, se degradan en el medio biológico, evitando la bioacumulación. Como resultado de los factores anteriormente mencionados, los polímeros de coordinación porosos se consideran, hoy día, buenos candidatos para desarrollar terapias más efectivas y respetuosas con los pacientes.

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral se centra en las potenciales aplicaciones biomédicas de los MOFs y, en concreto, en el uso de estas matrices porosas como sistemas para la liberación controlada de metalofármacos no convencionales. En concreto, se han investigado los siguientes aspectos: *i)* síntesis y caracterización de MOFs adecuados para la encapsulación de fármacos, *ii)* evaluación de la estabilidad de los sistemas en condiciones fisiológicas, *iii)* estudios de adsorción/liberación de una o varias moléculas bioactivas con potencial actividad antitumoral sinérgica en distintos medios fisiológicos simulados y, *iv)* síntesis de nuevos compuestos de tipo “*semi-sandwich*” de Ru(II) con actividad anticancerígena. Debe destacarse que se ha trabajado en la construcción de MOFs basados en ligandos nitrogenados de tipo pirazol, que dan lugar a enlaces de coordinación M-N(pirazolato) más robustos que los enlaces M-O(carboxilato), con el fin de evitar la rápida biodegradación de la red porosa en el medio fisiológico y, por tanto, la liberación masiva del fármaco.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el apartado 2.1 de esta Tesis, se ha descrito la síntesis y caracterización de un MOF robusto y con una porosidad adecuada para incorporar metalofármacos antitumorales de Ru(II) no convencionales. En este apartado, se ha diseñado el ligando de tipo bispirazolato simétrico 4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato que en combinación con *clusters* octanucleares de Ni(II) da lugar a la red porosa $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'\text{-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato})_6]$. Debido a la robustez de los enlaces M-N(pirazolato) no ha sido posible obtener cristales de tamaño suficiente para resolver la estructura mediante cristalografía de rayos X en monocristal por lo que, ha sido necesario el empleo de métodos de difracción de rayos X en polvo (en colaboración con el grupo del Profesor Masciocchi). Debe destacarse que se trata de una estructura altamente porosa (superficie de BET de $1920 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), con un empaquetamiento cúbico centrado en las caras (FCU) lo que da lugar a la formación de n huecos octaédricos y $2n$ tetraédricos con un diámetro interno aproximado de 1.6 nm y 1.0 nm, respectivamente. Además, este sistema presenta una gran estabilidad en condiciones fisiológicas. De acuerdo con estas características, se ha estudiado

la aplicación de este MOF en la adsorción y liberación del metalofármaco de tamaño mediano ($d \approx 0.9$ nm) RAPTA-C [$\text{Ru}(p\text{-cimen})\text{Cl}_2(\text{pta})$] (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano). Los resultados obtenidos muestran que esta matriz porosa es capaz de encapsular 3.97 mmol de RAPTA-C por mmol de MOF como resultado de la incorporación de 2 y 1 moléculas de RAPTA-C, en cada hueco octaédrico y tetraédrico, respectivamente. Debe destacarse que el proceso de adsorción es reversible y que el compuesto RAPTA-C puede liberarse en fluido corporal simulado siguiendo una cinética de primer orden con un $t_{1/2}$ de liberación de la metalodroga de 25 minutos.

Otra estrategia comúnmente utilizada para el tratamiento del cáncer es la administración simultánea de varios fármacos, con el fin de conseguir un efecto terapéutico sinérgico. En ese sentido, en el apartado 2.2, se ha estudiado la aplicación del MOF **CPO-27-Ni**, [$\text{Ni}_2(\text{dhBDC})(\text{H}_2\text{O})_2$] (H_4dhBDC : ácido 2,5-dihidroxitereftálico), con centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas, para el desarrollo de terapias combinadas avanzadas. Para ello, se ensayó este MOF en la adsorción y liberación simultánea, en condiciones biológicas simuladas, de varios agentes terapéuticos anticancerígenos no convencionales: NO y RAPTA-C. Los resultados demuestran que la matriz porosa activada es capaz de adsorber simultáneamente 0.23 mmol de RAPTA-C por mmol de MOF y 2.51 mmol de NO por mmol de MOF. Hay que destacar que tanto el proceso de incorporación como de liberación de ambas especies es independiente, debido a la diferente interacción que tiene lugar entre el MOF y las moléculas adsorbidas: las moléculas de NO se encuentran quimisorbidas en los centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas, mientras que las moléculas de RAPTA-C se encuentran fisorbidas dentro de los poros. Durante el proceso de desorción, en contacto con una disolución acuosa, las moléculas de NO se liberan instantáneamente mientras que el tiempo de vida media de liberación del RAPTA-C es de, aproximadamente, 18 min. Los resultados obtenidos demuestran que este sistema puede considerarse como una prueba de concepto adecuada para demostrar la utilidad de los MOFs como agentes liberadores de varias moléculas bioactivas con actividad sinérgica.

RESUMEN

Las estrategias empleadas en el apartado 2.1 y 2.2 presentan algunas limitaciones como son la presencia de metales potencialmente tóxicos (Ni(II)) en las estructuras de los MOFs, así como una cinética de liberación de **RAPTA-C** demasiado rápida. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de seguir desarrollando nuevos MOFs para esta aplicación que contengan iones metálicos biocompatibles en sus estructuras (ej. Ca(II), Fe(II), Al(III) o Zn(II)), y que den lugar a interacciones más específicas con las moléculas bioactivas para conseguir una verdadera liberación controlada de las mismas.

Con el fin de desarrollar sistemas de liberación de drogas basados en MOFs biocompatibles, en el apartado 2.3, se ha estudiado la aplicación de la matriz porosa $[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3)]_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \sim 14.5$) **MIL-100(Fe)** para la liberación controlada de dos metalodrogas antitumorales no convencionales de rutenio(II) de tipo “*semi-sandwich*”. El **MIL-100(Fe)** presenta una serie de ventajas inherentes a su composición y estructura que lo hacen un candidato ideal para su aplicación como sistema portador y liberador de moléculas bioactivas: *i*) posee una elevada superficie de BET ($2100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y unos huecos mesoporosos de 2.5 y 2.9 nm, *ii*) está constituido por iones metálicos Fe(III) biocompatibles, *iii*) puede sintetizarse en forma de nanopartículas, *iv*) tiene una elevada estabilidad coloidal en diferentes medios fisiológicos, y *v*) se trata de un material inocuo. Teniendo en cuenta estas características, en primer lugar, se llevó a cabo la encapsulación mediante impregnación del metalofármaco RAPTA-C en las cavidades de esta matriz porosa, consiguiéndose una carga de 0.8 mmol de RAPTA-C por mmol de MOF. Hay que destacar que la liberación de RAPTA-C en fluido corporal simulado se produce de forma escalonada ($t_{1/2} = 2$ horas), según la localización de las moléculas de RAPTA-C en las diferentes cavidades de la matriz, lo que da lugar a diferentes tipos de interacción entre el adsorbato y la red porosa.

Por otro lado, se ha sintetizado y caracterizado el nuevo metalofármaco $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**), que combina la capacidad de los sistemas “*semi-sandwich*” de Ru(II) para inhibir la actividad de proteasas sobreexpresadas en células cancerígenas (grupo de las catepsinas) con la capacidad intercaladora de la antraquinona mitoxantrona. Por tanto, los

ensayos realizados demuestran que este compuesto presenta actividad redox, capacidad de interactuar con diferentes dianas biológicas (como la biomolécula de ADN, aminoácidos N y S dadores y las catepsinas B y D), y actividad anticancerígena frente a varias líneas celulares, incluso frente a líneas celulares resistentes al *cisplatin*. Por otro lado, se ha demostrado que es posible llevar a cabo la incorporación de la especie **Ru_mito** en el MOF **MIL-100(Fe)** (capacidad máxima de carga de 0.4 mmol de **Ru_mito** por mmol de **MIL-100(Fe)**) siguiendo la estrategia sofisticada del “barco en la botella”.

Por otra parte, existe un creciente interés por el desarrollo de nanopartículas para la administración de fármacos. En particular, las ventajas del uso de nanopartículas en biomedicina se debe a su pequeño tamaño, gracias al que pueden atravesar zonas de inflamación del endotelio, epitelio, tumores o penetrar en microcapilares. En este contexto, en el apartado 2.4, se presenta la optimización de la síntesis de nanopartículas de la serie isoestructural de MOFs **ZnBDP_X**. Dichos MOFs están basados en el ensamblaje del ion metálico Zn(II) y los espaciadores orgánicos funcionalizados 1,4-bis(1*H*-pirazol-4-il)-2-X-benceno (H_2BDP_X) en donde X = H, NO₂, NH₂ y OH. Hay que destacar que la elección de esta serie está motivada por dos factores: *i*) el Zn es un elemento esencial para la vida, y *ii*) la formación de enlaces de coordinación robustos Zn-N va a limitar el tamaño de los dominios cristalinos, favoreciendo la formación de nanopartículas de MOFs. En primer lugar, se ha estudiado la evolución del tamaño de partícula de la serie **ZnBDP_X** utilizando diferentes metodologías (ecuación de Scherrer, microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de la luz). Los resultados indican la formación de partículas tetragonales con una tamaño medio de 60 nm para los materiales **ZnBDP_X** (X = H, NO₂ y OH) y la formación de partículas más grandes y ligeramente alargadas (120 x 45 nm) para el compuesto **ZnBDP_NH₂**. Posteriormente, se ha propuesto una estrategia de síntesis asistida por microondas del nanoMOF **ZnBDP_OH** utilizando condiciones más respetuosas con el medio ambiente.

Por otro lado, una vez sintetizada la serie, se ha estudiado la estabilidad coloidal del **ZnBDP_OH**, como caso de estudio, en diferentes condiciones

RESUMEN

biológicas simuladas. Los resultados muestran que las nanopartículas presentan una buena estabilidad coloidal en condiciones intravenosas (en presencia de distintas concentraciones de albúmina), probablemente, debido a la formación de una corona proteica entorno a ellas que evita su agregación. Sin embargo, las nanopartículas de **ZnBDP_OH** tienen tendencia a agregarse en condiciones orales (en presencia de pancreatina o mucina). Debe destacarse que concentraciones de mucina del orden del 0.5% p/v conducen a la formación inmediata de agregados con tamaños del orden de las micras, lo que sugiere cierto grado de bioadhesión de las nanopartículas que podría promover su inserción en la mucosa intestinal tras la administración oral.

Por otra parte, los ensayos de citotoxicidad de los ligandos H_2BDP_X frente a la línea celular de macrófagos murinos (J774), demuestra la toxicidad de los mismos (viabilidad celular <24% a concentraciones 20 μM). A pesar de este resultado, se ha estudiado la adsorción/desorción de los fármacos antitumorales mitoxantrona y RAPTA-C en la serie **ZnBDP_X** como prueba de concepto de la influencia de la funcionalización de la matriz porosa en el proceso de incorporación/liberación de las moléculas bioactivas. La impregnación de la serie **ZnBDP_X** con disoluciones de RAPTA-C y mitoxantrona conlleva la rápida incorporación de los fármacos. Los resultados muestran unos valores de carga de RAPTA-C de 0.55 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP**, 0.22 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP_NO₂**, 0.11 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP_NH₂** y 0.15 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP_OH**. En el caso de la mitoxantrona se alcanzan unos valores de 0.50 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP** y de 0.20 $mmol\ mmol^{-1}$ en **ZnBDP_NH₂**. Estos resultados indican que la capacidad de adsorción de RAPTA-C y mitoxantrona en la serie **ZnBDP_X** sigue la misma tendencia que la superficie de BET de las matrices activadas. Además, es posible llevar a cabo la encapsulación del fármaco mitoxantrona mediante molturación. Por otra parte, debe destacarse que los patrones de difracción de los MOFs cargados varían sustancialmente en comparación con los patrones de los MOFs originales. Este resultado confirma el comportamiento flexible de la red. Finalmente, se ha demostrado que la liberación de RAPTA-C en fluido corporal simulado se produce en dos etapas (menos evidente en el caso del **ZnBDP**). Además, dichos estudios ponen de manifiesto el efecto de la funcionalización

de los ligandos tanto en la cinética como en el porcentaje de metalofármaco liberado. Las matrices **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_OH** muestran claramente una interacción más débil con el RAPTA-C que las especies **ZnBDP** y **ZnBDP_NO₂**. Este hecho se demuestra claramente debido a que las primeras tienen cinéticas de desorción del mismo más rápidas y mayores porcentajes de metalofármaco liberado que las segundas. Este resultado prueba que la adecuada funcionalización de las cavidades de la matriz porosa puede conducir a interacciones específicas con las drogas huésped que permitan controlar la liberación de las mismas.

En resumen, durante la realización de esta Tesis Doctoral se ha demostrado, como prueba de concepto, que las redes metalorgánicas son una opción adecuada para el transporte y liberación de metalofármacos no convencionales. En este contexto, se han sintetizado diferentes MOFs con tamaño de partícula, funcionalización y porosidad adecuados para aplicaciones biológicas, así como un nuevo metalofármaco de rutenio con actividad anticancerígena. Mediante el uso de diferentes estrategias, ha sido posible llevar a cabo la encapsulación de una o varias drogas no convencionales con actividad antitumoral sinérgica (compuesto de Ru(II) de tipo “*semi-sandwich*” y la biomolécula señal NO) en los MOFs seleccionados y, posteriormente, estudiar la liberación de las mismas en distintas condiciones biológicas simuladas (condiciones intravenosas y orales). La gran variabilidad sintética que ofrecen los MOFs ha permitido demostrar que una funcionalización adecuada de las cavidades de la matriz porosa permite establecer interacciones específicas anfitrión-huésped y, por tanto, modular la cantidad y velocidad de liberación de un fármaco. Todos estos resultados, son una prueba de concepto del uso de las redes metalorgánicas para el desarrollo de nuevos tratamientos anticancerígenos más efectivos y, por tanto, con menos efectos secundarios para los pacientes.

SUMMARY

In general, although a wide variety of chemotherapeutic agents are used, in many cases the effectiveness of the treatment is limited by their rapid biodegradation and elimination from the body. Additionally, many interesting therapeutic molecules suffer from important drawbacks, such as low solubility in aqueous media, because of their high molecular weight and/or the presence of hydrophobic groups in their structures. For this reason, they can be recognized and eliminated by the body's immune system. Therefore, the administration of therapeutics agents in patients requires the development of new methods to achieve their transport and release in physiological media, specifically, for a long timeframe and at a controlled rate. The design of new bioactive molecules and intelligent treatments has resulted in the development of new non-toxic delivery carriers, known as controlled drug-delivery systems (DDS). In this regard, a new class of porous inorganic materials known as Porous Coordination Polymers (PCPs) or Metal Organic Frameworks (MOFs) have been recently proposed for this application. MOFs are based on metal ions interconnected through organic linkers, giving rise to an ordered structure of channels and cavities accessible to guest molecules. These compounds have several features that make them good candidates as drug delivery systems, such as: *i)* large pore volumes with high adsorption capacities; *ii)* functionalizable cavities, where host-guest interactions may take place, allowing the reversibility of the adsorption process; *iii)* the possibility of using healthy friendly metals and bioactive compounds as linkers on their frameworks; *iv)* good stability profile for biological applications, so as they remain stable enough to carry out their function and, then, they are removed from the body, preventing endogenous accumulation and their potential toxic effects. As a result of the above-mentioned characteristics, currently, porous coordination polymers can be considered as good candidates for the development of more effective therapies with fewer side effects.

This PhD Thesis is focused on the potential biomedical applications of MOFs. In particular, we have studied the use of these porous matrices as

SUMMARY

delivery systems for non-conventional metallodrugs. Specifically, we have studied the following aspects: *i*) the synthesis and characterization of suitable MOFs for the encapsulation of drugs, *ii*) the stability of these systems in physiological conditions, *iii*) the adsorption/desorption of one or more bioactive molecules with potential synergic antitumor activity in different simulated physiological media and, *iv*) the synthesis of new half-sandwich Ru(II) compounds with anticancer activity. It should be noted that a great effort has been made on the construction of MOFs based on nitrogen ligands containing pyrazole rings, in order to get M-N(pyrazole) coordination bonds, which are more robust than the M-O(carboxylate) ones. This feature is expected to prevent the rapid biodegradation of the porous matrix in the physiological media and, consequently, the massive drug delivery.

Taking into account the above considerations, in section 2.1, we have described the synthesis and characterization of a robust MOF with an adequate porosity for the incorporation of non-conventional Ru(II) based antitumor metallodrugs. In this section, we have designed a bispyrazolate symmetric linker 4,4'-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispypyrazolate that in combination with highly directional octanuclear Ni(II) clusters results on the porous matrix $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'\text{-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispypyrazolato})_6]$. Because of the higher robustness of the M-N(pyrazole) bonds, it was not possible to obtain single crystals large enough to be studied by single crystal X-ray diffraction. Consequently, X-ray powder diffraction analysis was used (in collaboration with Professor Masciocchi' group) to determine the crystal structure of the Ni MOF. It should be highlighted that this is a highly porous structure (with a BET surface area of $1920 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), based on the cubic close packing (CCP) that leads to the formation of n octahedral and $2n$ tetrahedral voids of about 1.6 nm y 1.0 nm inner size, respectively. Moreover, this system has a high stability in physiological conditions. According to these characteristics, we have studied the application of this MOF on the adsorption and posterior release of the middle-size metallodrug ($d \approx 0.9 \text{ nm}$) RAPTA-C $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (pta: 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane). The results show a maximum loading value of 3.97 mmol of RAPTA-C per mmol of MOF as a result of the

incorporation of 2 and 1 RAPTA-C molecules in the octahedral and tetrahedral voids, respectively. Noteworthy, this adsorption process is reversible and RAPTA-C can be delivered in simulated body fluid following a first order kinetic, with a $t_{1/2}$ of release of 25 minutes.

Another common strategy in cancer treatment is using a combination of various drugs, in order to achieve a synergic therapeutic effect. In this sense, in section 2.2, we have studied the application of MOF **CPO-27-Ni**, $[\text{Ni}_2(\text{dhBDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (H_4dhBDC : 2,5-dihydroxyterephthalic acid), with coordinatively unsaturated metal sites, in the development of advanced combined therapies. With this purpose, we have studied in detail the simultaneous adsorption and delivery, in simulated biological conditions, of various non-conventional anticancer therapeutic agents: NO and RAPTA-C. The results show that the activated porous matrix can adsorb 0.23 mmol of RAPTA-C per mmol of MOF and 2.51 mmol of NO per mmol of MOF, simultaneously. Noteworthy, the incorporation and delivery processes for both species are independent as a consequence of the different mechanisms of interaction taking place between the framework walls and the adsorbates: NO directly interacts with the Ni open metal sites (chemisorption) while RAPTA-C is only physisorbed into the pores. When the matrix is suspended in an aqueous solution, NO delivery is nearly instantaneous, while RAPTA-C delivery half time of life is *ca.* 18 min. These results show that the investigated system may be considered as a proof of concept of the feasibility of the concurrent adsorption of bioactive molecules into MOFs. It should be noted that the exploitation of the synergic effect of multiple drugs may lead to advanced combined therapies.

The strategies employed in section 2.1 and 2.2 have certain limitations, such as the presence of toxic metal ions (Ni(II)) in the structure of the MOFs and too fast RAPTA-C kinetics of delivery. This situation prompts the need for the synthesis of new MOFs for drug delivery based on healthy friendly metal ions (i.e. Ca(II), Fe(II), Al(III) or Zn(II)), and with structures able to give more specific interactions with the guest bioactive molecules. The later feature may achieve an appropriated controlled drug delivery during a prolonged period of time.

SUMMARY

In order to develop drug delivery systems based on biocompatible MOFs, in section 2.3, we have studied the application of the porous matrix $[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3)]_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \sim 14.5$) **MIL-100(Fe)** in the controlled delivery of two half-sandwich organometallic Ru(II) based non-conventional antitumor drugs. **MIL-100(Fe)** offers a series of advantages related to its composition and structure, that make it an ideal candidate for a valuable solution in the field of drug-delivery nanocarriers: *i*) **MIL-100(Fe)** is highly porous (BET surface area of $2100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) and shows mesoporous voids of 2.5 and 2.9 nm, *ii*) this MOF is built up from Fe(III) biocompatible metal ions, *iii*) it can be prepared as homogeneous and stable nanoparticles, *iv*) nanoparticles of **MIL-100(Fe)** exhibit an optimal colloidal stability in different physiological media, and *v*) it is a non-toxic and biodegradable material. According to these characteristics, in the first study, we carried out the entrapment of RAPTA-C in the cavities of **MIL-100(Fe)** using an impregnation method. As a result 0.8 mmol of RAPTA-C per mmol of MOF were incorporated. It should be noted that two stages can be distinguished in the delivery of RAPTA-C in simulated body fluid ($t_{1/2} = 2$ hours). This behaviour may be related to the different drug location within the two types of cages and, as a consequence, to the different interactions between the guest molecules and the porous matrix.

On the other hand, we have synthesized and characterized the new metallodrug $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**), which combines the protease activity inhibition features of half-sandwich Ru(II) systems together with the DNA intercalation features of the anthraquinone mitoxantrone. Therefore, **Ru_mito** exhibits redox activity, ability to interact with different biological targets (DNA, N and S donors amino acids and cathepsin B and D) as well as important *in vitro* antitumor activity towards wild type and cisplatin resistant tumour cell lines. On the other hand, it has been proven that the incorporation of **Ru_mito** in **MIL-100(Fe)** is possible (with a maximum loading of 0.4 mmol of **Ru_mito** per mmol of **MIL-100(Fe)**) following a ship-in-a-bottle strategy.

Moreover, there is a special interest on the development of nanoparticles for drug delivery purposes. For this application, nanoparticles offer many

advantages related to their small size, which allow them passing through inflamed endothelium and epithelium tissues, tumours or penetrating into microcapillaries. In this context, in section 2.4, we describe the optimization of the synthesis of nanoparticles of the isorecticular series **ZnBDP_X**, based on the assembly of Zn(II) metal ions and the functionalized organic spacers 1,4-bis(1*H*-pyrazol-4-yl)-2-*X*-benzene (**H₂BDP_X**), where *X* = H, NO₂, NH₂ and OH. It should be noted that the rational selection of this isorecticular series is based on: *i*) Zn is an essential trace element for all form of life, and *ii*) the formation of highly robust coordination Zn-N bonds will limit crystalline domains sizes, enabling the formation of nanocrystalline MOFs. Then, we have studied size particle evolution of **ZnBDP_X** nanoparticles using different methods (Scherrer's equation, scanning electron microscopy and dynamic light scattering). The results show the formation of tetragonal particles with a mean size of 60 nm for **ZnBDP_X** (*X* = H, NO₂ and OH) and more elongated particles of slightly larger size (120 x 45 nm) for **ZnBDP_NH₂** material. Alternatively, an environmentally friendly microwave-assisted solvothermal route was attempted for the synthesis of **ZnBDP_OH** nanoparticles.

In addition, we have investigated the colloidal stability of **ZnBDP_OH**, as a case of study, in different simulated biological conditions. Our results show that **ZnBDP_OH** nanoparticles exhibited quite good colloidal stability in intravenous conditions (at different albumin concentrations), probably, due to the formation of a protein corona on MOF nanoparticles' surface that prevents the aggregation of the particles. However, an important aggregation of **ZnBDP_OH** nanoparticles is observed in oral conditions (when pancreatin or mucin are added to the medium). It should be highlighted that the use of 0.5% w/v of mucin solutions led to a rapid increase of particle size, giving rise to aggregates bigger than 1 micron, suggesting a certain degree of bioadhesion of the nanoparticles that could promote their grafting to the intestinal mucosa after oral administration.

Furthermore, the study of the cytotoxic activity of **H₂BDP_X** ligands towards murine macrophages cell line (J774) showed a low cell viability (<24% using concentrations of 20 μM) suggesting the high cytotoxicity of these linkers.

SUMMARY

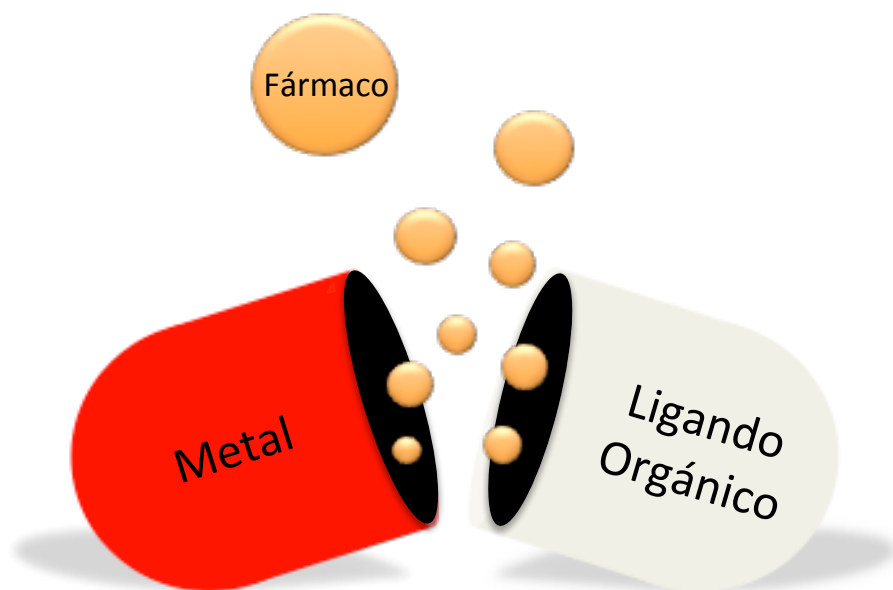
Despite the ligands toxicity, we studied the incorporation/desorption of the antitumor drugs mitoxantrone and RAPTA-C in the **ZnBDP_X** series as a proof of concept of the effect of the framework functionalization on the incorporation/delivery of these bioactive molecules. The impregnation of **ZnBDP_X** with RAPTA-C and mitoxantrone solutions leads to the rapid incorporation of the drugs, with RAPTA-C maximum loading values of 0.55 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP**, 0.22 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NO₂**, 0.11 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NH₂** and 0.15 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_OH**. In the case of mitoxantrone, the results show maximum loading values of 0.50 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP** and 0.20 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NH₂**. These results suggest that the loading capacity of RAPTA-C and mitoxantrone in this series follows the BET surface area trend of the activated matrices. Moreover, it should be noted that the encapsulation of mitoxantrone can be achieved by simple grinding of the solid. On the other hand, it has been shown that the XRP diffraction patterns of the drug-loaded solids considerably differ from the original MOFs patterns. This fact points out the flexible nature of the framework. Finally, it has been proven that RAPTA-C delivery in simulated body fluid takes place in two steps (less clear in the case of **ZnBDP**). Additionally, these studies are indicative of the effect of the ligands functionalization, both on the kinetics delivery and on the total released amount of drug at the equilibrium. **ZnBDP_NH₂** and **ZnBDP_OH** matrices clearly show a weaker interaction with RAPTA-C than **ZnBDP** y **ZnBDP_NO₂** compounds. This fact is proven by the kinetics of delivery, where the former matrices show a faster rate of delivery and higher percentage of released RAPTA-C than the later ones. These results are a proof of the effect of the functionalization of the MOF cavities on the host-guest interactions that may lead to the control of the kinetics of delivery.

Summarizing, in this PhD Thesis, it has been demonstrated, as a proof of concept, that metal organic frameworks are good candidates for the transport and delivery of non-conventional metallodrugs. In this context, different MOFs with appropriated particle size, functionalization and porosity have been synthesized for biological applications. In addition, a novel ruthenium based non conventional metallodrug with anticancer activity has been isolated. On the other hand, different strategies have been employed to incorporate one or more

non-conventional drugs with potential synergic antitumor activity (half-sandwich Ru(II) compound and the signalling molecule NO) into the selected MOFs. Moreover, the drug delivery in different simulated physiological conditions (intravenous and oral conditions) has been investigated. The wide variety of synthetic combinations to give MOFs has allowed us to demonstrate that a proper functionalization of the matrix cavities may lead to specific host-guest interactions, and therefore, to the modulation of the quantity and timeframe of drug delivery. These results may be considered as a proof of concept of the suitability of metal organic frameworks for the development of more effective anticancer treatments with fewer side effects for the patients.

Capítulo 1

Introducción



1.1 Antecedentes y estado actual de la cuestión

La Química Bioinorgánica es una rama de la Química que investiga el papel biológico de los metales incluyendo el estudio de fenómenos naturales - como el comportamiento de las metaloproteínas- así como el de los metales introducidos de forma artificial en medicina y toxicología. Por tanto, esta disciplina es una de las bases para el desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos. Los metales presentan una gran variedad de números de coordinación y geometrías, estados redox accesibles en condiciones fisiológicas, y propiedades termodinámicas y reactivas que pueden modificarse al unirse a los ligandos orgánicos. La versatilidad de estas características hace que los metalofármacos presenten numerosas ventajas frente a los fármacos puramente orgánicos.

El primero en acuñar la palabra “quimioterapia” fue Paul Ehrlich, refiriéndose al uso de agentes químicos con una composición conocida para el tratamiento de enfermedades provocadas por parásitos.¹ Históricamente, la quimioterapia del cáncer empezó con el tratamiento de la metástasis. Esta necesidad radica en el hecho de que el cáncer es un proceso normalmente no localizado, y que no puede ser controlado o erradicado de forma local. Sin embargo, el uso de agentes químicos para el tratamiento del cáncer no fue acogido con demasiado entusiasmo, a pesar de que ya había enfermedades tratadas con fármacos (como la malaria). No fue hasta el cambio de siglo (XIX-XX) cuando tres descubrimientos importantes impulsaron la investigación en el tratamiento del cáncer. El primero se produjo en 1894, con el desarrollo de la cirugía del cáncer, Halsted propuso la extirpación quirúrgica como parte del tratamiento de una paciente con cáncer de mama. En esa misma época, Roentgen descubrió los rayos X, y proporcionó pruebas físicas para el tratamiento de tumores localizados. El tercer avance clínico tiene su base en el trabajo de Ehrlich, quien utilizó a ratones como modelos para enfermedades infecciosas. Estos avances sirvieron como base para el desarrollo de los actuales agentes quimioterapéuticos.

Actualmente, existen numerosos ejemplos de especies metálicas utilizadas para tratar o diagnosticar enfermedades (Tabla 1.1). Estos compuestos pueden llegar a ser tóxicos dependiendo de la dosis administrada. Sin embargo, es difícil clasificar a los metales como tóxicos o no tóxicos, ya que la toxicidad va a depender de la dosis y del tiempo de exposición, entre otros factores. Se ha demostrado que muchos compuestos considerados tóxicos pueden ser beneficiosos para el organismo en pequeñas dosis e incluso presentar efectos terapéuticos en un rango limitado de concentración; mientras que algunos metales considerados no tóxicos, como los elementos esenciales, pueden volverse peligrosos en dosis elevadas (Figura 1.1). Además, un elemento puede ser beneficioso o perjudicial según la naturaleza química que presente. Por ejemplo el selenio, es un elemento esencial, pero el H_2Se es un compuesto muy tóxico.

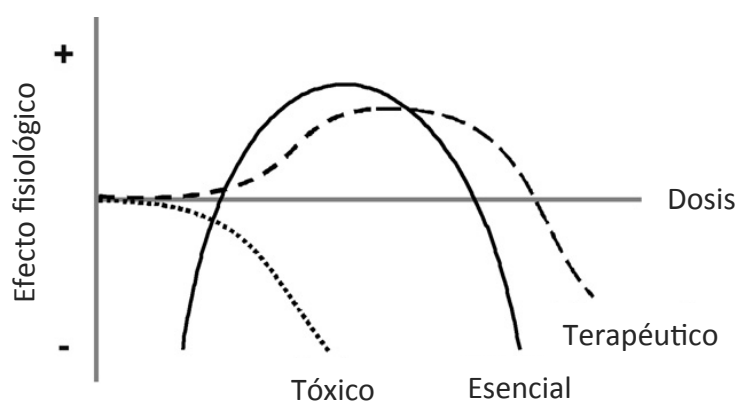


Figura 1.1. Diagrama de Bertrand. Muestra el efecto de la dosis de un elemento sobre la respuesta fisiológica. (G. Bertrand, 8th Int. Congr. Appl. Chem. 1912, 28, 30).²

Por otra parte, debe destacarse que existen numerosos compuestos inorgánicos que participan en procesos biológicos fundamentales: *i)* la activación de algunas proteínas requiere la unión a uno o varios iones metálicos; *ii)* aproximadamente un tercio de todas las proteínas requieren metales para llevar a cabo sus funciones; *iii)* la concentración intracelular y distribución de algunos metales, y su incorporación a las metaloproteínas está estrictamente controlada; *iv)* los metales son fundamentales para la función y estructura de los ácidos nucleicos (ARN); *v)* numerosos compuestos orgánicos utilizados como fármacos necesitan ser activados o biotransformados por iones metálicos, como es el caso de las metaloenzimas. Todo esto sugiere que los

iones metálicos pueden utilizarse para desarrollar nuevas moléculas terapéuticas que presenten formas y estructuras que son imposibles de desarrollar con compuestos basados solo en carbono. Sin embargo, actualmente, más del 99% de los fármacos utilizados son de naturaleza orgánica.³

Elemento	Fármaco	Compuesto activo	Uso Médico
Li	<i>Camcolit</i>	Li_2CO_3	Depresión maniaca o trastorno bipolar
N	Gas hilarante	N_2O	Anestésico
F		SnF_2	Dentífrico
Mg	<i>Magnesia</i>	MgO	Antiácido, laxante
Fe		Fumarato y succinato de Fe(II)	Complemento dietético
Co	<i>Cobaltamin S</i>	Coenzima vitamina B ₁₂	Suplemento vitamínico
Zn		Undecanoato de zinc	Antifúngica (pie de atleta)
Br		NaBr	Sedante
Tc	<i>TechneScan PYP</i>	^{99m} Tc-pirofosfato	Radiografía de huesos
Sb	<i>Triostam</i>	Gluconato de Na y Sb(V)	Antileishmaniasis
I		I_2	Desinfectante
Ba	<i>Baridol</i>	BaSO_4	Contraste para rayos X
Gd	<i>Magnevist™</i>	$[\text{Gd(III)(DTPA)(H}_2\text{O)}]^{2-}$ DTPA = ácido dietilentriaminopentaacético	Agente de contraste, resonancia magnética
Pt	<i>Cisplatino</i>	<i>cis</i> - $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$	Anticancerígeno
Au	<i>Auranofin</i>	$\text{Au(I)}(\text{PEt}_3)(\text{acetiltioglucoza})$	Fármaco para la artritis
Bi	<i>De-Nol</i>	$\text{K}_3[\text{Bi(III)(citratro)}_2]$	Antiácido, tratamiento de úlceras.

Tabla 1.1. Algunos ejemplos de elementos y compuestos inorgánicos con uso médico.

Desafortunadamente, el cáncer es la tercera causa de muerte en países desarrollados.⁴ Uno de cada ocho europeos desarrollará cáncer durante su vida. A pesar del aumento de la incidencia de casos de cáncer, la esperanza de vida de los enfermos está aumentando en los últimos años. Este hecho se debe a la mejora de los tratamientos médicos utilizados, en concreto al descubrimiento casual del metalofármaco *cis*-diclorurodiamminoplatino(II)

(cisplatino, CDDP) activo frente a tumores sólidos, que impulsó el desarrollo de nuevos fármacos de naturaleza inorgánica para el tratamiento del cáncer.

Por otro lado, existen numerosos compuestos bioactivos con actividad terapéutica que poseen limitaciones en cuanto a su farmacocinética. Muchos de estos compuestos son eliminados rápidamente por el organismo, por lo que se necesita utilizar dosis muy elevadas para que sean efectivos. Consecuentemente, la poca especificidad del tratamiento con dichos compuestos, conlleva el desarrollo de numerosos efectos secundarios. Además, algunos compuestos bioactivos presentan una baja solubilidad e incluso pueden provocar resistencia tras una administración prolongada. Como consecuencia de estas limitaciones, la administración de moléculas bioactivas requiere el desarrollo de nuevos métodos que consigan una liberación en medio fisiológico de forma específica, prolongada y a un ritmo controlado, reduciendo los efectos secundarios y aumentando la efectividad del tratamiento.

En este sentido, en los últimos años, se han propuesto diversos materiales capaces de almacenar, transportar y liberar moléculas bioactivas, tales como liposomas, polímeros, dendrímeros, micelas, carbones activos, zeolitas y sílices mesoporosas, entre otros. Asimismo, recientemente, se han propuesto un nuevo tipo de materiales porosos híbridos orgánicos-inorgánicos para esta aplicación: los Polímeros de Coordinación Porosos (PCPs, llamados también MOFs: Redes Metalorgánicas). Estos compuestos presentan algunas características que los hacen prometedores como sistemas de liberación de fármacos: *i)* un elevado volumen de poro con una alta capacidad de adsorción; *ii)* la posibilidad de funcionalizar de forma adecuada los poros, donde pueden tener lugar interacciones matriz-huésped que permitan la reversibilidad del proceso de adsorción; *iii)* la posibilidad de utilizar metales biocompatibles y ligandos en sí mismos bioactivos para su síntesis; *iv)* una estabilidad adecuada para aplicaciones biológicas, de forma que son lo suficientemente estables para liberar el fármaco adsorbido en el tiempo deseado, pero que finalmente se degradan en el medio biológico, evitando la bioacumulación.

Como resultado de los factores anteriormente mencionados, los polímeros de coordinación porosos se consideran, hoy día, buenos candidatos para desarrollar terapias más efectivas y respetuosas con los pacientes. Sin embargo, aunque la versatilidad de estos materiales los hace muy prometedores para la liberación controlada de fármacos, la baja estabilidad de algunos de los MOFs ensayados en medios fisiológicos y/o la presencia de iones metálicos tóxicos en su composición hacen necesaria la búsqueda de MOFs alternativos.

1.2 Metalodrogas antitumorales

Aunque los compuestos metálicos se llevan utilizando desde hace más de 5000 años para el tratamiento de diferentes dolencias, el descubrimiento de la actividad anticancerígena del *cisplatino* ha impulsado de forma considerable el estudio de la química de la coordinación y de las propiedades redox de los metales en medios fisiológicos. Los centros metálicos, cargados positivamente, se unen favorablemente a biomoléculas cargadas negativamente, como por ejemplo ácidos nucleicos y proteínas. Por lo tanto, el uso de los metales como fármacos tiene un gran potencial.^{2b}

Sin embargo, el desarrollo de los compuestos de coordinación para uso terapéutico no es algo trivial. La acumulación de las especies metálicas en el cuerpo, bioacumulación, puede tener efectos perjudiciales para la salud, llegando a provocar enfermedades e incluso la muerte. Por lo tanto, antes de desarrollar un posible metalofármaco debe tenerse en cuenta la biodistribución y eliminación de los compuestos de coordinación, así como su farmacología. Generalmente, la respuesta fisiológica favorable a un fármaco debe demostrarse en primer lugar mediante estudios *in vitro* con moléculas diana (proteínas, enzimas, ADN, etc.), células y tejidos, así como *in vivo* (modelos animales). Posteriormente, se llevan a cabo los ensayos clínicos, que están divididos en tres fases. En la fase I, se estudia la seguridad del fármaco con un grupo reducido de pacientes, así como la dosis máxima tolerable. En la fase II, se estudia la aplicación de un determinado fármaco para una enfermedad concreta. Es la fase que lleva más tiempo y en ella se estudian un gran número de pacientes. En la fase III, se estudia el uso del fármaco en combinación con otros fármacos, tal y como se tratan muchas enfermedades, entre ellas el cáncer.⁵

El cáncer, o neoplasia maligna, son un conjunto de enfermedades provocadas por el cambio en un grupo de células normales, de forma que se dividen y crecen de forma autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos (Figura 1.2). El crecimiento incontrolado da lugar a un abultamiento, llamado tumor. Se conocen alrededor de 200 tipos de cánceres que afectan a

humanos y se clasifican en tumores benignos o malignos.⁶ Concretamente, los tumores benignos no invaden tejidos cercanos y no se esparcen a través del cuerpo. Dentro de los tumores malignos o cánceres, hay cuatro subtipos según el tejido del que procedan: *carcinoma*, neoplasia maligna de origen epitelial (80%); *sarcoma*, cáncer que deriva del tejido mesenquimatoso o mesodermo; *glioma*, tumor que proceden del tejido nervioso; y *leucemia* o linfoma, cáncer hematológico derivado del tejido linfoide y el mieloide.⁷

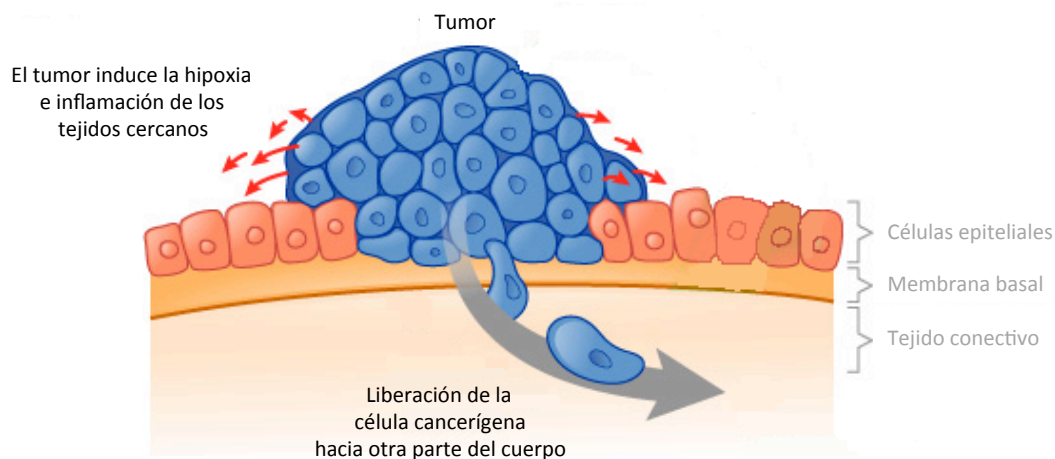


Figura 1.2. Crecimiento incontrolado y liberación de células cancerosas al torrente sanguíneo. (<http://www.bergenbio.com>).

El tipo de tratamiento utilizado contra el cáncer depende de varios factores, como por ejemplo las características de la persona afectada, la ubicación del tumor, la extensión, etc. El tratamiento puede consistir en uno o varios procesos terapéuticos: cirugía, radioterapia, quimioterapia, etc. La gran mayoría de enfermos de cáncer se tratan mediante quimioterapia. La quimioterapia se basa en el empleo de fármacos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, y tiene como función impedir la reproducción de las células cancerosas y conducir a la muerte celular programada (apoptosis). Dichos fármacos se denominan medicamentos citostáticos o citotóxicos. En este sentido, los metales y compuestos de coordinación son conocidos por afectar al proceso celular de forma drástica. Los metales no solamente afectan a procesos naturales, tales como la división celular o la expresión genética, sino que intervienen en otros procesos, como la toxicidad, la carcinogénesis y la química antitumoral. Sin embargo, la principal limitación que presenta este

tipo de fármacos es la inespecificidad, puesto que afectan tanto a células cancerosas como a células sanas.

En los últimos 30 años, los fármacos basados en platino, sobre todo el *cisplatino* y el carboplatino, *cis*-[Pt(CBDCA)(NH₃)₂] (CBDCA: 1,2-ciclobutanodicarboxilato), son los agentes quimioterapéuticos utilizados por excelencia para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Sin embargo, debido a que estos fármacos causan importantes efectos secundarios, es necesario el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos que mejoren la efectividad y especificidad del tratamiento.

1.2.1 Del platino al rutenio

Uno de los mayores descubrimientos en el uso de metales para el tratamiento de enfermedades fue el descubrimiento de forma casual del poder antitumoral del *cisplatino*. En 1956, el profesor Barnett Rosenberg y sus colaboradores estaban interesados en la posible relación entre el huso mitótico presente en células mitóticas y la orientación de limaduras de hierro alrededor de un campo magnético.⁸ Para el estudio se eligió el organismo procarionta, *Escherichia coli*, que se incubó en un medio expuesto a electrodos de platino. Bajo estas condiciones, se observó que las bacterias detenían su replicación lo que se achacó a la formación del compuesto de coordinación *cis*-diamminodicloruroplatino(II) formado por reacción del electrodo con el electrolito empleado.⁹ Posteriormente, se estudió este tipo de compuestos de Pt como anticancerígenos, dando lugar al descubrimiento de la actividad antitumoral de esta metalodroga.¹⁰ Los primeros estudios *in vitro* revelaron que la forma *cis* era el único estereoisómero activo frente a células tumorales y que éste mantenía su geometría de coordinación al someterlo a un entorno biológico. En 1971, se realizaron los primeros ensayos clínicos que de nuevo corroboraron los resultados anteriores.

Este descubrimiento dio lugar al uso del estereoisómero *cis* como anticancerígeno en todo el mundo. Actualmente, el 50–70% de los pacientes con cáncer son tratados con fármacos basados en *cisplatino*: es el fármaco

principal en el tratamiento de cáncer de ovario, testículo y vejiga; se utiliza en combinación con otros fármacos para el tratamiento de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, colón, vejiga, cuello del útero y útero. También se utiliza como tratamiento secundario para cánceres avanzados de pecho, páncreas, hígado, riñón, próstata, y contra glioblastoma, melanoma metastásico y frente a mesotelioma peritoneal o pleural.¹¹ Hay que destacar que cuando empezaron los primeros ensayos clínicos con *cisplatino*, el diagnóstico de cáncer testicular suponía una muerte segura. El éxito obtenido con el uso del *cisplatino* en el tratamiento del cáncer testicular, con un índice de curación del 90%, dio lugar a la aprobación de su uso como fármaco por la Agencia de alimentos y medicamentos, FDA (*Food and Drug Administration*) en 1978.⁸

Sin embargo, la inespecificidad de la interacción del *cisplatino* con el objetivo biológico deseado (ADN del núcleo celular), da lugar a una baja selectividad del tratamiento lo que conlleva numerosos efectos secundarios adversos (náuseas, vómitos, nefrotoxicidad, alopecia, descenso de leucocitos, etc.) y al desarrollo de resistencia. Además, hay que destacar que el *cisplatino* es inactivo frente a muchas líneas celulares cancerígenas y en cánceres secundarios (metástasis). Finalmente, su limitada solubilidad en disoluciones acuosas, que es crucial para administraciones intravenosas, es otro de los inconvenientes del uso de este metalofármaco.

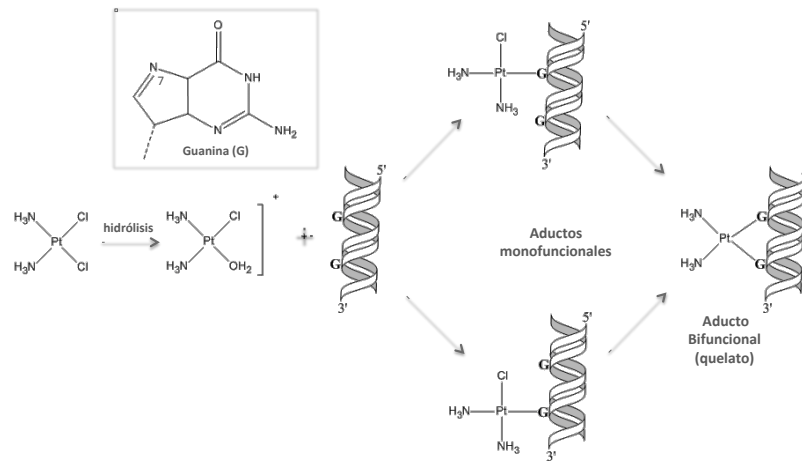
Con el fin de superar estos inconvenientes descritos anteriormente, se desarrollaron otros metalofármacos antitumorales basados en compuestos de coordinación de Pt: los compuestos de platino de segunda generación. De forma general, los compuestos de platino de segunda generación con propiedades antitumorales, presentan la fórmula *cis*-[PtL₂X₂], donde L es una amina y X es un grupo saliente (haluros o ligandos tipo carboxilato). Muchos derivados del *cisplatino* que inhiben la replicación celular presentan un grupo N-H, que es responsable de la formación de enlaces de hidrógeno durante la aproximación a la molécula diana: el ADN. Sin embargo, casi todos los análogos del *cisplatino* preparados que satisfacen esta fórmula presentan un

mecanismo de acción similar al del *cisplatin*o, y por lo tanto, los tumores desarrollan una resistencia parecida.¹³

Dentro de este grupo, el primer compuesto análogo al *cisplatin*o que fue sintetizado con éxito es el carboplatino (*cis*-[Pt(C₆H₆O₄)(NH₃)₂]) *cis*-diammino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino(II).¹² Con el fin de desarrollar un compuesto con una menor toxicidad que el *cisplatin*o, se sustituyeron los ligandos cloruro por otro ligando más inerte, el ciclobutanodicarboxilato. El carboplatino, por tanto, es menos reactivo, presenta menos efectos secundarios y es más fácil de administrar en terapias combinadas. La diferencia entre la farmacocinética que presenta el carboplatino y el *cisplatin*o se debe a la menor tasa de conversión del carboplatino en las diferentes especies reactivas. Estudios de interacción entre el carboplatino y el ADN indican que la reacción conlleva la apertura del quelato y posterior unión del centro metálico a las nucleobases del ADN. La sustitución de los ligandos monodentados cloruro por el ligando quelato ciclobutanodicarboxilato estabiliza al sistema frente a la hidrólisis con la consiguiente disminución de la nefrotoxicidad sin afectar a su capacidad anticancerígena. Por lo tanto, los pacientes toleran mejor el tratamiento, pudiendo administrarse dosis mayores que en el caso del *cisplatin*o.¹³ Para el tratamiento del cáncer de ovario, el carboplatino presenta un comportamiento similar al *cisplatin*o. Sin embargo, el *cisplatin*o es más activo frente al cáncer de testículo y cabeza y cuello. Diferentes estudios han demostrado que los grupos amino, cinéticamente inertes, son los que determinan la estructura del aducto que se forma entre el Pt y ADN. Esto hecho explica que el *cisplatin*o y el carboplatino tengan un patrón similar frente a ciertos tumores.

Con el fin de desarrollar tratamientos contra el cáncer más selectivos y eficaces, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de acción del *cisplatin*o y los mecanismos de resistencia adquirida. En primer lugar, el *cisplatin*o se administra por vía intravenosa, a pesar de su baja solubilidad. Una vez en el torrente sanguíneo, difunde a través de la membrana celular hasta el citoplasma. Hay que destacar que el *cisplatin*o presenta una gran estabilidad cinética, con una tasa de intercambio de ligandos muy lenta, por lo que es

capaz de llegar hasta las células cancerígenas sin sufrir ninguna modificación.¹³ Dentro de la célula la concentración de iones cloruro es mucho menor (≈ 0.004 M) que la de la sangre (0.1 M), por lo que una o dos moléculas de agua desplazan a los ligandos cloruro y el *cis*platino pasa a ser un acuacomplejo catiónico.⁹ El resultado final es la formación de la especie activa, $cis-[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$, que es la que reacciona con las dianas celulares. Muchos componentes celulares incluyendo el ARN, proteínas, ADN, fosfolípidos de membrana y microfilamentos del citoesqueleto pueden reaccionar con el *cis*platino.¹⁴ Tras perder los cloruros la especie catiónica reacciona de forma mayoritaria con las nucleobases del ADN, en concreto, el Pt se coordina al N7 de las bases púricas (guanina y adenina) desplazando así los ligandos cloruro y agua (Esquema 1.1). Como resultado, se forma un aducto bifuncional entre la unidad $\{cis-Pt(NH_3)_2\}$ y dos nucleobases adyacentes de la misma hebra. Se pueden producir varios tipos de lesiones en el ADN, sin embargo, el entrecruzamiento intrahebra 1,2-d(GpG) es la lesión más común (> 70%), seguida por el entrecruzamiento intrahebra 1,2-d(ApG) (20%). Los entrecruzamientos intrahebra 1,3-d(GNG) (5-10%) e interhebra 1,2-d(GpG) y la formación de monoadductos, son lesiones menos comunes. Estudios de difracción de rayos X desarrollados por Lippard y colaboradores¹⁵ demostraron que el centro metálico se localiza en el surco mayor del ADN, y que la formación del aducto intrahebra 1,2-d(GpG) pliega la doble hélice de ADN con un ángulo de 45° alrededor de la posición de platinación (Figura 1.3). Esta modificación en la biomolécula de ADN es reconocida por varios grupos de proteínas, como por ejemplo las proteínas cromosómicas de alta movilidad (HMG), que se unen al ADN y lo protegen de ser reparado.¹⁶



Esquema 1.1. Formación del entrecruzamiento intrahebra 1,2-d(GpG) entre el ADN y el cisplatino. En el recuadro se muestra la estructura de la guanina y la posición N7, donde se une el Pt.

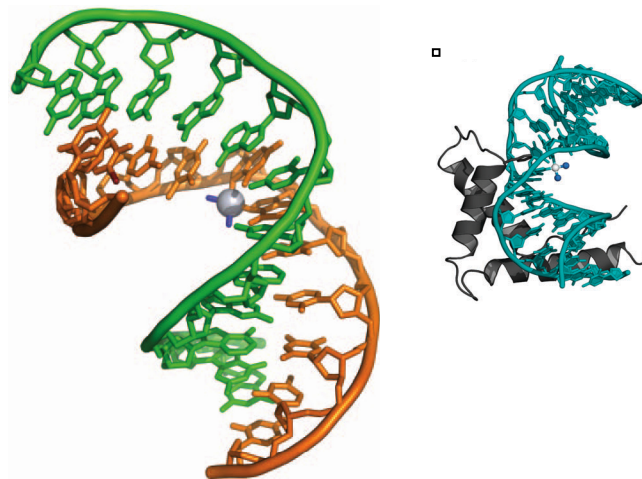


Figura 1.3. Estructura cristalina del cisplatino y un fragmento de ADN d(CCU^{Br}CTG*G*TCTCC) - d(GGAGACCAGAGG) (donde G* es la guanina unida al Pt) que contiene el entrecruzamiento intrahebra 1,2-d(GpG). Se puede apreciar el plegamiento de la hebra de ADN alrededor del surco mayor. En el recuadro se muestra la interacción del aducto Pt-ADN con la proteína de alta movilidad HMGB1.

Uno de los inconvenientes de los tratamientos con *cisplatino* es el desarrollo de resistencia. La resistencia a la quimioterapia se puede dividir en resistencia intrínseca del fármaco, donde la administración de la droga no tiene ningún efecto sobre el paciente, y resistencia adquirida, en la que se observa una respuesta normal al principio del tratamiento, pero que disminuye con rapidez e incluso desaparece tras un periodo de tiempo. En quimioterapia, y en otras enfermedades, la resistencia a los fármacos (MDR, *Multidrug Resistance*) es un factor muy importante que determina el éxito del tratamiento. Existen

diversos mecanismos celulares que dan lugar a MDR. Los más importantes son: *i*) la disminución en la entrada del fármaco a través de la membrana celular, disminuyendo o bloqueando el flujo; *ii*) el aumento en los mecanismos de reparación del ADN; *iii*) el aumento en la tasa de inactivación del fármaco al unirse a ciertas proteínas, como las metalotioneínas o la glutatión-S-transferasa; y *iv*) la unión al fármaco de moléculas pequeñas como glutatión. Asimismo, estudios recientes demuestran que las células con resistencia a fármacos sobreexpresan ciertas proteínas que disminuyen la concentración celular de los agentes quimioterapéuticos, como por ejemplo las P-glicoproteínas (Pgp) o las proteínas MRP1.¹⁷

Las circunstancias expuestas anteriormente son una clara motivación para seguir desarrollando fármacos alternativos más específicos, que den lugar a un menor número de efectos secundarios y que, por tanto, sean más bondadosos con los pacientes. En este contexto, surgieron los compuestos de platino de tercera generación. A diferencia del descubrimiento casual del *cis*platino, el diseño de estos compuestos se basa en un desarrollo racional, es decir, se sintetizan nuevos compuestos con el fin de desencadenar una respuesta química específica.⁵ El primer derivado del *cis*platino de tercera generación desarrollado con éxito fue el oxaliplatino ([DACH-(oxalato)platino(II)] [(1*R*,2*R*)-1,2-diamminociclohexano]-(etanodionato-O,O')platino(II)). Este compuesto es activo frente a líneas celulares resistentes al *cis* y al carboplatino, como por ejemplo el cáncer colorectal. La importancia de su desarrollo se demuestra en que, recientemente, su uso terapéutico se ha regulado a nivel mundial. Varios estudios demuestran que el oxaliplatino presenta un modo de acción diferente al *cis*platino, que está relacionado con las proteínas de reconocimiento molecular y el proceso de formación del aducto Pt-ADN. Cuando el oxaliplatino reacciona con el ADN se producen menos interacciones interhebra (las más tóxicas). Este hecho demuestra la importancia del ligando amino portador que modifica de forma significativa la reactividad de los compuestos de Pt con la molécula de ADN.

A pesar de que estos compuestos de platino son poco específicos y han tardado alrededor de 30 años en ser aprobados, su importancia queda

demostrada por el hecho de que en la actualidad siete fármacos basados en platino están disponibles comercialmente. Dos ejemplos, en fase II de los ensayos clínicos, son el lobaplatino (D-10466) *cis*-[*trans*-1,2-ciclobutanbis(metilamina)-*N,N'*]-[(2*S*)-lactato-*O1,O2*]-platino(II), que está basado en el derivado amino 1,2-bis(metilamina)ciclobutano y lactato como grupo saliente; y el DWA2114R ((-)-(*R*)-[2-(aminometil)pirrolidina](1,1-ciclobutanodicarboxilato)-platino(II)), que tiene como grupo portador la 2-(aminometil)pirrolidona. En ambos casos, se ha observado que se supera la resistencia al *cis*platino en el tratamiento del cáncer de ovario. Además, se ha demostrado que estos compuestos son activos frente al cáncer avanzado de cabeza y cuello, y frente a cáncer de pulmón de células pequeñas.¹⁸

De forma general, se había aceptado que para que un compuesto de platino fuera activo frente a tumores, éste debía presentar una configuración *cis*. Tras demostrar que el *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] no presentaba actividad antitumoral, los compuestos *trans* habían caído en el olvido. Sin embargo, se ha visto que este dogma no es válido, ya que tres tipos diferentes de compuestos *trans* presentan actividad anticancerígena. Varios grupos de investigación han demostrado que la sustitución del grupo amino por aminas aromáticas,¹⁹ alquilaminas e isopropilaminas,²⁰ e iminoéteres²¹ conducía a compuestos *trans*-Pt(II) con una citotoxicidad importante, similar a la del *cis*platino. El mecanismo de acción que presentan este tipo de compuestos depende en gran medida del ligando portador. Examinando la gran variedad de aminas utilizadas para sintetizar compuestos *trans* citotóxicos, parece ser que el *trans*platino en sí mismo es una excepción. Se ha demostrado que los compuestos *trans*-Pt(II) no dan lugar a resistencia adquirida y son activos frente a líneas celulares resistentes al *cis*platino. Este comportamiento diferente puede deberse a que para los compuestos *trans*-Pt(II) las restricciones geométricas impiden la formación de entrecruzamientos intrahebra 1,2, mientras que el entrecruzamiento 1,3-(GdC) interhebra está favorecido.²² Finalmente, estudios recientes desarrollados por Brabec y Sadler han demostrado que el *trans*platino es igual de citotóxico que el *cis*platino cuando las células tratadas se irradian con luz ultravioleta.²³

Por otro lado, desde los primeros estudios desarrollados por Rosenberg y sus colaboradores se sabía que los compuestos de Pt(IV) presentaban actividad antitumoral. Sin embargo, con la aprobación del uso del *cisplatin* a nivel mundial, el desarrollo de fármacos de Pt se centró en los complejos de Pt(II). En los últimos 15 años, los deseos de desarrollar metalodrogas de Pt de administración oral, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes, ha reiniciado el interés por los fármacos de Pt(IV) más solubles que el *cisplatin*.³ Debe destacarse que los complejos de Pt(IV) son más inertes frente a reacciones de sustitución de ligandos que los de Pt(II) y presentan una elevada estabilidad cinética por lo que influyen de forma significativa en las reacciones redox del entorno biológico. Los compuestos de Pt(IV) se activan por reducción: el Pt(IV), más inerte, se reduce a Pt(II) antes de reaccionar con el ADN. Esta cualidad los hace buenos candidatos para tratamientos orales.²⁴ El primer ejemplo de complejo de Pt(IV) desarrollado con éxito es el *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)(ciclohexilamina)(AcO)₂Cl₂] (JM216 o satraplatino). El satraplatino es el primer profármaco de platino administrado oralmente que ha entrado en estudios clínicos.^{2b} Actualmente, se encuentra en la fase III de los ensayos clínicos y se está investigando su posible uso en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado.

Por último, teniendo en cuenta que el *cisplatin* y sus análogos son capaces de formar entrecruzamientos con el ADN intra e interhebra, se pensó en la posibilidad de diseñar y sintetizar metalofármacos más sofisticados con la capacidad de formar otro tipo de aductos con el ADN. Esto significaría que a nivel celular tendría lugar un reconocimiento diferente por parte de las proteínas, reflejando un patrón de actividad antitumoral único. Siguiendo esta hipótesis Farrell y sus colaboradores desarrollaron una serie de compuestos polinucleares en los que los centros de platino se coordinan a cadenas de tipo diamina puente flexibles.²⁵ Estos compuestos no son únicamente polinucleares, sino que también son policatiónicos. Desarrollando estos compuestos más largos, se consigue provocar lesiones en la doble hélice de ADN que serían imposibles para el *cisplatin*. Los aductos más comunes que forman estos compuestos polinucleares de Pt son los inter o intrahebra separados por más de 4 bases (Figura 1.4). Debe destacarse que estos compuestos son más

potentes que el *cisplatin* y exhiben actividad frente a una gran variedad de tumores, incluyendo tumores resistentes al *cisplatin*. El mejor ejemplo de este tipo de compuestos es el BBR3463, un compuesto trinuclear que se encuentra en la fase II de los ensayos clínicos.⁵

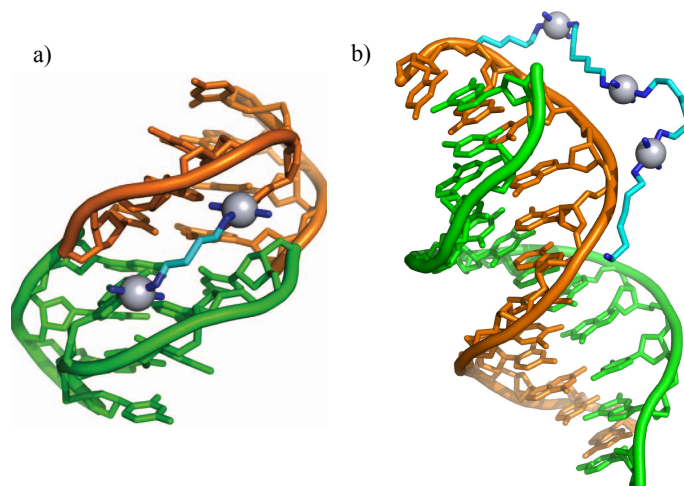


Figura 1.4. a) Estructura obtenida a partir de datos de RMN entre el compuesto BBR3463 y un fragmento de ADN d(CATG*CATG)-d(CATG*CATG), donde G* es la guanina N7 unida al compuesto de Pt. Se puede ver la formación de un entrecruzamiento d(G)-d(G) interhebra. b) Estructura de rayos X de un compuesto de triplatino, *TriplatinNC*, y un fragmento de ADN.

Según todo lo expuesto hasta ahora, el desarrollo de complejos metálicos como fármacos no es una tarea fácil. Se ha demostrado que el tratamiento con algunos complejos de platino conlleva numerosos efectos secundarios adversos y que existen muchas líneas celulares frente a las que estos compuestos son inactivos. Estas limitaciones son el origen de la búsqueda de otros agentes antitumorales basados en otros metales más efectivos y menos tóxicos. En el desarrollo de fármacos de naturaleza inorgánica han de considerarse factores como la biodistribución y bioacumulación del metal, así como su especificidad farmacológica. La variabilidad en la geometría de coordinación, reactividad, estado de oxidación, cinética de intercambio de ligandos, o simplemente la capacidad de reemplazarse por otros metales esenciales, es la base para generar compuestos con una gran diversidad farmacológica.²⁶ Los iones metálicos son capaces de dar lugar a enlaces de coordinación lábiles o robustos, con números de coordinación que van desde el 1 al 12, incluso con numerosas geometrías, generando compuestos lineales, trigonales, tetraédricos,

octaédricos, etc. Por tanto, el empleo de otros iones metálicos diferentes del Pt puede conducir a nuevas moléculas terapéuticas con propiedades y estructuras completamente diferentes a los de los compuestos basados en Pt.

En este sentido, recientemente, han surgido una serie de compuestos organometálicos de Ru, Rh, Ir, Au, Ag, Pd, Ti y Os que presentan una importante actividad antitumoral.²⁷ Concretamente, estudios realizados en los años 70 y 80 pusieron de manifiesto la actividad antitumoral de algunos complejos de Ru(II), Ru(III) y Ru(IV) con ligandos como amina, dimetilsulfóxido, imina, poliaminopolicarboxilato y ligandos *N*-heterocíclicos. Los primeros estudios sobre los compuestos de rutenio, metal de transición del grupo del platino, sugerían que las propiedades anticancerígenas de estos compuestos estaban relacionadas directamente con su interacción con el ADN, como en el caso del platino. Sin embargo, actualmente se sabe que el rutenio causa menos efectos secundarios que el Pt ya que presenta unas propiedades químicas y bioquímicas diferentes. En primer lugar, el rutenio parece acumularse preferentemente en masas neoplásicas, en detrimento de su acumulación en tejidos sanos. El rutenio es capaz de mimetizarse con el hierro y unirse a una serie de biomoléculas, como la transferrina o la albúmina, que son responsables de la solubilización, transporte y detoxificación del hierro en mamíferos.²⁸ En el caso del platino, la unión de sus complejos metálicos a las proteínas plasmáticas contribuye al desarrollo de efectos secundarios, mientras que la unión de los compuestos de rutenio a la transferrina es un proceso básico en su modo de acción.²⁹ Las células cancerígenas presentan una gran cantidad de receptores de transferrina, ya que la tasa de división celular en los tejidos cancerosos es mayor que en los tejidos sanos, y por lo tanto es necesario un aporte mayor de oxígeno. Asimismo, estudios realizados *in vivo* con rutenio marcado utilizando células cancerígenas y sanas, han demostrado que la entrada de rutenio en las células cancerígenas es 6 veces mayor que en células sanas (Figura 1.5).³⁰ Otro factor que determina la baja toxicidad de los compuestos de rutenio es su efectividad suprimiendo la respuesta inmune, ya que inhiben la proliferación de las células T.³¹ Por lo tanto, podemos afirmar que la baja toxicidad que presentan los compuestos de rutenio se debe,

principalmente, a su capacidad de mimetizarse con el hierro, y a la entrada preferente en células cancerígenas frente a células sanas.

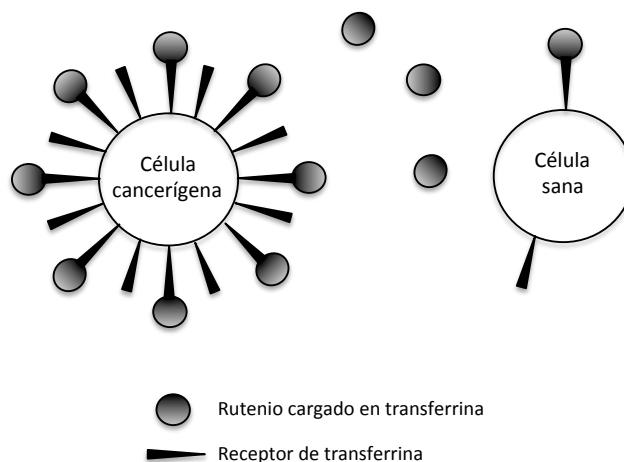


Figura 1.5. Representación esquemática de la entrada selectiva de los compuestos de rutenio en las células cancerígenas. Las células cancerígenas presentan una mayor cantidad de receptores de transferrina en su membrana.

El rutenio presenta estados de oxidación II, III y IV accesibles en condiciones fisiológicas. Cuando el rutenio presenta estos estados de oxidación, forma compuestos de coordinación hexacoordinados con una geometría preferentemente octaédrica. Los complejos de Ru(III) son biológicamente más inertes que los de Ru(II) y Ru(IV). El potencial redox del Ru puede modificarse al variar los ligandos a los que está unido. En sistemas biológicos, el glutatión, el ácido ascórbico y algunas proteínas de transferencia de electrones son capaces de reducir el Ru(III) y el Ru(IV), mientras que el oxígeno y las citocromo oxidases son capaces de oxidar el Ru(II) (Figura 1.6). Con el fin de mejorar la efectividad anticancerígena de los compuestos de rutenio, se han sintetizado compuestos basados en la activación por procesos redox. Por ejemplo, existen fármacos que se administran en la forma inactiva Ru(III) y que en un ambiente reductor ácido, como los tejidos cancerosos, son activados a Ru(II). Normalmente, las células presentan una concentración baja de oxígeno, un elevado nivel de glutatión y un pH menor que las células sanas, lo que produce un ambiente fuertemente reductor. Esta activación por reducción, no solo conlleva una actividad selectiva frente a células tumorales, sino que dirige su actividad citotóxica a tumores con hipoxia, que son los que presentan una mayor resistencia frente a la quimo y la radioterapia.³²

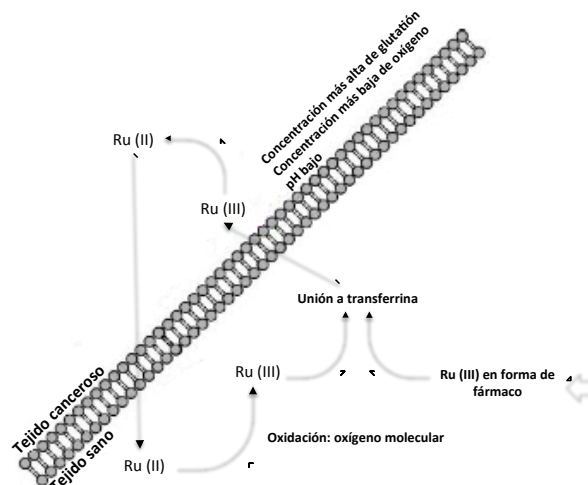


Figura 1.6. Cambio en el estado de oxidación del rutenio en células cancerígenas y sanas. El ambiente reductor de las células cancerígenas da lugar a la formación de Ru(II), que es más activo que el Ru(III). Los compuestos de Ru(III) son esencialmente profármacos que se activan por reducción al llegar a las células cancerígenas.

Por otro lado, el éxito de los compuestos de Pt(II) como anticancerígenos se debe a su gran estabilidad, como consecuencia de su lenta cinética de intercambio de ligandos. Los compuestos de platino presentan tiempos de reacción que van de minutos a días (constantes de 10^{-3} a 10^{-2} s $^{-1}$), a diferencia de otros metales con tiempos de reacción de microsegundos a segundos (constantes de 10^{+2} a 10^{+8} s $^{-1}$). En ese sentido, los compuestos de Ru(II) son mucho más lábiles que los de Pt(II) y presentan cinéticas de intercambio de ligandos más rápidas que las de los compuestos de Pt(II) en medio biológico.³³ Las reacciones de intercambio de ligandos son un factor determinante en la actividad biológica de los compuestos organometálicos, ya que sólo unos pocos fármacos basados en metales son capaces de llegar hasta su objetivo biológico sin ser modificados. Muchos sufren interacciones con macromoléculas, proteínas, compuestos de azufre y/o agua. En este sentido, la búsqueda de sistemas de encapsulación adecuados para estos metalofármacos que permitan su administración a la diana deseada es de un enorme interés actual por lo que se ha definido como uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral.

En general, la actividad anticancerígena de un fármaco reside en su habilidad para producir la apoptosis, o muerte celular programada, de las

células tumorales. La apoptosis es un proceso complicado en el que la célula “se suicida” de forma controlada, sin causar daños a las células que la rodean. Las células apoptóticas se diferencian en cuerpos apoptóticos esféricos que son reconocidos y eliminados por los linfocitos. La necrosis es otro proceso de muerte celular, menos controlado, y que causa inflamación y daño a las células colindantes por lo que no es deseable que tenga lugar durante un tratamiento terapéutico. Existen muchos mecanismos capaces de iniciar la apoptosis celular relacionados con la interacción de los fármacos con el ADN y las proteínas celulares. En el caso particular de los compuestos de platino, su citotoxicidad se basa en la interacción mediante enlaces de coordinación del Pt con el ADN, formando aductos que derivan en la apoptosis celular. Asimismo, se ha demostrado que los compuestos de rutenio son capaces de inhibir la replicación del ADN, inducir efectos mutagénicos, unirse al ADN nuclear y reducir la síntesis de ARN, por lo que la biomolécula de ADN es también una diana importante para los fármacos basados en rutenio. Como en el caso del platino, el rutenio se coordina al N7 de las bases púricas (normalmente guanina) del ADN. Sin embargo, también es posible la unión a la adenina, citosina y uracilo. Es de destacar que dicha interacción con el ADN tiene lugar mediante la formación de enlaces cruzados entre las dos hebras de ADN – posiblemente favorecidas por las restricciones estéricas impuestas por la geometría octaédrica de estos compuestos—. Este mecanismo difiere del que presenta el *cisplatinato* (interacciones intracatenarias) por lo que las líneas celulares que han desarrollado resistencia al *cisplatinato* son sensibles a fármacos no convencionales basados en Ru. Como se comentó anteriormente, el estado de oxidación del rutenio es un factor determinante en su interacción con el ADN: los complejos de Ru(II) son más activos frente al ADN que los complejos de Ru(III) y Ru(IV). Además, la actividad anticancerígena de los compuestos de Ru(III) está relacionada con su reducción a Ru(II) en las células tumorales. Numerosos estudios indican que la unión del Ru al ADN está favorecida en ambientes con una concentración baja en oxígeno, mientras que en ausencia de la actividad redox de las mitocondrias la unión no tiene lugar. Por este motivo los complejos de Ru(III) se consideran profármacos.³⁴

Las múltiples dianas extracelulares e intracelulares con las que son capaces de interactuar los compuestos de Ru dificultan el desarrollo de mecanismos celulares de resistencia, ya que en comparación con otros fármacos, estos compuestos presentan múltiples rutas citotóxicas. Asimismo, hay evidencias de que la actividad anticancerígena de los compuestos de rutenio se debe también a su interacción con proteínas.³⁰ El mecanismo de acción parece estar relacionado con la inhibición de enzimas sobreexpresadas en células cancerígenas (ej. catepsina B, D, H, etc.) (Figura 1.7).³⁵ El hecho de que dichas biomoléculas se encuentren más expuestas a la acción de un fármaco adecuado, en comparación con el ADN del núcleo celular, sugiere que el tratamiento con este tipo de compuestos organometálicos alternativos sea más prometedor a la hora de aumentar su especificidad, así como disminuir sus efectos secundarios.

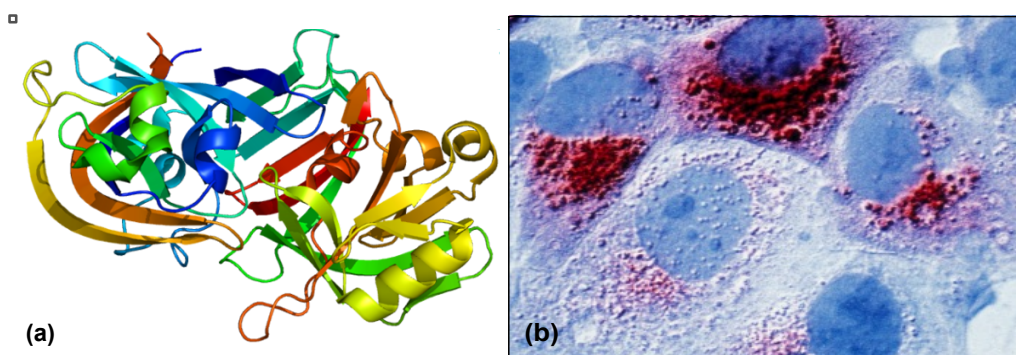


Figura 1.7. (a) Estructura de la forma nativa de la catepsina D humana. La catepsina D se utiliza como marcador del cáncer de mama. (b) Inmunohistoquímica de la catepsina D sobreexpresada (en rojo) en la línea celular MCF7 de cáncer de mama.

En este sentido, una de las vías metabólicas capaces de iniciar el proceso de apoptosis celular más estudiadas es la vía mitocondrial. Por tanto, cualquier compuesto activo frente a estas estructuras es de gran interés en estudios contra el cáncer. Existen diversos ejemplos de compuestos de rutenio activos frente a mitocondrias. El compuesto $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]^{6+}$, conocido como rutenio rojo, se utiliza normalmente para marcar mitocondrias de forma selectiva, puesto que se une de forma específica a la superficie de los canales de calcio.³⁶ Aunque el rutenio rojo tiene capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerígenas, tiene una toxicidad demasiado elevada para su uso clínico. Otro ejemplo es el compuesto de rutenio KP1019 que induce la

apoptosis en células tumorales del colon vía mitocondria. Este compuesto de Ru(III) induce la formación de especies reactivas de oxígeno en células tumorales de colon, despolarizando la membrana mitocondrial.³⁷ Estos ejemplos ponen de manifiesto que el mecanismo de acción de algunos complejos de rutenio está relacionado con interacciones mitocondriales.

En los últimos 30 años se han desarrollado una gran variedad de compuestos de rutenio con actividad anticancerígena. A continuación, se resume el papel de algunos compuestos de rutenio desarrollados con éxito. El primer compuesto de rutenio en ser investigado por sus propiedades anticancerígenas fue el *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] desarrollado por Clarke y sus colaboradores en 1980.³⁸ Este compuesto basado en ligandos cloruro y ammino se puede considerar un análogo del *cis*platino. Sin embargo, debido a su baja solubilidad, se abandonó su estudio en aplicaciones farmacéuticas. El primer compuesto de rutenio con actividad antitumoral desarrollado con éxito data de los años 80, cuando Keppler y sus colaboradores demostraron que dos complejos isoestructurales de Ru(III), el ICR, [ImH]*trans*-[RuCl₄(Im)₂] (Im : imidazol) y el KP1019, [IndH]*trans*-[RuCl₄(Ind)₂] (Ind: indazol), eran activos frente a un gran número de tumores, y en particular, presentan una actividad excelente frente al tumor colorrectal autóctono (químicamente inducido) resistente al *cis*platino (Figura 1.8).³⁹

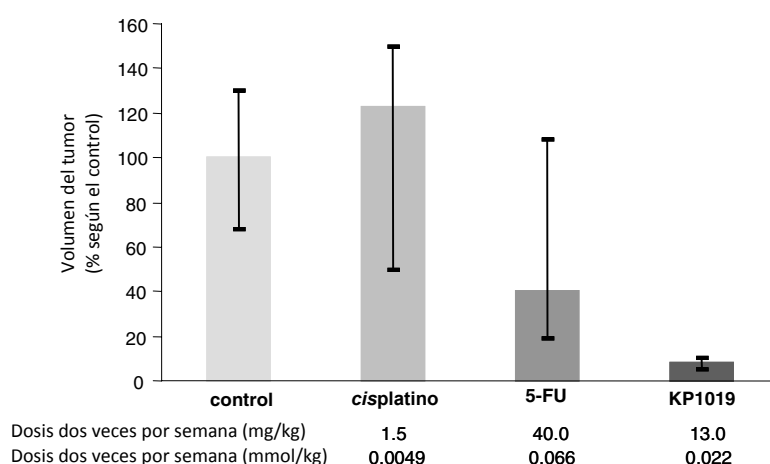


Figura 1.8. Actividad del KP1019 en tumores colorrectales autóctonos de rata, en comparación con la actividad del *cis*platino y el 5-fluorouracilo. Los fármacos se administraron dos veces por semana durante 10 semanas. El volumen relativo del tumor se presenta en comparación con el grupo control (T/C% = peso medio del tumor tratado/peso medio de tumor sin tratar · 100).

El éxito del KP1019 reside en su transporte único hacia las células tumorales y en la variedad de biomoléculas y dianas con las que puede reaccionar. Una vez en el torrente sanguíneo, el 80-90% del KP1019 reacciona con las proteínas del plasma, en su mayoría albumina y transferrina.⁴⁰ La transferrina actúa como “caballo de Troya”, transportando el KP1019 hasta las células con receptores transferrina, sobreexpresados en células cancerígenas. Con este transporte vía transferrina, se consigue reducir los efectos secundarios y dirigir el fármaco hasta la diana específica. Una vez que la transferrina se une a los receptores de la membrana celular, se incorpora a la célula vía endocitosis. Una vez dentro de la célula, el conjunto transferrina-Ru(III) queda almacenado dentro de vesículas (ej. endosomas), donde el pH es menor (≈ 5.5) que en el entorno extracelular (≈ 7.4). A pesar de que la unión transferrina-Ru(III) es fuerte, el Ru(III) es liberado en condiciones ácidas (procesamiento endosómico). Una vez liberado el KP1019 dentro del citoplasma, se produce su activación por reducción a Ru(II). Esta reducción es selectiva y solamente se produce en células tumorales.³⁷ El éxito del transporte del KP1019 hasta las células cancerígenas, y su posterior activación, explica por qué este compuesto presenta menos efectos secundarios que el *cisplatin*o (Figura 1.9).

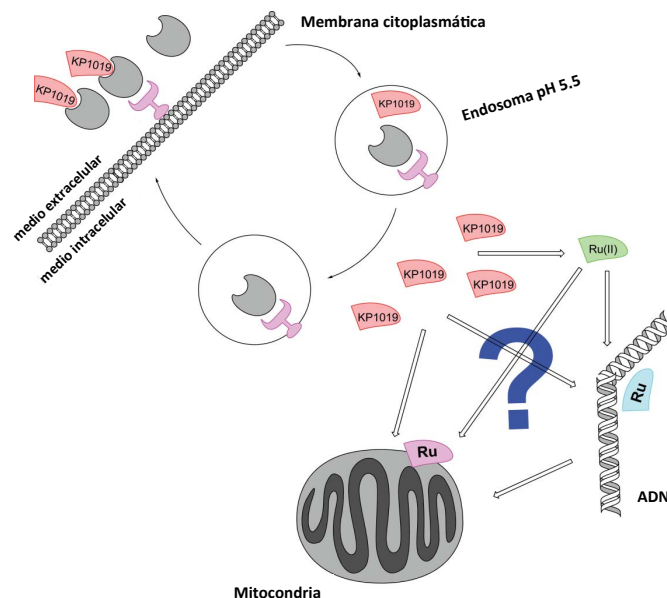


Figura 1.9. Representación esquemática del modo de acción del KP1019.²⁹

Otro factor importante que debe destacarse es que el mecanismo de acción del KP1019 frente al ADN es diferente al del *cisplatino*. El KP1019 es capaz de formar aductos con la biomolécula de ADN, pero estas uniones son menos robustas que las que forma el *cisplatino*, y no desencadenan la apoptosis celular. Numerosos estudios indican que el mecanismo que activa la apoptosis es la vía mitocondrial. El KP1019 es capaz de interferir en la cadena de transporte de electrones, despolarizando la membrana mitocondrial, activando la caspasa-3, así como una cascada de reacciones que inducen la apoptosis.⁴¹

El KP1019 es el segundo compuesto de rutenio que se ha administrado a enfermos de cáncer. Se ha concluido con éxito la primera fase de los ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos (incluyendo el colorrectal, endometrial, melanoma, así como diferentes tipos de carcinomas de vesícula), y se ha comprobado que su administración no conlleva efectos secundarios severos. Actualmente, se encuentra en fase II para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal avanzado.³²

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que en la búsqueda de terapias efectivas contra el cáncer, un área particularmente importante es el tratamiento de tumores secundarios o metástasis. La metástasis tiene lugar en un estadio avanzado de la enfermedad, y conlleva la liberación de células del tumor primario, y su restablecimiento en otra parte del cuerpo. La metástasis es un estado latente, y normalmente el crecimiento del nuevo tumor está inhibido por las hormonas secretadas por el tumor primario (ej. angiostatina). Sin embargo, si el tumor primario se elimina o hay cambios genéticos en las células metastásicas, puede tener lugar el crecimiento de un tumor secundario. Asimismo, el crecimiento de un tumor de más de 1 mm³ requiere un suplemento de sangre, y por lo tanto es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos que lo rodeen, proceso que se conoce como angiogénesis. Como se mencionó previamente, los metalofármacos de Pt tienen una escasa actividad antimetastásica. Por este motivo, se ha dedicado mucho esfuerzo al diseño de nuevos fármacos que actúen como antimetastásicos, y que interfieran en el proceso de angiogénesis (Figura 1.10).⁴²

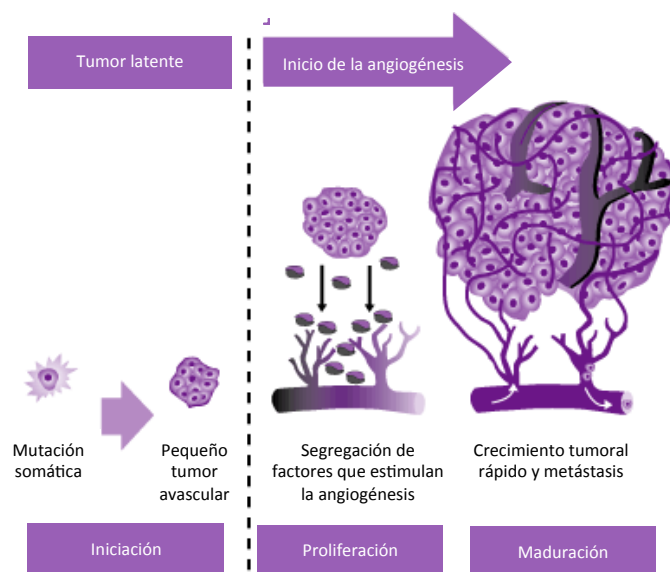


Figura 1.10. Inicio de la angiogénesis. Durante la fase de iniciación el tumor se considera latente. Sin embargo, con el tiempo el tumor empieza a segregar factores proangiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos.⁴³

En este sentido, en 1984, Mestroni y sus colaboradores estudiaron la actividad anticancerígena del compuesto de Ru(II) *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄], y la compararon con la actividad anticancerígena del *cis*platino.⁴⁴ Los estudios realizados concluyeron que este compuesto no presentaba toxicidad *in vitro*, mientras que era tres órdenes de magnitud menos potente que el *cis*platino *in vivo*. Sin embargo, cuando se administró en la máxima dosis permitida, demostró tener actividad frente a tumores primarios y frente a metástasis. Hay que destacar que ésta fue la primera vez que se desarrolló un compuesto capaz de actuar frente a la metástasis. Estos buenos resultados, estimularon el desarrollo de otros complejos de rutenio usando como ligando DMSO. En 1988, se desarrolló el complejo *trans*-[RuCl₂(DMSO)₄] que es activo frente a carcinoma de pulmón y tumores metastásicos. La particularidad de este compuesto es que el estereoisómero *trans* es 20 veces más tóxico que el *cis*. Además, es efectivo reduciendo los procesos metastásicos derivados de un tumor primario. Es decir que, aunque el *cis*platino es más eficaz reduciendo los tumores primarios, el compuesto *trans*-[RuCl₂(DMSO)₄] es más selectivo frente a metástasis.⁴⁵

A principios de los años 90, Alessio y sus colaboradores desarrollaron un nuevo compuesto basado en Ru(III) llamado NAMI-A [ImH]*trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)-S] (Im = imidazol). El NAMI-A es un compuesto estable y fácilmente reproducible que presenta poca citotoxicidad frente a tumores sólidos *in vivo* en comparación con el *cis*platino. Sin embargo, este compuesto destaca porque inhibe el desarrollo y crecimiento de metástasis pulmonar en todos los modelos probados *in vivo*, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas.^{27b} A pesar de su similitud estructural con el compuesto KP1019, el NAMI-A presenta una actividad biológica diferente. El efecto del NAMI-A en procesos metastásicos está asociado a una serie de actividades biológicas que influyen en funciones celulares como la adhesión, movilidad e invasión de las células tumorales, gracias a la condensación de la F-actina y a la reducción de la actividad de las metaloproteinasas (ej. gelatinasas). El NAMI-A interacciona débilmente con el ADN. Sin embargo, es capaz de interactuar con las integrinas, particularmente con las β -integrinas, proporcionando propiedades anti-invasivas a las células tumorales.

El mecanismo de acción del NAMI-A incluye: *i*) secuestro del ciclo celular, reteniendo a las células en la fase G₂/M; *ii*) inhibición de las metaloproteinasas de la matriz celular; *iii*) incremento de la matriz extracelular alrededor de la vascularización del tumor, y por lo tanto, inhibición de la invasión de células cancerígenas hacia nuevos tejidos o vasos sanguíneos; y *iv*) unión a ácido nucleicos, provocando un efecto directo en el ADN. Es de destacar que la actividad del NAMI-A es independiente del tipo de tumor primario o del estado en el que se encuentre la metástasis. El NAMI-A no es sólo capaz de prevenir la formación de metástasis, sino también de inhibir su crecimiento una vez que se ha establecido (Figura 1.11).

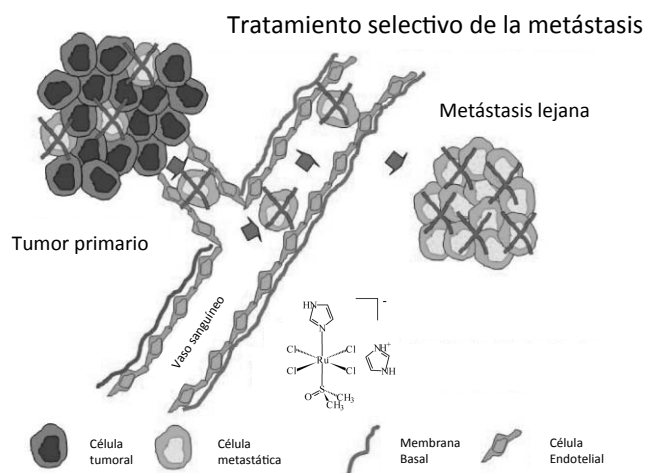


Figura 1.11. Eliminación selectiva de metástasis por parte del NAMI-A. Como resultado se reduce ligeramente el tumor primario (donde la metástasis representa una subpoblación), y se eliminan totalmente las células metastáticas.

El NAMI-A es el primer compuesto anticancerígeno con actividad antimetastásica que ha concluido con éxito la primera fase de los ensayos clínicos para el tratamiento de metástasis de tumores sólidos (incluyendo el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma y diferentes tipos de cánceres de páncreas). Estudios preclínicos han demostrado su actividad selectiva frente a metástasis de pulmón, y su acumulación preferente en este tipo de células. Su administración no conlleva efectos secundarios severos. El estudio en la fase II para el NAMI-A todavía no ha concluido.⁴⁶

En los últimos años, muchos grupos de investigación han desarrollado nuevos compuestos de rutenio como anticancerígenos. Reedjik y sus colaboradores, han desarrollado una serie de complejos de rutenio basados en ligandos bidentados heterocíclicos de nitrógeno, como por ejemplo el complejo *cis*-[RuCl₂(azpy)₂] (azpy: 2-fenilazopiridina), que posee citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares comparable e incluso superior al *cis*platino.⁴⁷ Por otro lado, hay que destacar el trabajo desarrollado por los grupos de Sadler⁴⁸ y Dyson⁴⁹ en la síntesis de compuestos organometálicos de Ru(II) basados en arenos, como por ejemplo el RAPTAC [Ru(*p*-cimeno)Cl₂(pta)] (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano)⁵⁰ que posee actividad antimetastásica *in vivo* aunque presenta una escasa citotoxicidad *in vitro*. En concreto, este compuesto es activo frente a células de neuroblastoma (SK-N-SH), y es capaz de inducir la

apoptosis incluso en concentraciones nanomolares (Figura 1.12). El RAPTA-C es capaz de reaccionar con moléculas de la superficie celular, acumulándose específicamente en las células cancerígenas y reaccionando con las proteínas del citoplasma. Se ha demostrado la capacidad de RAPTA-C de reaccionar con proteínas sobreexpresadas en procesos tumorales, como son las tiorredoxinas y la catepsina B, involucradas en procesos de metástasis, angiogénesis y progresión tumoral. A pesar de las diferencias estructurales entre NAMI-A y los compuestos de la familia del RAPTA-C, todos ellos se presentan como una opción interesante para el tratamiento de metástasis.⁵¹

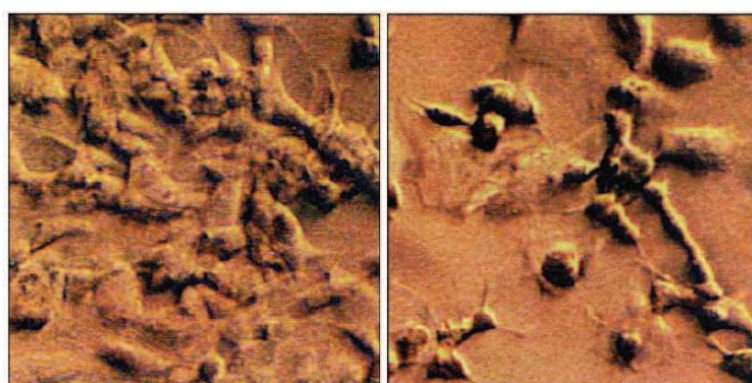


Figura 1.12. Gran densidad de células de neuroblastoma humano en un cultivo (izquierda). Tras la incubación con 1.3 μM de RAPTA-C se observa una clara disminución de dichas células en el cultivo (derecha). Las formas más redondas que se observan son características de cuerpos apoptóticos, lo que demuestra que la muerte celular se produce por un mecanismo de apoptosis.

El modo de acción del RAPTA-C todavía es desconocido. La presencia del ligando pta aumenta su solubilidad en agua, por lo que este compuesto de tipo “*semi-sandwich*” presenta propiedades anfifílicas, lo que facilita su administración y transporte en medio biológico.⁵² La actividad del RAPTA-C frente al ADN depende de la concentración de cloruros y del pH del medio. En el plasma sanguíneo, donde la concentración de cloruros es alta y el pH es cercano a 7, este compuesto permanecerá en su forma inactiva. Además, al igual que otros compuestos de rutenio, el RAPTA-C es capaz de unirse a las proteínas del plasma hasta llegar a los receptores celulares. Una vez entra en las células tumorales, donde el pH es ácido y la concentración de cloruros es menor, se formará la especie activa de RAPTA-C (Figura 1.13). En ella, los ligandos cloruro son sustituidos por ligandos acua, y el ligando pta se protona

formando lo que se considera la especie activa del compuesto $[\text{Ru}(\text{p-cimeno})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Hpta})]^{3+}$.⁵³ Una vez hidrolizado, el RAPTA-C es capaz de reaccionar rápidamente con diferentes dianas biomoleculares, como el ADN y diversos tipos de proteínas. Esta hipótesis explica por qué el RAPTA-C es selectivo frente a células tumorales y por qué presenta pocos efectos secundarios. Sin embargo, también demuestra que el RAPTA-C no puede administrarse oralmente, debido al pH ácido del estómago ($\text{pH} \approx 1.2$), que daría lugar a la forma activa sin que ésta alcanzara su diana.

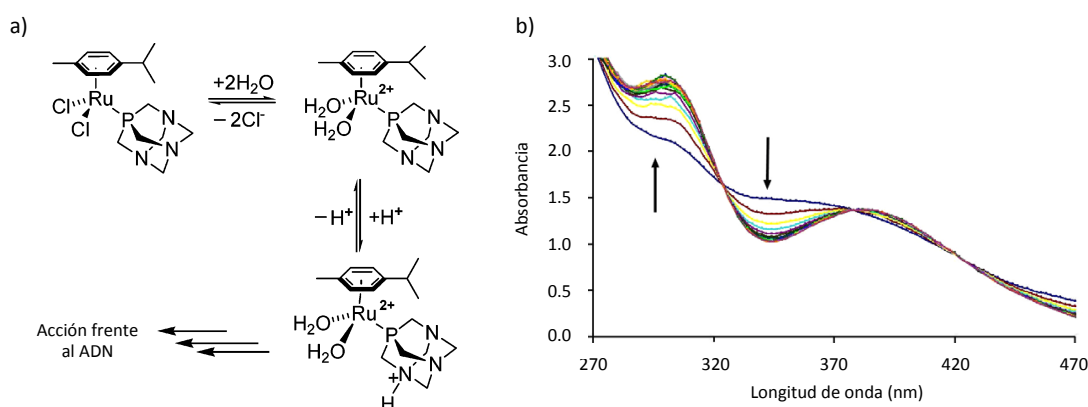


Figura 1.13. a) Protonación del ligando pta del compuesto RAPTA-C. Es posible que el daño que induce sobre el ADN sea dependiente del pH del medio. b) Espectro de absorción UV-vis de RAPTA-C en una solución salina de fosfato a pH 7.0; medido durante 20 min a 298 K.

Finalmente, estudios *in vivo* demuestran que la bioeliminación del compuesto RAPTA-C es más alta que la del NAMI-A. El tiempo de circulación medio del RAPTA-C en el plasma sanguíneo es de 10 a 12 horas. Además, tras 1 hora de la administración del fármaco, entre el 8-14% de la dosis administrada se encuentra en órganos vitales (riñón, hígado, bazo y pulmón).⁵⁴ Asimismo, diversos grupos de investigación están desarrollando compuestos análogos al RAPTA-C con ligandos menos lábiles, con el fin de formar estructuras más estables, y conseguir mayores tiempos de retención, y por lo tanto compuestos más eficientes.⁵⁵

Finalmente, de acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, los complejos de Ru pueden considerarse buenos candidatos como fármacos para tratamientos antitumorales más específicos y, por tanto, con menos efectos secundarios debido a su habilidad para mimetizarse con el Fe unido a

biomoléculas, los diferentes estados de oxidación que pueden mostrar, y su capacidad para interactuar con proteínas. Sin embargo, hay aspectos que deben mejorarse en este tipo de compuestos como su rápida cinética de intercambio de ligandos. De nuevo, se pone de manifiesto la necesidad de desarrollar otras estrategias para proteger estos metalofármacos de su rápida activación o biodegradación antes de alcanzar la diana deseada. En este sentido, el uso de materiales porosos como vehículos de estos fármacos es una estrategia prometedora.

1.2.2 Gases terapéuticos

Gases tan tóxicos como el monóxido de nitrógeno (NO), el monóxido de carbono (CO) o sulfuro de hidrógeno (H₂S) se producen de forma natural en animales y actúan como importantes moléculas señal en los seres vivos. Parece imposible que el CO, conocido como el asesino silencioso, o que el NO, liberado por los tubos de escape y uno de los responsables de la lluvia ácida, puedan ser importantes para el funcionamiento de nuestro organismo. Sin embargo, estos gases intervienen en la regulación celular de diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la vasodilatación, la inflamación en respuesta a daños endoteliales y pulmonares y el asma entre otros. En base a estos conocimientos, existe un creciente interés en aprovechar estas rutas metabólicas con el fin de utilizar estos gases (sobre todo el NO y CO) como agentes terapéuticos.⁵⁶

La formación de CO en el cuerpo humano fue descubierta en 1940 y es uno de los procesos químicos más comunes del organismo. La fuente principal de CO endógeno son las hemoxidasas, que están presentes en el cuerpo humano de forma constitutiva (HO-2 y HO-3) o su formación está inducida (HO-1). Tanto HO-1 como HO-2 catalizan la oxidación del carbono en la posición α del grupo hemo, para la formación natural de CO, liberando a la vez hierro y biliverdina, esta última transformándose rápidamente en bilirrubina (Figura 1.14).⁵⁷ Este proceso es bastante común ya que ocurre, por ejemplo, cada vez que nos hacemos un hematoma.⁵⁸

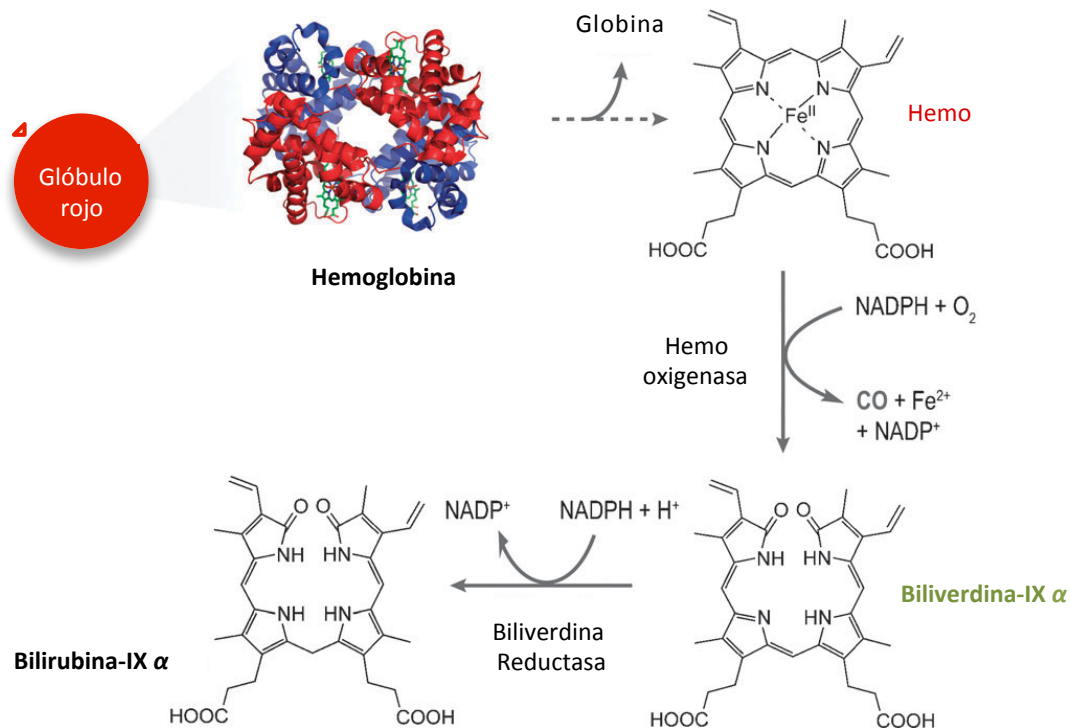


Figura 1.14. Mecanismo de degradación de la hemoglobina, en el que se genera CO y bilirrubina.

A pesar de su reputación como gas tóxico, actualmente el CO está considerado como un agente con interesantes propiedades como molécula señal y reguladora de importantes procesos fisiológicos. Además de la conocida función vasodilatadora del CO endógeno, la aplicación de bajas dosis de CO exógeno puede producir un efecto beneficioso al organismo.⁵⁹ Se ha demostrado que la administración de CO en modelos animales conlleva un efecto saludable que se relaciona con la inducción de la HO-1, lo que demuestra la posible aplicación del CO como fármaco. Los efectos farmacológicos que se atribuyen al CO son: propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antiaterogénicas, antiproliferativas y efectos citoprotectores, entre otras. Sin embargo, existen problemas en la administración localizada de CO, ya que su inhalación da lugar a una distribución vascular global. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos métodos para liberar cantidades terapéuticas de CO de forma segura y localizada (Figura 1.15).

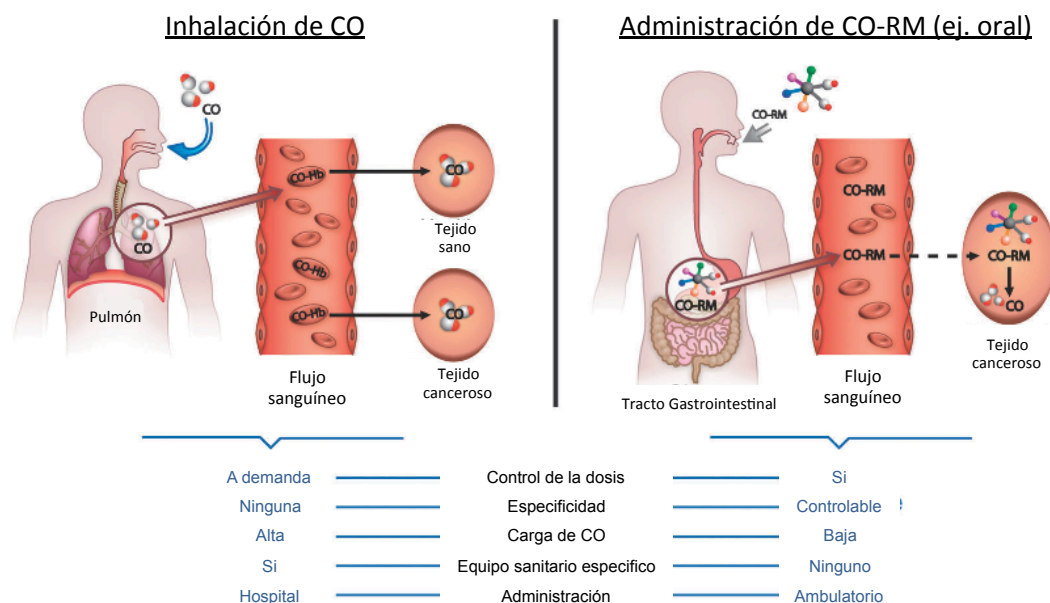


Figura 1.15. Vías alternativas para la administración terapéutica de CO, y sus ventajas e inconvenientes.

Una de las estrategias para conseguir la administración local y controlada de CO es el desarrollo de compuestos liberadores de CO (CO-RMs, “CO-releasing molecules”). Los CO-RMs son una nueva clase de compuestos capaces de transportar y liberar CO en un entorno biológico. Normalmente, se trata de compuestos organometálicos, basados en carbonilos de metales de transición, que contienen uno o más grupos CO coordinados al centro metálico. Además de los complejos organometálicos, existen cuatro clases de compuestos que pueden liberar CO, como son los α,α -dialquilaldehídos, oxalatos y borocarboxilatos y ácidos silacarboxílicos.⁵⁸

El primer estudio donde se describe el uso de una molécula liberadora de CO con aplicaciones biomédicas es la patente desarrollada por Moterllini y sus colaboradores en 2001.⁶⁰ Desde entonces numerosos CO-RMs han sido sintetizados utilizando diferentes metales de transición (Mn, Mo, Fe, Ru, etc.). Estudios *in vivo* han demostrado que los CO-RMs presentan actividad antiinflamatoria, antiapoptótica, antiisquémica, anticancerígena, antiproliferativa, proangiogénica, antiagregatoria, y cardioprotectora, así como la capacidad de regular la respiración mitocondrial.⁶¹ Una de las aplicaciones más interesantes de los CO-RMs es la protección de órganos que van a ser trasplantados

mientras estos son almacenados en frío. Se ha demostrado que el CORM-3 es capaz de reducir la isquemia durante la conservación del órgano en frío.⁶² En la tabla 1.2, se resumen las propiedades químicas y farmacológicas de algunos de los CO-RMs más estudiados.

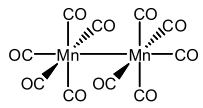
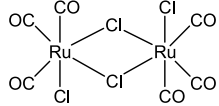
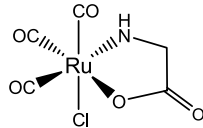
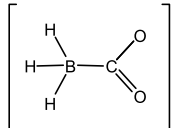
Compuesto	Estructura Química	Cinética de liberación de CO y propiedades	Actividad Farmacológica
CORM-1		Rápida ($t_{1/2} < 1\text{min}$) Liberación de CO inducida por la sustitución de ligando Soluble en etanol y DMSO	Vasodilatador Protector Renal
CORM-2		Rápida ($t_{1/2} \approx 1\text{min}$) Liberación de CO inducida por la sustitución de ligando Soluble en etanol y DMSO	Vasodilatador; Protector Renal; Anti-inflamatorio; Anti-cancerígeno; Pro-angiogénico; Anti-apoptótico; Inhibidor de la proliferación celular
CORM-3		Rápida ($t_{1/2} \approx 1\text{min}$ a pH = 7.4, 310 K) Liberación de CO inducida por la sustitución de ligando Soluble en agua	Vasodilatador; Protector Renal; Cardio-protector; Anti-inflamatorio; Anti-isquémico; Inhibidor de la agregación plaquetaria
CORM-A1		2 Na ⁺ Lenta ($t_{1/2} \approx 21\text{min}$ a pH = 7.4, 310 K) Liberación de CO depende del pH Soluble en agua	Vasodilatador; Protector Renal; Anti-isquémico; Anti-apoptótico

Tabla 1.2. Estructura química y propiedades bioactivas de algunos CO-RMs.⁶³

Sin embargo, muchos de estos compuestos organometálicos son inestables en condiciones ambientales, pudiendo reaccionar en presencia de humedad o con la luz. Además, muchos de los CO-RMs sintetizados hasta la fecha, presentan una tasa de liberación del CO muy rápida, de segundos e incluso minutos, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de liberación más eficaces.⁶⁴ En este sentido, las redes metalorgánicas con centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas se presentan como una opción para la liberación controlada de CO. Recientemente, Metzler-Nolte y sus colaboradores, han demostrado que las redes metalorgánicas biocompatibles MIL-88B [$\text{Fe}_3\text{O}(\text{BDC})(\text{Ac})$] y MIL-88B-NH₂ [$\text{Fe}_3\text{O}(\text{BDC-NH}_2)(\text{Ac})$] (H₂BDC: ácido benceno-1,4-dicarboxílico), (HAc: ácido acético), con posiciones de coordinación insaturadas, son capaces de adsorber y liberar CO en condiciones fisiológicas. En este caso, la liberación del CO se produce por la degradación del material, con tiempos de vida media de liberación de CO de 38 (MIL-88B) y 76 min (MIL-88B-NH₂).⁶⁵

Por otro lado, el efecto relajante de los nitratos, como el nitroprusiato o la nitroglicerina, para el tratamiento de la angina de pecho, se conoce desde principios del siglo XIX. Sin embargo, no es hasta 1970 cuando se demuestra que los nitratos son metabolizados y que, en realidad, el agente activo en este proceso es el NO. Finalmente, en 1979, se demostró que el NO es capaz de relajar arterias coronarias bovinas previamente contraídas. Tras esta serie de descubrimientos, se empezó a estudiar el rol biológico del NO y su mecanismo de acción.⁶⁶ La fuente principal de NO endógeno son las NO sintetasas (NOS), que están presentes en el cuerpo humano en forma de NOS1, NOS2 y NOS3. Estas tres isoformas de NOS presentan una similitud del 50%, y se diferencian en su localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad para inhibirse. La NOS1 y la NOS3 son enzimas constitutivas que se expresan constantemente en el tejido neural y endotelial, respectivamente. Las enzimas NOS constitutivas pueden producir más o menos NO dependiendo de la concentración de calcio presente. Por el contrario, la NOS2 es una enzima inducible, que no depende de la concentración de calcio presente en el medio, por lo que se le conoce como isoforma calcio-independiente (iNOS). Al contrario que las enzimas NOS1 y NOS3, la inducción de NOS2 da como resultado una continua producción de NO. Todas las isoformas de NOS catalizan la reacción entre la L-arginina, el NADPH y el oxígeno para dar NO, L-citrulina y NADP+.⁶⁷ Hay que destacar que un regulador importante de la enzima NOS2 es el gen p53 que participa en la supresión de tumores. Este gen determina la presencia de NO e inhibe a la NOS2. Esta relación es importante para determinar el rol del NO en el cáncer.⁶⁸

Como molécula señal, el NO regula varios procesos fisiológicos y patológicos, como las funciones vasculares (angiogénesis, flujo sanguíneo, permeabilidad vascular, interacción leucocito-endotelio, agregación plaquetaria y flujo microlinfático), las funciones neuronales (neurotransmisión y desarrollo del sistema nervioso) y, a concentraciones relativamente altas, desarrolla funciones citoestáticas y citolíticas. Es de destacar, que varios estudios sugieren un rol dual del NO, que puede promover o inhibir la progresión tumoral y la metástasis. Los efectos del NO en tumores dependen de la actividad y localización de las NOS, de la concentración y duración a la exposición al NO,

y de la sensibilidad celular. Las NOS se han detectado en numerosos tumores humanos, y su actividad depende del tipo de tumor y del estado en el que se encuentre.⁶⁹

Recientemente, se han desarrollado una gran variedad de compuestos liberadores de NO, tales como nitratos y nitritos orgánicos y S-nitrosotioles. Además, algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos, se han modificado para liberar NO. Por ejemplo, se han desarrollado dos nitrato-aspirinas (NCX4215 y NCX4016) que han demostrado buenos resultados en la inhibición de la agregación plaquetaria.⁶⁶ En cuanto al tratamiento del cáncer, existe una gran controversia respecto al rol del NO. Se sabe que tiene tanto actividad tumoricida como tumorigénica, dependiendo del tiempo de exposición al NO, la localización del tumor y la concentración de NO (Figura 1.16). Así, el NO es capaz de modular diferentes estadios en la enfermedad del cáncer, incluyendo la angiogénesis, la apoptosis, el ciclo celular, la invasión y la metástasis. Se sabe que las células tumorales se encuentran expuestas a niveles altos de NOS y NO desde un estadio temprano de la enfermedad en comparación con las células sanas.⁶⁸

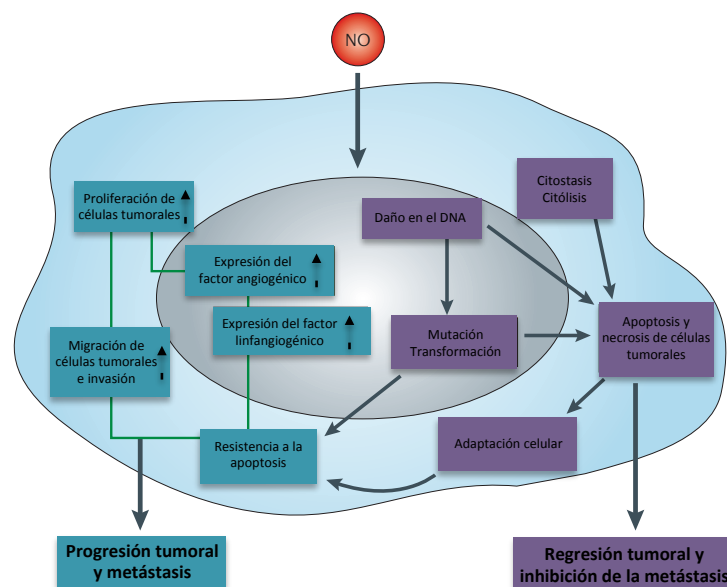


Figura 1.16. Mecanismo de acción del NO en células tumorales. El NO puede inducir tanto la progresión tumoral y la metástasis (azul) como la regresión tumoral e inhibición de la metástasis (violeta) dependiendo de la dosis y la duración a la exposición al NO, y de la sensibilidad celular.⁶⁹

Existen diversos estudios del efecto bimodal del NO en el cáncer. De forma general, se ha sugerido que altas concentraciones de NO tienen una función antineoplásica, mientras que concentraciones bajas pueden tener efectos pro-angiogénicos y pro-tumorales. Se han estudiado una gran variedad de compuestos liberadores de NO para el tratamiento del cáncer, como por ejemplo: nitratos orgánicos, compuestos metálicos dadores de NO del tipo sodio nitroprusida (SNP), S-nitrosotioles, sidnoniminas, diazeniodiolatos (NONOatos), etc. Existe un reciente interés en el uso combinado de NO para el desarrollo de tratamientos más eficaces contra el cáncer. Se han obtenido buenos resultados en el uso simultáneo de fármacos con compuestos liberadores de NO, o híbridos formados por fármaco y NO, para el tratamiento del cáncer. Este tipo de tratamientos se basa en la actividad sinérgica suma de las características específicas del NO en cuanto a su capacidad vasodilatadora y a su potencial rol antineoplásico, con la actividad propia del fármaco. Algunos ejemplos de tratamientos combinados son: los compuestos híbridos formados por NO y fármacos antiinflamatorios (NO-ibuprofeno, NO-aspirina, NO-flubiprofeno, etc.)⁷⁰ que han demostrado tener propiedades quimiopreventivas e inmunoquimioterapéuticas;⁷¹ el uso combinado de NONOatos y *cisplatino* para el tratamiento de fibroblastos pulmonares V79;⁷² o el efecto quimiosensibilizador *in vivo* del GTN (compuesto liberador de NO) para el posterior tratamiento con doxorrubicina en xenoinjertos de tumores de próstata (Figura 1.17).⁷³

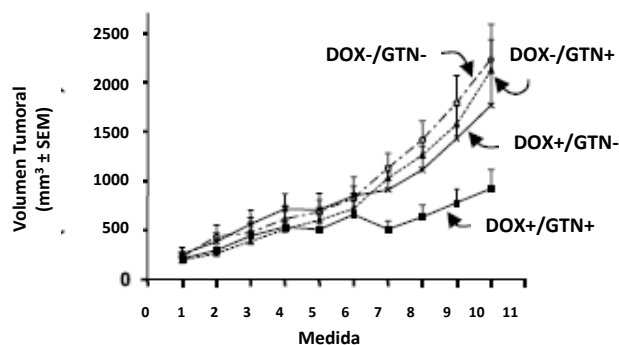


Figura 1.17. Efecto quimiosensibilizador *in vivo* de GTN (compuesto liberador de NO) en xenoinjertos de tumores de próstata. Rango del volumen tumoral a lo largo del tratamiento. Se observa como hay una disminución significativa en el desarrollo del tumor si se compara con el tratamiento en el que sólo se administró doxorrubicina.

Sin embargo, el uso farmacológico de algunos de estos compuestos liberadores de NO se ve condicionado por su baja solubilidad y estabilidad en medio fisiológico, y su poca selectividad frente a la diana deseada. Además, el NO es un molécula muy reactiva, que puede dar lugar a reacciones no deseadas con una gran variedad de átomos o moléculas durante su almacenamiento o en condiciones fisiológicas. Para intentar solucionar este problema, recientemente, se han desarrollado una gran variedad de nanoportadores capaces de almacenar NO, como por ejemplo dendrímeros, liposomas, partículas metálicas, polímeros, *quantum dots*, nanotubos de carbono, zeolitas, sílices mesoporosas, etc.⁷⁴ En concreto, las sílices mesoporosas han centrado una considerable atención, puesto que presentan grandes áreas superficiales y canales uniformes donde pueden tener lugar procesos de adsorción de NO. De forma general, las sílices mesoporosas se pueden modificar mediante funcionalización post-sintética de los grupos superficiales para formar compuestos liberadores de NO, como S-nitrosotioles, nitrosilos de manganeso, grupos diazeniodiolato (NONOatos), etc. Alternativamente, se pueden encapsular compuestos liberadores de NO dentro de las cavidades de las sílices mesoporosas. En este sentido, Mascharak y sus colaboradores estudiaron la carga de la sílice mesoporosa MCM-41 con el compuesto fotosensible $[\text{Mn}(\text{PaPy})_3(\text{NO})]\text{ClO}_4$ (HPaPy: *N,N*-bis(2-piridilmetil)amino-*N*-etil-2-piridina-2-carboxamida) (Figura 1.18).⁷⁵ En este caso, se aprovechó la presencia de grupos hidroxilo en la sílice mesoporosa, que pueden interaccionar con los grupos polares nitrosilo del compuesto de Mn, para estabilizarlo dentro de la matriz. Asimismo, se han estudiado otras sílices mesoporosas como nanoportadores-liberadores de NO y se han obtenido buenos resultados en el control de la liberación prematura o no deseada de este gas, lo que indica la potencial aplicación de este tipo de materiales porosos en la liberación controlada de NO.⁷⁶ A pesar de estos resultados, las sílices mesoporosas presentan una baja capacidad de carga de NO. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos compuestos portadores capaces de encapsular grandes cantidades de NO, que sean estables durante su almacenamiento y que no den lugar a la formación de especies indeseadas en medio fisiológico.

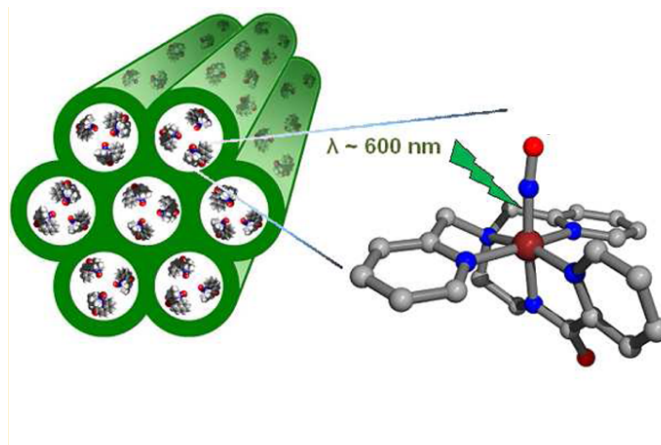


Figura 1.18. Representación de la liberación controlada de NO a partir de la sílice mesoporosa MCM-41 cargada con el compuesto fotosensible $[Mn(PaPy)_3(NO)]ClO_4$. Manganese. Nitrógeno. Carbono. Oxígeno.

1.3 Terapias avanzadas

A pesar de que la quimioterapia es uno de los métodos más efectivos para el tratamiento contra el cáncer, presenta algunas desventajas, como la falta de especificidad hacia las células tumorales, importantes efectos secundarios y el desarrollo de resistencia adquirida al fármaco. Durante las últimas décadas, trabajos de investigación interdisciplinarios se han centrado en el desarrollo de sistemas capaces de dirigir y liberar fármacos de forma controlada, utilizando diversas estrategias. Las terapias dirigidas contra el cáncer se basan en el uso de compuestos activos que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir con moléculas específicas implicadas en el crecimiento y el avance de tumores. Otra de las estrategias utilizadas para mejorar los tratamientos actuales, es el uso de sistemas de liberación controlada o *drug-delivery systems* (DDS), capaces de almacenar, transportar y liberar fármacos. Estos compuestos portadores presentan diversas ventajas en comparación con los sistemas tradicionales, ya que mejoran la farmacocinética y distribución, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios. Además, estos sistemas hacen posible la incorporación de varias moléculas activas en un mismo portador, o el desarrollo de sistemas que permitan diagnosticar y a la vez que tratar una enfermedad. Los sistemas de liberación controlada de fármacos se han aplicado a una gran variedad de enfermedades como infecciones, enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso, procesos inflamatorios, etc.⁷⁷

Por otra parte, debido a que las células tumorales crecen anormalmente rápido, la vascularización de los tumores es desordenada y heterogénea. Hay que destacar que el sistema linfático tumoral se caracteriza por tener una gran presión intersticial y un mal drenaje. La poca vascularización y retención en el sistema linfático de los tumores se conoce como permeación y retención aumentada (EPR: *enhanced permeation and retention effect*), y se caracteriza por tener una mayor acumulación pasiva de fármacos o portadores en comparación con los tejidos sanos.⁷⁸ El efecto EPR es una ventaja para el uso de sistemas de liberación controlada en el tratamiento del cáncer, ya que de forma natural estos portadores se acumulan en tumores, mejorando la

citotoxicidad de los fármacos (Figura 1.19).⁷⁹ Sin embargo, en algunos tipos de cáncer, esta acumulación pasiva no siempre es suficiente para alcanzar la diana deseada.

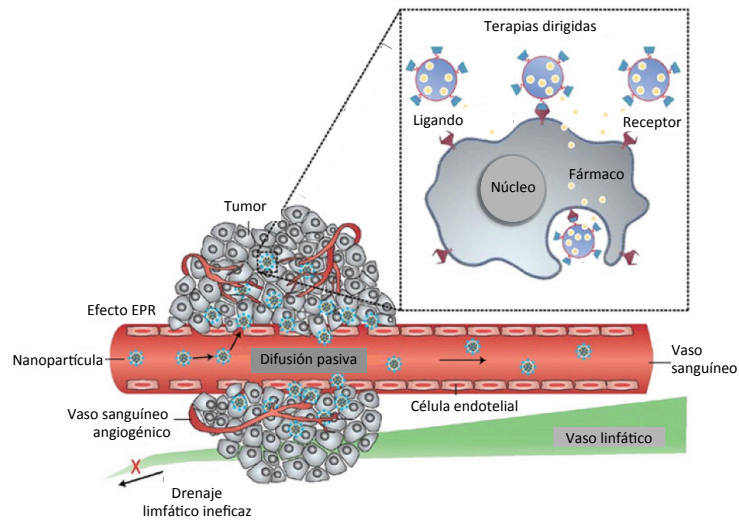


Figura 1.19. Representación esquemática del efecto EPR en quimioterapia. Entrada a la célula facilitada por la interacción entre los sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS) y los receptores de membrana.⁸⁰

Generalmente, las propiedades de los fármacos están determinadas por la farmacocinética que presentan. Los cambios que sufre un fármaco o portador en medio fisiológico, es un factor importante a la hora de diseñar nuevos tratamientos. Propiedades físicas como el tamaño y carga superficial de la partícula, la porosidad o tortuosidad, y la hidrofobicidad, afectan en la eliminación temprana del fármaco o su portador. Controlando estos factores es posible aumentar el tiempo de circulación en el cuerpo, y por lo tanto la efectividad del tratamiento.

Con el objetivo de mejorar el efecto EPR y la farmacocinética de las moléculas activas, muchos tratamientos contra el cáncer se han mejorado utilizando una quimioterapia dirigida. En la quimioterapia dirigida los fármacos, o los sistemas de liberación controlada, se funcionalizan con moléculas capaces de reconocer dianas específicas expresadas en las células cancerígenas. La mayoría de las terapias dirigidas se basan en el uso de motivos estructurales que mejoran la farmacocinética y biodistribución de las moléculas bioactivas.

Por otro lado, la resistencia adquirida continúa siendo una de las mayores barreras para el tratamiento efectivo del cáncer. Este proceso ocurre cuando se somete al paciente a una exposición continuada al fármaco, de forma que el sistema inmune lo reconoce y elimina, sin llegar hasta el objetivo celular. Se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de evitar el desarrollo de resistencia adquirida. Por ejemplo, los sistemas DDS son capaces de encapsular el fármaco y dirigirlo hasta las células cancerígenas, consiguiendo que el fármaco pase inadvertido para el sistema inmune. Estos sistemas además, pueden recubrirse con polímeros que aumentan su tiempo de circulación (ej. polietilenglicol, *PEG*, o quitosano). Por otro lado, existen compuestos bioactivos funcionalizados con motivos estructurales que mimetizan biomoléculas, de forma que el sistema inmune no es capaz de reconocerlas (ej. estaurosporina). Otra estrategia que permite localizar la acción citotóxica es el uso de fármacos que se activan al aplicar un estímulo externo, como por ejemplo compuestos fotosensibles, termosensibles o radioactivos. A continuación, se explica en detalle las terapias avanzadas anteriormente mencionadas.

1.3.1 Quimioterapia dirigida (tratamientos diana)

La quimioterapia clásica se basa en el desarrollo de fármacos que interfieran en la replicación y mitosis de las células tumorales. Durante las últimas décadas, el mayor conocimiento de la evolución de las células tumorales, así como la secuenciación del genoma humano, ha dado lugar al descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento del cáncer. El descubrimiento de motivos moleculares (factores de crecimiento, proteínas, enzimas, receptores, etc.) asociados a procesos cancerosos, ha hecho posible el desarrollo de un nuevo tipo de tratamiento, la quimioterapia dirigida. La efectividad del tratamiento está relacionada con la capacidad de dirigir los fármacos hasta el tumor y provocar la muerte de las células cancerígenas, sin afectar a las células sanas. Esta efectividad se traduce en una mejora en la calidad de vida de los enfermos, así como en una mayor esperanza de vida.

Existen diversas estrategias para el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos. De forma general, existen dos grandes áreas de quimioterapia dirigida: los tratamientos sistémicos y los tratamientos intracelulares. Los tratamientos sistémicos se basan en la libre circulación del fármaco por el flujo sanguíneo y la extravasación. Los tratamientos sistémicos además se clasifican en tratamientos con liberación mediada por la interacción ligando-receptor y tratamientos donde la liberación está localmente activada (Figura 1.20). Por otro lado, los tratamientos intracelulares se basan en la liberación del fármaco dentro del citoplasma de la célula cancerígena. Este tipo de estrategia se utiliza, por ejemplo, en terapia génica o para el tratamiento con ARN de silenciamiento (*siRNA*).⁸¹

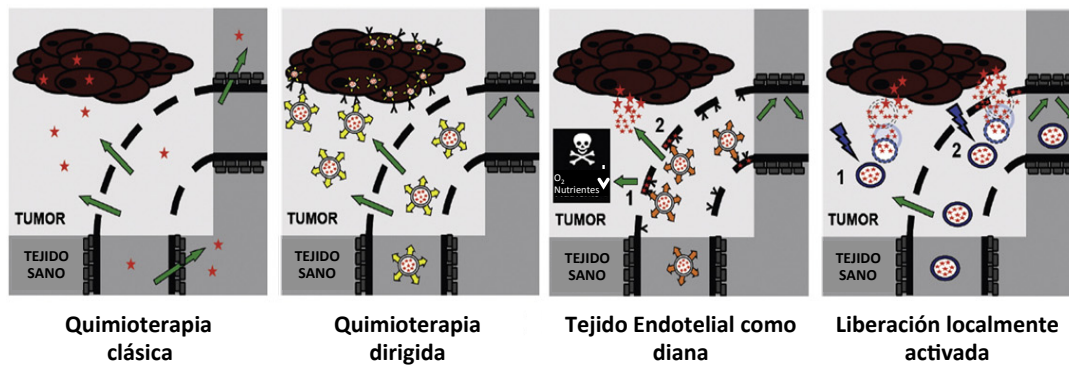


Figura 1.20. Esquema de algunas de las estrategias utilizadas en quimioterapia dirigida. Los fármacos están representados en rojo (estrellas), los ligandos conductores en amarillo (flechas), los receptores representados en violeta y los estímulos externos para la activación representados como rayos.

Una de las estrategias utilizadas para aumentar la selectividad de la quimioterapia es unir al fármaco un ligando, o agente terapéutico, que sea reconocido por el tumor (Figura 1.21). Esta estrategia se basa en la presencia de receptores expresados o sobreexpresados en un entorno tumoral en comparación con los tejidos sanos. Cuando estos agentes reaccionan específicamente con los receptores celulares son incorporados mediante endocitosis o liberados al medio, de forma que se acumulan en la superficie celular. El éxito de esta estrategia se basa en la elección adecuada del fármaco, el ligando y el receptor, o diana, con el que va a interactuar. Existen numerosos ejemplos en bibliografía de agentes terapéuticos que son

reconocidos por las células cancerígenas, como por ejemplo anticuerpos,⁸² aptámeros,⁸³ péptidos,⁸⁴ oligosacáridos,⁸⁵ o pequeñas moléculas orgánicas.⁸⁶ Así algunos ejemplos de receptores sobreexpresados en células cancerígenas son el receptor folato (FR), el receptor de la transferrina (TfR), el receptor de lectina, el receptor del factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor de la adhesión molecular (CAM), etc.

Uno de los ejemplos más estudiados es el receptor del ácido fólico (RF). El RF es una proteína de la superficie celular que se ha utilizado como diana para el diagnóstico y terapia del cáncer. El RF facilita la entrada de ácido fólico (vitamina B9) que es necesario para el crecimiento celular y la proliferación. El RF se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de cánceres, con una gran frecuencia en carcinoma de ovario y endometrial.⁸⁷ Es de destacar, que aunque se encuentre sobreexpresado en células tumorales, en células sanas es poco frecuente. Existen numerosos ejemplos de radiofármacos unidos a ácido fólico utilizados con éxito en diagnóstico.⁸⁸

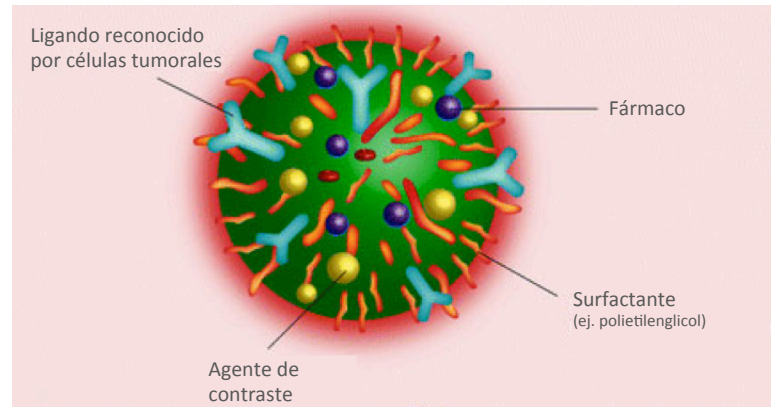


Figura 1.21. Esquema de la posible funcionalización de una partícula portadora de fármacos.⁸⁹

El segundo gran grupo de tratamientos sistémicos se basan en la liberación localmente activada del fármaco tras la exposición a un estímulo externo como calor,⁹⁰ luz,⁹¹ cambios de pH,⁹² ultrasonidos⁹³ o campos magnéticos.⁹⁴ Estos sistemas están diseñados para liberar el fármaco conjugado una vez que se ha aplicado cierto estímulo, maximizando el efecto farmacológico de forma local, mientras se previene el daño de los tejidos sanos. El mayor inconveniente que presenta este tipo de fármacos es que son

poco solubles y difíciles de preparar. En algunos casos se ha observado que se libera el fármaco antes de la aplicación del estímulo, afectando a células sanas y desencadenando efectos secundarios. Existen numerosos ejemplos de este tipo de terapias. La terapia fotodinámica (PDT) se basa en el uso de un fármaco fotoactivable no tóxico que se activa a una cierta longitud de onda.⁹⁵ Tras la activación, reacciona con el oxígeno celular, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), capaces de oxidar a ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos, produciendo la muerte celular. Las moléculas fotosensibles con capacidad de acumularse en células cancerígenas comúnmente utilizadas son porfirinas, clorinas, ftalocianinas y bacterioclorinas.⁹⁶ Otro ejemplo de un tratamiento localmente activado es la radioinmunoterapia. En este caso, un radionucleótido inestable se une a un anticuerpo que lo dirige hasta los antígenos sobreexpresados en las células cancerígenas. La emisión de esa energía almacenada es la responsable de la muerte celular.⁹⁷

Por otro lado, las nuevas tecnologías de resolución de imagen han evolucionado haciendo posible diagnosticar pequeñas lesiones indetectables utilizando métodos tradicionales. Se han sintetizado nuevos compuestos que permiten seguir la distribución de una molécula, determinar su mecanismo de acción y monitorizar a tiempo real la progresión de la enfermedad. A este nuevo concepto de quimioterapia dirigida se le conoce como teragnosis, y se refiere a la integración de pruebas de imagen y terapia del cáncer utilizando un único fármaco. La combinación de un agente terapéutico con una molécula señal en un solo fármaco, y la extrema versatilidad de estos compuestos, puede contribuir de forma importante al desarrollo de tratamientos optimizados y personalizados. De esta forma, se podría administrar el fármaco adecuado, a un paciente en concreto y en el momento preciso.⁹⁸

Otro tipo de quimioterapia dirigida se basa en el tratamiento intracelular, donde la liberación del fármaco se produce dentro del citoplasma de la célula cancerígena. A pesar de que los fármacos de pequeño tamaño son capaces de atravesar la membrana lipídica de forma natural, en muchos casos la membrana plasmática sigue siendo una de las mayores barreras para que los fármacos sean efectivos. Los péptidos de inserción celular (*cell-penetrating*

peptides, CPPs) son uno de los vectores más populares y eficientes. Los CPPs, con tamaños comprendidos entre 5 a 30 aminoácidos, se utilizan para introducir dentro de la célula moléculas tan diversas como ARN de silenciamiento (*siRNA*), ácidos nucleicos (terapia genética), *quantum dots*, agentes terapéuticos de reducido tamaño, proteínas y agentes de contraste. Los mecanismos por los que estas moléculas activas entran en el citoplasma son la translocación directa a través de la membrana o la endocitosis. La ventaja que presentan este tipo de terapias es que la molécula activa es liberada directamente en el entorno intracelular, sin que sufra cambios durante su transporte, consiguiendo mejorar la eficacia de los tratamientos.⁸⁴

Particularmente, la química inorgánica ha contribuido al desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos dirigidos. Uno de los trabajos más citados en bibliografía es el de Meggers y colaboradores.⁹⁹ En este estudio, se aprovecharon las propiedades únicas de los metales de transición en cuanto a coordinación y geometrías posibles, como andamio para la síntesis de compuestos que imitan a un inhibidor enzimático, la estaurosporina. El producto natural estaurosporina es una potente enzima que actúa como inhibidor de varias quinasas. Mediante la sustitución del carbohidrato presente en la estaurosporina por el ion metálico rutenio, y la introducción de pequeñas variaciones estructurales, se han sintetizado varios inhibidores de proteínas quinasas (Figura 1.22). Este tipo de inhibidores organometálicos han demostrado ser citotóxicos frente a células de melanoma humano.¹⁰⁰

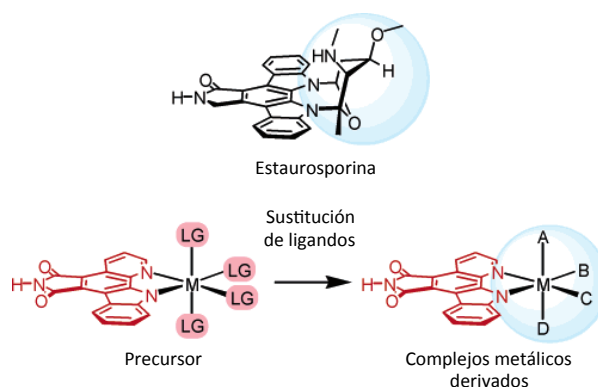


Figura 1.22. Mimetismo molecular del inhibidor de la proteína quinasa estaurosporina con complejos metálicos octaédricos. En azul está marcado el dominio globular de estos compuestos.¹⁰¹

Otro ejemplo de la aplicación de compuestos organometálicos al desarrollo de nuevos fármacos inteligentes, es el trabajo desarrollado por Jaouen y colaboradores en la síntesis de derivados de tamoxifeno (Figura 1.23). El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno, y se utiliza como adyuvante en la terapia contra el cáncer de mama. Su mecanismo de acción se basa en su efecto antiestrogénico, bloqueando la estimulación del desarrollo de las células tumorales. Jaouen y colaboradores han desarrollado una gran variedad de compuestos organometálicos (Pt, Tc, Ti, Mn, Fe, Ru y Re) vectorizados con ligando tamoxifeno, y se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de líneas celulares cancerígenas estrógeno dependientes, como el cáncer de mama.¹⁰²

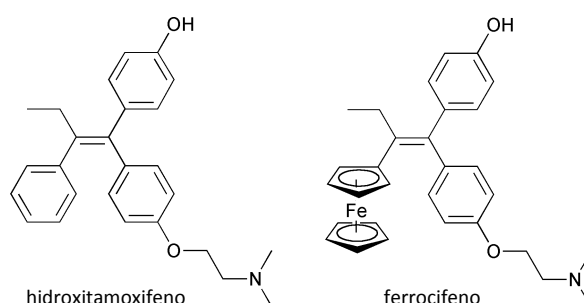


Figura 1.23. Estructuras del hidroxitamoxifeno y su derivado ferrocifeno

Como ha quedado demostrado, los centros metálicos juegan un papel fundamental en la estructura de diferentes biomoléculas. En concreto, el zinc es un metal esencial en sistemas biológicos, que desarrolla un papel fundamental en la organización de los dominios peptídicos de algunas proteínas esenciales. Estas proteínas reciben el nombre de dedos de zinc (*zinc fingers*, ZF). Las ZF se han definido como una nueva diana para el tratamiento del cáncer, ya que juegan un papel importante en funciones como la reparación del ADN, reconocimiento, transcripción, replicación, apoptosis y en el metabolismo en general. Se han desarrollado compuestos de coordinación (de Pt y Au) que afectan a la conformación de las ZF, ya sea por la sustitución del ion metálico zinc o por estrés oxidativo.⁸⁸

1.3.2 Liberación controlada de fármacos

Actualmente, existen una gran variedad de fármacos con actividad anticancerígena. Sin embargo, en muchos casos su efectividad se ve limitada por su rápida biodegradación y eliminación del organismo. Además, muchos compuestos bioactivos poseen una baja solubilidad en medio acuoso, debido a su elevado peso molecular y/o a la presencia de grupos hidrofóbicos, por lo que son reconocidos y eliminados rápidamente por el sistema inmune.¹⁰³ Por lo tanto, la administración de estas moléculas bioactivas en pacientes requiere el desarrollo de métodos que consigan su transporte y liberación en medio fisiológico de forma específica, prolongada y a un ritmo controlado. El diseño de nuevas moléculas activas y tratamientos inteligentes ha dado lugar al desarrollo de agentes portadores no tóxicos, es decir, lo que se conoce como sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, *drug-delivery systems*). Un sistema de liberación controlada de fármacos se puede describir como una formulación que controla la dosis y el periodo de liberación de la molécula activa o fármaco, y su acción en una zona concreta del cuerpo. En contraposición a las terapias tradicionales, donde se muestra una curva de concentración del fármaco en el organismo en forma de sierra, los sistemas de liberación controlada de fármacos están diseñados para mantener los niveles terapéuticos durante el tratamiento, lo que permite aumentar su actividad y disminuir su toxicidad (Figura 1.24).¹⁰⁴ Hay muchos factores que determinan la dosis y el ritmo de liberación apropiado de un fármaco (ej. las características del propio paciente, la biodisponibilidad del fármaco, la duración del tratamiento, etc.). Teniendo en cuenta estos factores, para sistemas de liberación controlada de fármacos de administración oral, se requieren matrices para una administración diaria. En este caso, se asume que la liberación del fármaco sigue una cinética de orden cero, por lo que la cantidad del mismo incorporada debe ser la indicada para cada tratamiento diario. Sin embargo, en implantes de sistemas de liberación controlada de fármacos de larga duración debe considerarse que la biodisponibilidad del medicamento es generalmente mayor que en la administración oral, y que la liberación del medicamento debe durar varios días o incluso semanas.

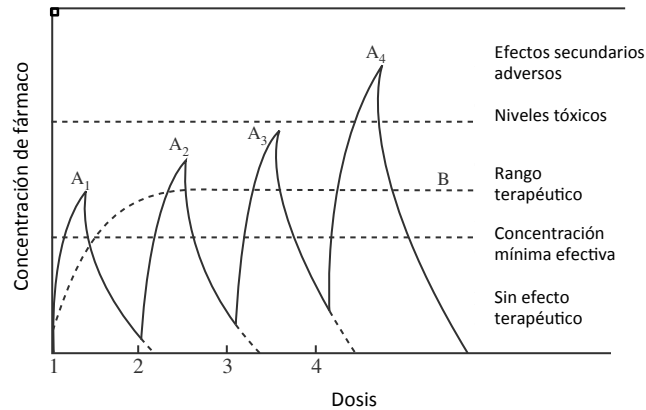


Figura 1.24. Concentración de fármaco en sangre tras la administración tradicional de dosis secuenciales (A_x). Representado con guiones (B), curva ideal para un sistema de liberación controlada de fármacos.¹⁰⁵

El diseño racional de sistemas de liberación controlada debe tener en cuenta el entorno fisiológico donde se va a administrar el fármaco concreto. Estos sistemas ofrecen un grado de libertad significativo en la elección del modo de administración. Mientras que muchas formulaciones tradicionales deben inyectarse o ingerirse, los sistemas de liberación controlada pueden encontrarse en forma de parches, cremas, implantes, etc. Gracias a ello, han aparecido nuevas rutas de administración de fármacos: a través de las membranas nasales, de las membranas mucosas bucales, a través del ojo, de la piel, entre otras.¹⁰⁶

En los últimos años, ha habido un crecimiento exponencial en el estudio y desarrollo de sistemas de liberación controlada (Figura 1.25). En la actualidad existen numerosos sistemas DDS, cada uno con diferentes propiedades, ventajas e inconvenientes. Los liposomas fueron los primeros sistemas descritos como posibles portadores de fármacos.¹⁰⁷ Su forma esférica y pequeño tamaño, normalmente entre 25-250 nm, proporciona una buena plataforma para conseguir una circulación prolongada del fármaco, aumentando su acumulación en tumores mediante el efecto EPR. La naturaleza química de los liposomas, con un centro acuoso rodeado de una membrana bilipídica, los hace portadores ideales de fármacos con diferente solubilidad (Figura 1.26A). Así, los fármacos hidrofóbicos se encapsulan en el centro acuoso, mientras que los hidrofílicos pueden situarse en la membrana.¹⁰⁸ En liposomas

multilaminares, los fármacos hidrofílicos pueden estar encapsulados en el centro del liposoma y/o en el espacio acuoso entre las láminas. Las nanopartículas sólidas basadas en lípidos son otro tipo de liposomas que presentan estructuras rígidas estabilizadas por medio de surfactantes, y han demostrado buenos resultados en el transporte de fármacos al cerebro (Figura 1.26B).¹⁰⁹ El primer sistema de liberación controlada aprobado para su uso clínico es el Doxil®. Este sistema se basa en el uso de liposomas cubiertos con polietilenglicol (PEG) para la encapsulación del fármaco anticancerígeno doxorubicina. Doxil® es seis veces más efectivo que el fármaco libre, aumentando el tiempo de circulación y la acumulación de la doxorubicina en la zona tumoral, gracias a la lenta liberación de dicho fármaco. Además, presenta una potente actividad antineoplásica frente a una gran variedad de cánceres, incluyendo el sarcoma de Kaposi y el cáncer de ovario. A pesar del éxito de los liposomas como portadores de fármacos, presentan limitaciones en cuanto a la estabilidad en medio biológico y en los perfiles de liberación *in vivo*.¹¹⁰

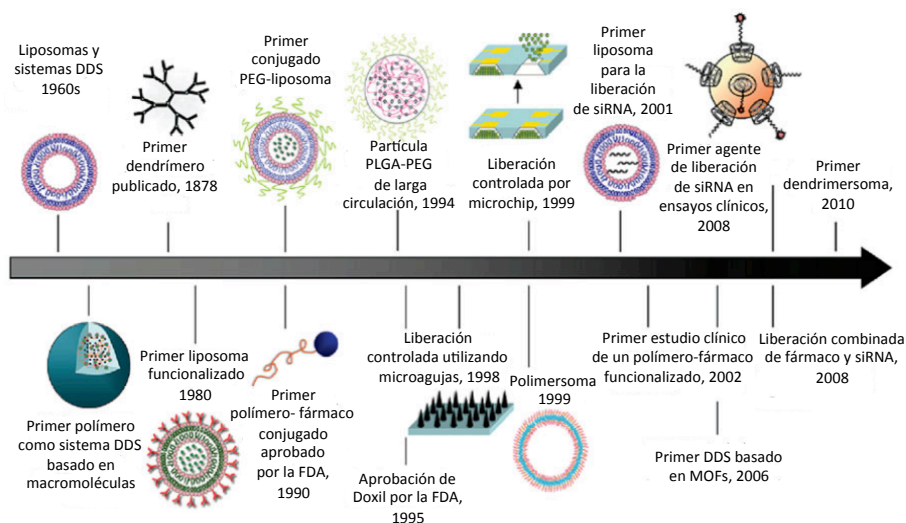


Figura 1.25. Escala temporal del desarrollo de los sistemas de liberación controlada. Se muestran los descubrimientos más importantes a través de la historia de los sistemas DDS.

Los polímeros son otro tipo de sistemas de liberación controlada que se han estudiado. Existe una gran variedad de polímeros con aplicaciones biológicas, por lo que su clasificación resulta difícil (Figura 1.26C). De forma general, existen dos tipos de sistemas DDS basados en polímeros; los polímeros coloidales, donde el polímero encapsula al fármaco, y los polímeros conjugados, donde el fármaco se une covalentemente al polímero. Los

polímeros tienen un diámetro entre 10 y 1000 nm, y pueden estar formados por una gran variedad de polímeros biodegradables (ej. albúmina, quitosano, alginato) o no biodegradables.¹¹¹ En la última década, se ha aprobado por la Agencia de alimentos y medicamentos, FDA (*Food and Drug Administration*), el uso de sistemas poliméricos biodegradables como PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico) para el uso humano.¹¹²

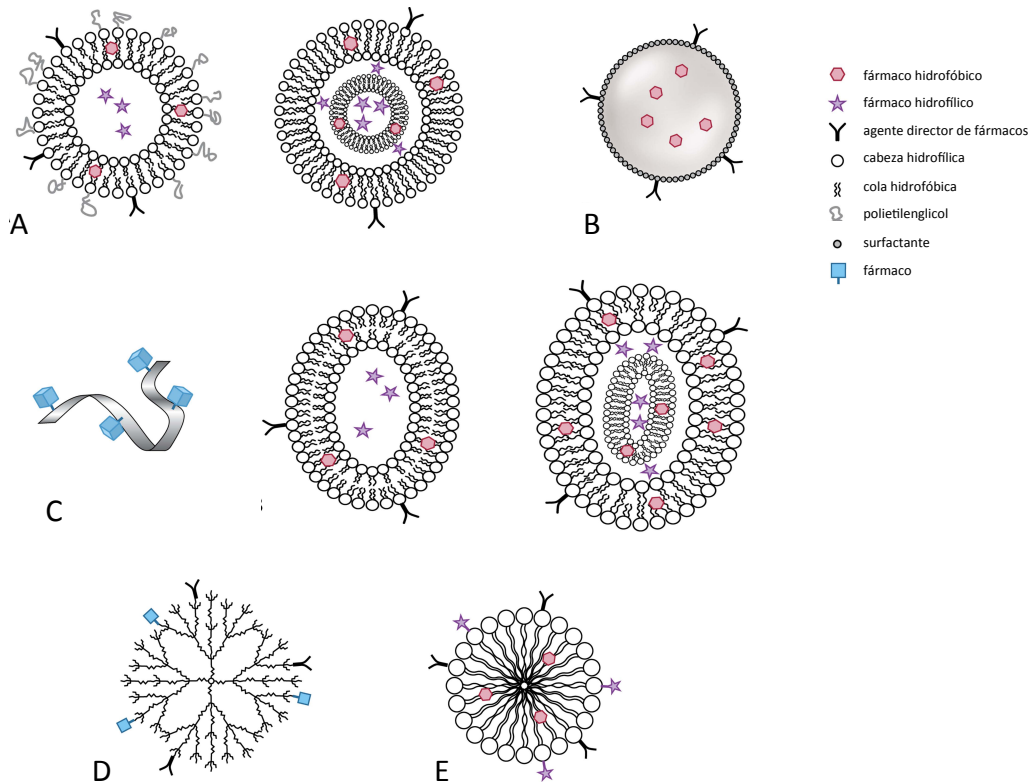


Figura 1.25. Representación esquemática de los sistemas de liberación de fármacos más estudiados: A) Liposomas unilaminares o multilaminares. B) Nanopartículas sólidas basadas en lípidos estabilizadas por medio de surfactantes. C) Polímero conjugado con fármacos y polímeros coloidales o polimerosomas (uni y multilaminares). D) Dendrimeros muy ramificados con numerosos grupos terminales. E) Micelas poliméricas coloidales.¹⁰⁹

Por otro lado, los dendrimeros son otro tipo importante de sistemas de encapsulación de fármacos debido a que presentan una arquitectura y unas características macromoleculares únicas. Se trata de macromoléculas esféricas sintéticas que presentan muchas ramificaciones y un diámetro entre 5-200 nm. Un dendrímero consiste en un centro iniciador, muy ramificado con unidades que se repiten, y con múltiples grupos terminales (Figura 1.26D). La arquitectura de los dendrimeros permite, en una misma estructura encapsular

una molécula bioactiva, un agente de diagnosis y un motivo molecular capaz de reconocer a las células tumorales. En un estudio comparativo, el dendrímero biodegradable basado en el poliéster ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico ha demostrado tener una eficacia similar al Doxil® frente a una línea celular de carcinoma de colon.⁷⁹ Los dendrímeros presentan muchas características atractivas, que incluyen, por ejemplo, un control preciso en la arquitectura y tamaño de las partículas y la disponibilidad de múltiples centros reactivos donde unir fármacos, entre otros. Sin embargo, existen algunos inconvenientes acerca de su toxicidad, ya que normalmente están formados por materiales que no son biodegradables, y que pueden acumularse en los tejidos biológicos.¹¹³

Asimismo, las micelas poliméricas son otro tipo de sistemas de liberación controlada de fármacos de naturaleza coloidal, con un diámetro entre los 5-100 nm. Las micelas están constituidas por motivos anfifílicos, con una cabeza hidrofílica y una cola hidrófoba (Figura 1.26E). Las micelas son estructuras monodispersas, que pueden transportar fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos o una combinación de ambos. Además, se han descrito micelas capaces de almacenar y liberar gases con fines terapéuticos.¹¹⁴ Sin embargo, son estructuras muy dinámicas e inestables ya que en sistemas naturales presentan una elevada tasa de intercambio de monómeros.¹¹⁵

Por otro lado, algunos materiales inorgánicos porosos clásicos, tales como zeolitas, sílices mesoporosas y materiales carbonosos, se han investigado como sistemas de liberación de fármacos. Estos materiales porosos se caracterizan por poseer una alta relación superficie/masa por lo que potencialmente presentan una gran habilidad para alojar agentes terapéuticos en sus cavidades. Las zeolitas son aluminosilicatos con elevada área superficial y porosidad permanente que, gracias a estas propiedades superficiales, se han investigado como agentes para la liberación controlada de fármacos. El grado de hidrofobicidad de sus cavidades se puede controlar ajustando el ratio Si/Al de la red, según las características del fármaco que se quiera encapsular. Existen pocos estudios de la aplicación de las zeolitas como sistemas de liberación controlada de fármacos. Algunos ejemplos son la aplicación de la zeolita β (BEA) para la liberación de salbutamol y teofilina, o la

zeolita natural clinoptilolita para la liberación de sulfametoxazol y metronidazol.¹¹⁶ Las sílices mesoporosas se caracterizan por presentar un diámetro de partícula entre 50 y 300 nm, además de una gran área superficial y un tamaño de poro entre 3 y 6 nm. La primera sílice mesoporosa descrita como sistema de liberación controlada de fármacos es la MCM-41.¹¹⁷ Desde entonces, numerosas sílices mesoporosas han sido descritas como potenciales agentes de liberación controlada de fármacos. La morfología y el tamaño de poro en las sílices mesoporosas son características determinantes a la hora de elegir la molécula que va a ser adsorbida. Por otra parte, la máxima capacidad de adsorción dependerá de la superficie específica y del volumen de poro. Además, gracias a la presencia de grupos silanol, las paredes internas del poro pueden funcionalizarse con una gran variedad de especies químicas, aumentando así la fortaleza de la interacción de la matriz porosa con determinados huéspedes. Todas estas características mencionadas, hacen de las sílices mesoporosas buenos candidatos para la adsorción y transporte de fármacos con diferentes propiedades químicas.¹¹⁸ Además, es posible diseñar sílices mesoporosas provistas de un “tapón” que cierra la entrada del poro, de forma que se evita la liberación prematura del fármaco. Cuando se aplica un estímulo externo (cambio de pH, temperatura, ultrasonidos, luz, etc.), el tapón se abre y las moléculas bioactivas almacenadas se liberan (Figura 1.27).¹¹⁹ Sin embargo, algunas de estas sílices muestran una baja capacidad de adsorción del compuesto activo, lo que conlleva una pobre carga (normalmente del 5% en peso) y/o una rápida liberación de la misma debido a que, en la mayoría de los casos, su interacción con la superficie de la matriz porosa es muy débil. Por último, también existen sistemas de liberación controlada de fármacos basados en materiales carbonosos: fullerenos y nanotubos de carbono (Figura 1.28F). Los fullerenos, con un diámetro cercano a 1 nm, son los portadores más pequeños. Los nanotubos pueden ser de tipo monocapa o estar formados por una serie de tubos concéntricos (de 2 a 10 capas), y presentan un diámetro entre 1 y 10 nm, dependiendo del número de capas. Por ejemplo, estos transportadores se han ensayado para la liberación controlada de compuestos de Pt(IV) como *c,c,t*-[Pt(NH₂)Cl₂(OEt)(O₂CH₂CH₂CO₂H)] o el fármaco comercial doxorubicina.¹²⁰

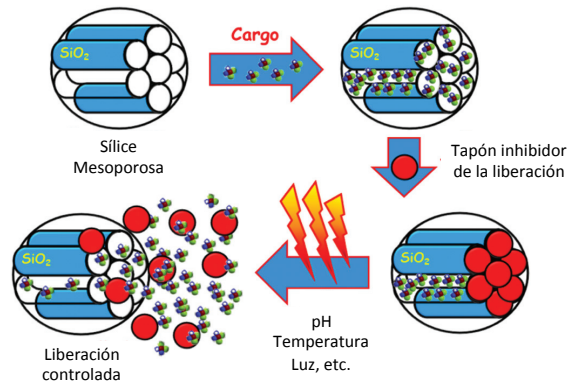


Figura 1.27. Representación esquemática del proceso de encapsulación y liberación de fármacos en una sílice mesoporosa. La aplicación de un estímulo externo provoca la eliminación de los tapones y la liberación del fármaco almacenado.

Además de estos sistemas de liberación controlada clásicos, existen otros tipos más novedosos (Figura 1.28). Los sistemas portadores basados en proteínas son sistemas biocompatibles que se presentan como una alternativa para la administración de fármacos de gran toxicidad (Figura 1.28A).¹²¹ Los sistemas basados en polisacáridos se caracterizan por ser estructuras muy hidrófobas que permiten una fácil funcionalización mediante reacciones químicas sencillas (Figura 1.28B).¹²² Los sistemas de transporte de moléculas activas derivados de virus son muy eficaces en procesos de transfección (normalmente > 90%), con potencial aplicación en terapia génica o en el transporte de oligonucleótidos (Figura 1.28C).¹²³ Las nanopartículas metálicas de Au, Ag y Pt, son otro tipo de sistemas de liberación controlada de fármacos muy utilizados (Figura 1.28D). Por ejemplo, las nanopartículas de Au son particularmente interesantes como reserva de fármacos ya que son capaces de unirse a un gran número de moléculas (teragnosis, terapias combinadas, etc.).¹²⁴ Los *quantum dots* son un tipo de partículas compuestas normalmente por materiales semiconductores, como el óxido de zinc, el sulfato de cadmio, y telururo de cadmio, con un tamaño comprendido entre los 2.5 y 100 nm (Figura 1.28E). Los *quantum dots* son especialmente útiles en terapia de imagen, ya que al conjugarlos con ligandos directores, como anticuerpos, e irradiarlos a cierta longitud de onda, es posible localizar de forma precisa las células tumorales.¹²⁵

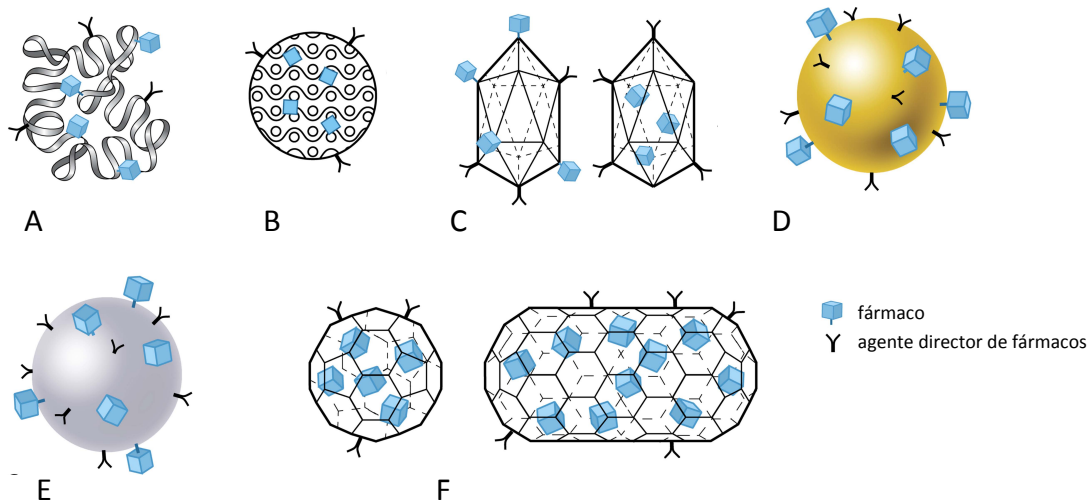


Figura 1.28. Representación esquemática de los sistemas de liberación de fármacos más novedosos. A) Sistemas de liberación de fármacos basados en proteínas. B) Sistemas de liberación de fármacos basados en polisacáridos. C) Sistemas de liberación de fármacos derivados de virus. D) Nanopartículas metálicas. E) *Quantum dots*. F) Sistemas de liberación de fármacos basados en carbono (fullerenos y nanotubos).¹⁰⁹

Por otro lado, se ha demostrado que el uso de “nanotransportadores” mejora la eficacia en la liberación, dirección y protección del fármaco encapsulado hasta la diana deseada. El tiempo de circulación de los sistemas DDS en el organismo viene determinado por su tamaño, la tasa de eliminación a través de la excreción renal y la interacción con el sistema retículo endotelial (RES). Mientras las partículas pequeñas son eliminadas fácilmente por los riñones, las partículas demasiado grandes son eliminadas por el RES. La eliminación de los portadores de fármacos por el RES reduce su biodisponibilidad. De forma general, se considera que los sistemas de liberación controlada con un diámetro menor que 200 nm son más eficientes en la extravasación hacia el tumor (Figura 1.29).¹²⁶

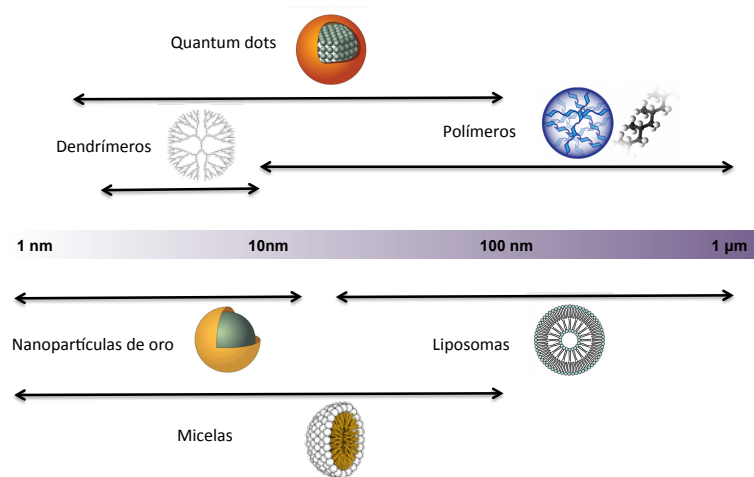


Figura 1.29. Nanopartículas utilizadas como sistemas de liberación controlada y sus tamaños.

Otro tipo de estrategia para aumentar el tiempo de circulación de los sistemas de liberación controlada de fármacos es cubrirlos con sustancias biocompatibles. La modificación de la superficie de los sistemas DDS con cadenas hidrofílicas de polietilenglicol (PEG), quitosano, etc., aumenta su tiempo de circulación en sangre, reduciendo su inmunogenicidad e inhibiendo su reconocimiento y eliminación. Además, esta capa protectora mejora la estabilidad del portador, y reduce la adsorción y agregación de las proteínas presentes en sistemas biológicos.¹²⁷

Como en el caso de los fármacos libres, los sistemas de liberación de fármacos pueden funcionalizarse con el fin de conseguir una quimioterapia dirigida. Uniendo a los sistemas DDS motivos estructurales como ácido fólico, antígenos, etc., se consigue dirigirlos de forma preferencial hacia las células tumorales, reduciendo los efectos secundarios.¹²⁸ Otra característica importante es que, gracias a la gran versatilidad que presentan los sistemas de liberación controlada de fármacos, se pueden funcionalizar con marcadores fluorescentes, radioisótopos, agentes de contraste, etc., integrando en la misma partícula terapia e imagen (Figura 1.30). Además, se pueden integrar en el mismo portador diferentes fármacos, consiguiendo un efecto combinado de varias moléculas bioactivas.

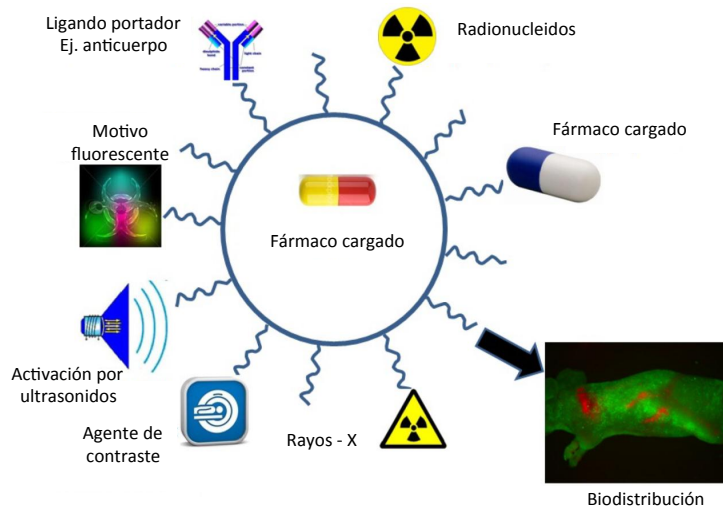


Figura 1.30. Ilustración de una partícula multifuncionalizada. Los sistemas DDS además de liberar el fármaco de una forma controlada pueden funcionalizarse con marcadores, ligandos asociados a receptores específicos, etc.

En general, la cantidad de fármaco almacenado en un sistema de liberación controlada depende del disolvente utilizado para su encapsulación, del pH durante el proceso de adsorción, así como de la concentración de fármaco utilizada. Por otro lado, la liberación de un fármaco depende tanto de su naturaleza fisicoquímica, como de la matriz que lo encapsula. Los fármacos pueden estar adsorbidos, disueltos o dispersos en el sistema de liberación controlada; o de forma alternativa, pueden estar unidos mediante enlaces covalentes al portador. En las interacciones no covalentes, el fármaco mantiene sus propiedades hasta su liberación (normalmente por difusión); mientras que en interacciones covalentes, el fármaco ha de ser liberado por medio de estímulos externos (como interacciones con biomoléculas, cambios de pH, etc.). En otros casos, el agente liberado es un profármaco que ha de ser procesado hasta su forma activa. Otro factor determinante en el mecanismo de liberación de un fármaco es la estabilidad del sistema portador. Para aplicaciones biológicas, los sistemas portadores de fármacos han de ser lo suficientemente estables para liberar el fármaco de forma controlada, sin que por ello no sea posible su biodegradación posterior y consiguiente eliminación del cuerpo con el fin de prevenir su acumulación y toxicidad.

Por último, es posible liberar el fármaco directamente en el interior de la célula tumoral. Siguiendo la misma estrategia que para el fármaco libre (tratamiento intracelular), la funcionalización de los sistemas de liberación controlada de fármacos con péptidos de inserción celular (*cell-penetrating peptides*, CPPs) facilita la entrada del portador a la célula cancerígena, para después liberar el fármaco en el citosol. Esta estrategia es beneficiosa para aquellos fármacos que son eliminados rápidamente del interior celular por medio de proteínas asociadas a resistencia adquirida. Una vez dentro de la célula, la química de los sistemas de liberación controlada de fármacos puede participar en la liberación del fármaco, por ejemplo interaccionando con especies presentes en el citosol que aceleran su degradación, o en respuesta a cambios de pH, etc.¹²⁹

Como se ha visto en este apartado, existe una gran variedad de sistemas de liberación controlada de fármacos. No existe un sistema de liberación controlada de fármacos ideal, ya que todos presentan pros y contras dependiendo de la bioaplicación. La gran diversidad de cánceres existentes requiere del desarrollo de una gran variedad de sistemas portadores que mejoren la efectividad del tratamiento, reduciendo los efectos secundarios. Por lo tanto, nuevos materiales portadores capaces de almacenar, proteger y dirigir los fármacos hasta la diana apropiada, pueden jugar un papel esencial en el desarrollo de nuevas terapias más eficaces.

1.3.3 Bioaplicaciones de MOFs

En los últimos quince años, se han desarrollado un nuevo tipo de materiales inorgánicos porosos conocidos como polímeros de coordinación porosos (PCPs) o redes metalorgánicas (MOFs), basados en iones metálicos enlazados a espaciadores orgánicos de forma que se genere una red porosa accesible a moléculas huésped (Figura 1.31). La búsqueda de estos materiales surgió de la necesidad de mejorar las limitaciones de los materiales inorgánicos porosos clásicos (zeolitas y materiales carbonosos) inherentes a la rigidez del esqueleto poroso, a la dificultad en su funcionalización y a la ausencia de homoquiralidad. De hecho, los PCPs poseen algunas características que

claramente mejoran las de los materiales porosos convencionales, tales como: *i)* estructuras porosas bien ordenadas que muestran comportamientos dinámicos y flexibles en respuesta a moléculas huésped;¹³⁰ *ii)* el carácter funcionalizable de la superficie de los poros, lo que origina propiedades catalíticas selectivas,¹³¹ y *iii)* un esqueleto estructural que, al igual que en sólidos densos, es responsable de propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas.¹³² Todas estas propiedades son de gran interés para el desarrollo de materiales multifuncionales avanzados con potencial impacto social.

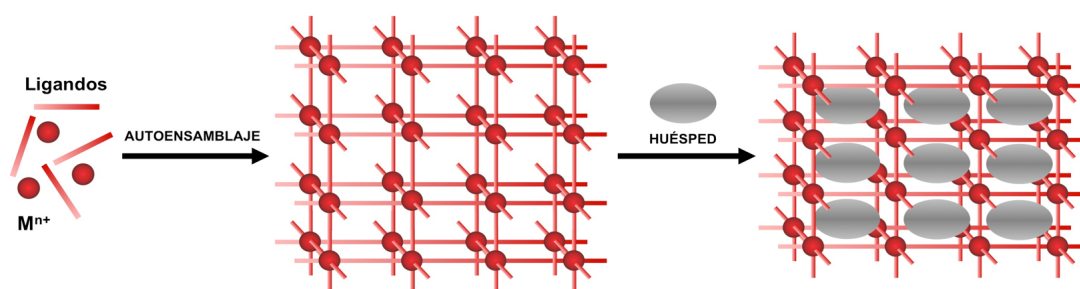


Figura 1.31. Formación de la red porosa de un polímero de coordinación y el proceso de reconocimiento molecular.

En los últimos diez años, el campo de investigación sobre MOFs ha experimentado una apreciable evolución desde su etapa inicial, centrada en la descripción de la síntesis y en la caracterización estructural y textural de este tipo de sólidos porosos, hacia un nuevo periodo en el que se busca la formación de materiales avanzados con aplicaciones en campos diversos, tales como en procesos de separación y purificación de gases,¹³³ catálisis heterogénea,¹³⁴ nanomateriales,¹³⁵ e incluso aplicaciones biomédicas.¹³⁶ Esta Tesis Doctoral se centra en las potenciales aplicaciones biomédicas de los MOFs y, en concreto, en el uso de estas matrices porosas como sistemas para la liberación controlada de metalofármacos no convencionales. Por tanto, en primer lugar habría que establecer las características deseables en los MOFs destinados a dicha aplicación. Dichas propiedades son las siguientes:

- i)* Elevado volumen de poro, con el objetivo de que los MOFs tengan una alta capacidad de adsorción de moléculas bioactivas.

ii) Tamaños de poro y ventanas de acceso a los mismos adecuadas para el acceso de moléculas bioactivas de gran tamaño.

iii) Funcionalización adecuada de los poros (hidrofobicidad, hidrofiliidad, etc.) que de lugar a interacciones matriz-huésped que permitan la reversibilidad del proceso de adsorción, así como cinéticas de adsorción/desorción apropiadas en condiciones fisiológicas. Debe destacarse que gracias a la modulación de la fortaleza de la interacción anfitrión-huésped -modificando la funcionalización de las cavidades-, del tamaño de poro y de la flexibilidad de la red -mediante la elección adecuada de los ligandos y los metales- se puede controlar la cinética de liberación del fármaco.^{136b}

iv) Presencia de centros metálicos insaturados a los que se puedan coordinar moléculas bioactivas.

v) Enlaces de coordinación metal-ligando lo suficientemente robustos como para evitar la rápida biodegradación del MOF en el medio fisiológico y liberación descontrolada del fármaco, pero lo suficientemente lábiles como para permitir la degradación de la matriz porosa una vez liberado el fármaco y evitar la acumulación endógena de la misma (Figura 1.32). En definitiva, la estructura cristalina, la composición, el tamaño de partícula y la formulación, influyen en la degradación de los MOFs que puede variar desde días (ej. el MOF-5, $Zn_4O(BDC)_3$ (BDC = 1,4-bencenodicarboxilato) hasta varias semanas (por ejemplo, más de tres semanas) (ej. MIL-100(Fe), $[Fe_3OX(H_2O)(BTC)_2]$ (X = F, OH) en condiciones fisiológicas.¹³⁷

vi) Presencia de metales no tóxicos en sus estructuras para que al ser degradados *in situ*, los productos de degradación sean eliminados gracias al metabolismo del organismo.

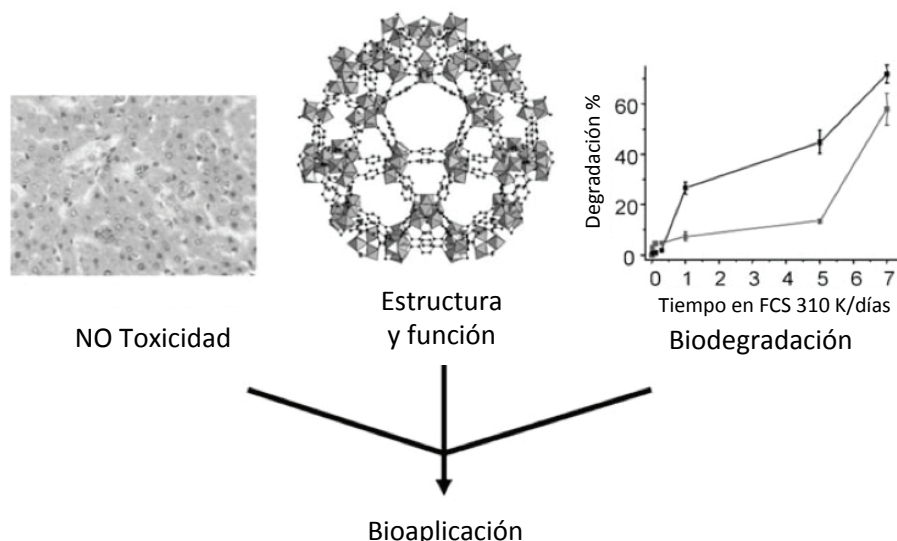


Figura 1.32. La estructura y peculiaridades de los MOFs combinados con una baja toxicidad y biodegradación ofrecen interesantes aplicaciones en medicina.

Como resultado de lo anteriormente expuesto, los polímeros de coordinación porosos se consideran hoy día, como posibles candidatos para la liberación controlada de fármacos. El primer grupo de MOFs considerados como potenciales sistemas de liberación controlada es la serie MIL (Materiales del Instituto Lavoisier) desarrollada por Férey y colaboradores.¹³⁸ De forma general, los materiales MIL están sintetizados a partir de centros metálicos trivalentes unidos a ligandos carboxílicos. Se consideran buenos candidatos para la liberación controlada de fármacos porque presentan grandes poros (25 - 34 Å), superficies específicas elevadas (3100 - 5900 m² g⁻¹), y ofrecen la posibilidad de funcionalizar la superficie interna y externa. Por ejemplo, se ha estudiado el proceso de incorporación y liberación de ibuprofeno en los MOFs MIL-100 y MIL-101, y se ha relacionado la cantidad de fármaco incorporada y su cinética de liberación con las características estructurales de las matrices porosas.¹³⁹ La fórmula de estos compuestos es [Cr₃OX(H₂O)₂L_n], donde X = F, OH, y L = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (BTC) y n = 2 para el MIL-100, o L = ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) y n = 3 para el MIL-101. Se ha demostrado que el MIL-100 es capaz de incorporar 0.35 g de ibuprofeno / g de MIL-100 deshidratado, mientras que el MIL-101 es capaz de adsorber 1.4 g de ibuprofeno / g de MIL-101 deshidratado. El hecho de que el ibuprofeno (10 x 5 Å) pueda entrar a través de las ventanas pentagonales (12 Å) y hexagonales

(16 Å) del MIL-101, y hexagonales (9.8 Å) del MIL-100, pero no pueda pasar a través de las pequeñas ventanas pentagonales (4.8 Å) del MIL-100, explica la mayor capacidad de carga del MIL-101 (Figura 1.33). Con el fin de desarrollar alternativas biocompatibles, se ha sustituido el átomo tóxico Cr(III), por su análogo Fe(III) menos tóxico, dando lugar a las estructuras porosas MIL-100(Fe) y MIL-101(Fe).¹⁴⁰

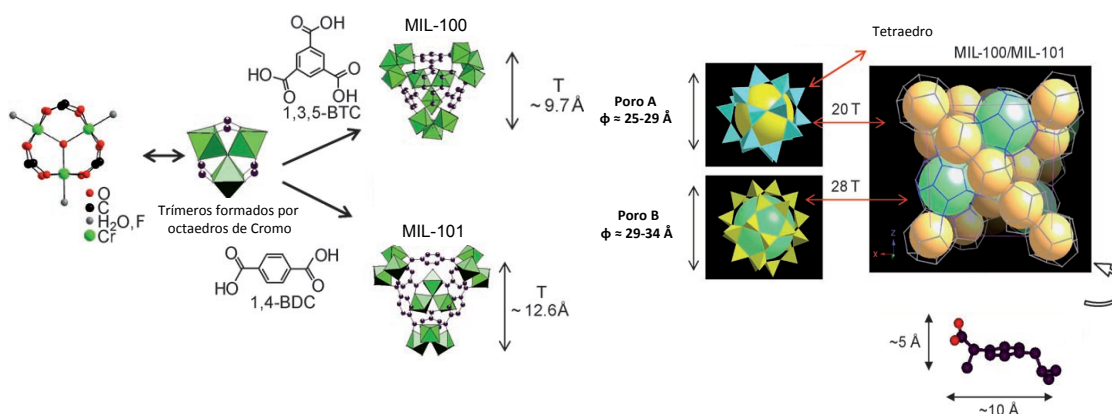


Figura 1.33. Arriba: representación esquemática en 3D de los tetraedros formados a partir de átomos de Cr y ligandos tris o bis carboxílicos para la formación de MIL-100 y MIL-101, respectivamente. Abajo: Representación esquemática en 3D de las estructuras, con representación de las cavidades **pequeñas** y **grandes**.

Otro ejemplo que se debe destacar de la serie MIL es el MOF MIL-53(Fe), $[\text{Fe}(\text{OH})\text{BDC}]$ (H_2BDC = ácido benceno-1,4-dicarboxílico), que presenta una estructura flexible en respuesta a moléculas huésped (Figura 1.34). La transición entre la forma hidratada (MIL-53np) y el sólido activado (MIL-53lp) es totalmente reversible y conlleva un gran cambio en el tamaño de los poros (más de 5 Å). Mientras la estructura está hidratada, los poros se cierran (MIL-53np) y se abren cuando las moléculas huésped son desorbidas de los canales (MIL-53lp). Horcajada y colaboradores demostraron la utilidad del compuesto MIL-53 para aplicaciones biológicas. La matriz porosa MIL-53 es capaz de adsorber ibuprofeno (20% en peso), y liberarlo en fluido corporal simulado (FCS) a lo largo de 3 semanas, siguiendo una cinética de liberación de orden cero. La flexibilidad de la estructura del MIL-53 para acoger el fármaco es la causa de que este sistema sea capaz de liberar ibuprofeno durante tanto tiempo, ya que mientras se refuerzan las interacciones de enlace, el impedimento estérico se reduce.¹⁴¹

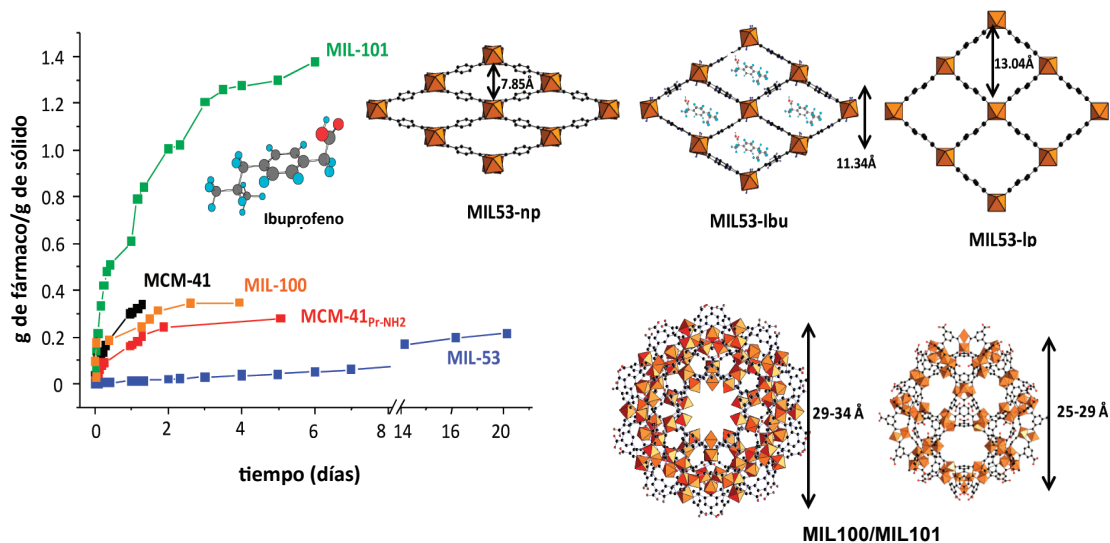


Figura 1.34. Izquierda: Cinética de liberación del ibuprofeno encapsulado en diferentes matrices porosas (en FCS, 310 K). Arriba a la derecha: Flexibilidad de los poros del MIL-53: hidratado (izquierda), con ibuprofeno (centro) y la forma deshidratada abierta (derecha). Abajo derecha: Esquema de los poros grande (izquierda) y pequeño (derecha) del MIL-100/MIL-101. Octaedros metálicos, Oxígeno, Carbono.

Las posibilidades que ofrecen los MOFs como sistemas liberadores de fármacos quedan demostradas en un estudio comparativo de la liberación de ibuprofeno incorporado en diferentes matrices porosas (Figura 1.34). La cinética de liberación de ibuprofeno es diferente según la matriz porosa utilizada. Por ejemplo, utilizando MIL-53 se consigue la liberación más prolongada que alcanza hasta los 20 días, mientras que con el MIL-101(Fe) o utilizando las sílices mesoporosas MCM-41_{Prop_NH2} y MCM-41, la liberación del fármaco se mantiene durante 6, 5 y 1 día, respectivamente. Además, la serie MIL presenta una capacidad de adsorción y liberación de ibuprofeno mayor que las zeolitas convencionales. Por tanto, se ha demostrado que según la matriz porosa utilizada se consiguen cinéticas de liberación diferentes. Asimismo, en el caso concreto de los MOFs, la elección adecuada de ligandos y metales permite controlar la cinética de liberación del fármaco, según las necesidades del tratamiento.¹⁴²

Por otra parte, en general, la liberación de las moléculas adsorbidas en las cavidades de una matriz porosa, como por ejemplo una red metalorgánica, se debe a un proceso de desorción en un medio fisiológico a través de un

intercambio con la fase acuosa. Como se ha mencionado anteriormente, hay que considerar que la degradación de la matriz porosa, que actúa como portadora, conlleva un suplemento de liberación del fármaco. Además, se liberan al medio fisiológico los componentes de dicha matriz porosa (iones metálicos y ligandos orgánicos) que pueden ser potencialmente tóxicos. En este sentido, existe la idea preestablecida de que un MOF con baja estabilidad frente a la hidrólisis no es muy útil como sistema para la liberación controlada de fármacos. Sin embargo, una línea de investigación emergente aprovecha la degradación de estas matrices porosas para conseguir una liberación del fármaco eficiente. Li y colaboradores diseñaron un sistema racional para construir MOFs a partir de algunos aminoácidos cíclicos que presentan actividad terapéutica.¹⁴³ En este caso, la liberación de los ligandos al medio, como consecuencia de la degradación del MOF, tiene un efecto terapéutico en sí mismo. Estos materiales cuyos constituyentes son en sí mismos moléculas con actividad terapéutica se conocen como bioMOFs. Existen muchos fármacos o moléculas bioactivas orgánicas que presentan sitios de unión accesibles a metales de transición, pudiendo formar complejos cristalinos porosos con cavidades lo suficientemente grandes como para incluso alojar otros medicamentos. De esta forma, se conseguirían materiales multifuncionales que actuarían como agentes terapéuticos en sí mismos a la vez que como cápsulas de otras moléculas bioactivas (ej. terapias combinadas contra el cáncer). Existe una gran variedad de bioMOFs descritos basados en diferentes biomoléculas: aminoácidos,¹⁴⁴ péptidos,¹⁴⁵ proteínas,¹⁴⁶ nucleobases,¹⁴⁷ carbohidratos¹⁴⁸ y otras biomoléculas más pequeñas.¹⁴⁹ McKinlay y sus colaboradores introdujeron una molécula bioactiva como ligando (ácido nicotínico) y un metal paramagnético (Fe, Gd) como parte del bioMIL-1 (Figura 1.35).¹³⁷ La combinación de la bioactividad del ligando, con las técnicas de imagen derivadas de los metales paramagnéticos, demuestra la posible aplicación de los bioMOFs en teragnosis.

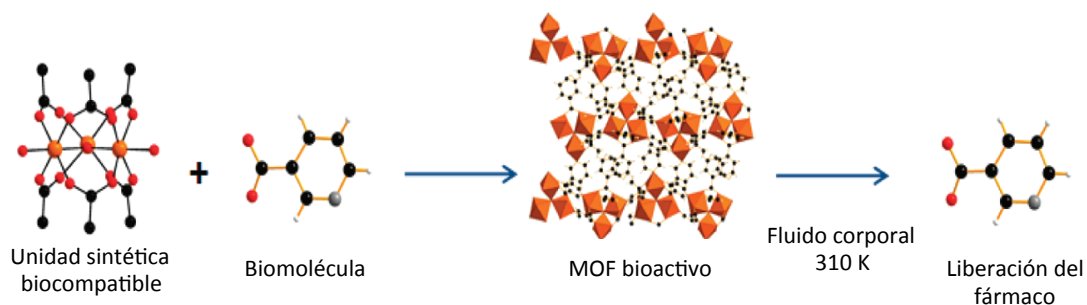


Figura 1.35. Esquema de la formación de un bioMOF (bioMIL-1) construido a partir de un ligando bioactivo y su liberación. En este caso, el ligando bioactivo es ácido nicotínico. Hierro, Oxígeno, Nitrógeno, Carbono.

Otro ejemplo de bioMOF es el bio-MOF-1, $[Zn_8(ad)_4(BPDC)_6O \cdot 2(CH_3NH_2)]$ constituido por adenina (ad) y ácido bifenildicarboxílico (H_2BPDC), como ligandos bioactivos, y el ion metálico biorrelevante $Zn(II)$. La adenina es un ligando ideal para la síntesis de bio-MOFs ya que, además de ser biológicamente compatible, es una molécula rígida, con múltiples puntos de unión a metales de transición y con una química de coordinación bien estudiada. En este caso, la naturaleza aniónica intrínseca del bio-MOF-1 permite la adsorción de moléculas bioactivas catiónicas, y el control de su liberación gracias a un proceso de intercambio catiónico entre el fármaco y los cationes presentes en medios biológicos. Este MOF aniónico ha sido cargado con procainamida (fármaco utilizado normalmente para el tratamiento de arritmias) consiguiendo una carga de 0.22 g de procainamida / g de bio-MOF-1. Cuando el compuesto bio-MOF-1 cargado con procainamida se suspende en agua, solo se consigue liberar el 20% del fármaco, mientras que en un tampón fosfato salino (PBS) todo el fármaco encapsulado se libera a las 72 horas (Figura 1.36). Estos resultados sugieren que la liberación de la procainamida está controlada por los cationes presentes en la disolución tampón.¹⁵⁰



Figura 1.36. Arriba: Esquema de la liberación de procainamida encapsulada en la red porosa bio-MOF-1 controlada por el intercambio entre el fármaco y los cationes presentes en el medio. Abajo: diferencias entre la cinética de liberación en PBS y agua.

La combinación entre iones metálicos y espaciadores orgánicos y/o moléculas bioactivas permite la obtención de una gran variedad de sistemas con diferentes propiedades. Recientemente, se han descrito algunos MOFs con propiedades magnéticas, electrónicas y ópticas con posibles aplicaciones biológicas.¹⁵¹ Sin embargo, algunos MOFs tienen poca aplicabilidad *in vivo* debido a que no son apropiados para la circulación en sistemas biológicos. De acuerdo con lo expuesto en el apartado anterior, el tiempo de circulación de un fármaco en el organismo viene determinado entre otros factores por su tamaño. Por lo tanto, es necesaria la reducción del tamaño a escala nanométrica (nanoMOFs), de modo que los MOFs puedan circular a través de los fluidos corporales el mayor tiempo posible, sin dar lugar a procesos de toxicidad. En este sentido, Horcajada y colaboradores sintetizaron una serie de MOFs porosos a escala nanométrica basados en el metal biocompatible Fe(III), (MIL-53, MIL-88A, MIL-88Bt, MIL-89, MIL-100 y MIL-101-NH₂) para la encapsulación de una serie de fármacos antitumorales y retrovirales (busulfan (Bu), trifosfato de azidotimidina, doxorubicina o cidofovir) (Tabla 1.3).¹⁵² Entre todos, hay que destacar que la matriz porosa MIL-100 presenta una carga excepcional de Bu (25% en peso), que es cinco veces mayor que la capacidad de encapsulación de otros sistemas basados en polímeros (5 - 6%), y 60 veces mayor que en sistemas de liberación basados en liposomas (0.4%). La capacidad de una matriz porosa para encapsular fármacos viene determinada, entre otros factores, por el volumen de poro. Las matrices MIL-88A, MIL-53 y MIL-89, con un tamaño de poro menor, son capaces de adsorber menos fármaco que la matriz porosa MIL-100 (Tabla 1.3). A pesar de esta limitación, la capacidad de

carga de estos materiales sigue siendo mayor que la de los materiales portadores hasta ahora descritos (polímeros, liposomas, etc.). Finalmente, el estudio de la toxicidad y biocompatibilidad de cada uno de los nanoMOFs descritos, confirmó la ausencia de respuesta inmune o reacciones inflamatorias. Por lo tanto, estos nanoMOFs basados en Fe, se presentan como modelo para la mejora de los sistemas de liberación controlada de fármacos utilizados hasta la fecha.

	MIL-89	MIL-88A	MIL-100	MIL-53	MIL-101_NH ₂
Ligando orgánico	Ácido mucónico	Ácido fumárico	Ácido trimésico	Ácido tereftálico	Ácido aminotereftálico
Tamaño de poro (Å)	11	6	25	8.6	29
Tamaño de partícula (nm)	50 - 100	150	200	350	120
Fármaco cargado (%)					
Busulfan	9.8	8.0	25.5	14.3	
Trifosfato de azidotimidina		0.6	21.2	0.24	42.0
Cidofovir	14	2.6	16.1	41.9	
Doxorrubicina			9.1		
Ibuprofeno			33	22	

Tabla 1.3. Tamaño de partícula, tamaño de poro, y capacidad de carga de fármacos (% en peso) para una serie de MOFs basados en Fe(III) y varios ligandos de tipo carboxilato.

Por otro lado, Li y colaboradores han desarrollado una nueva estrategia para sintetizar nanopartículas biodegradables basadas en polímeros de coordinación porosos que contienen *cis*platino como ligando estructural. La síntesis de estos nanoMOFs se llevo a cabo mediante un proceso de nanoprecipitación de *cis*platino e iones Tb(III). Posteriormente, las nanopartículas se estabilizaron con un recubrimiento de sílice, y se funcionalizaron con péptidos capaces de dirigir los nanoMOFs hacia células cancerígenas. De este modo, se consiguió liberar más lentamente el compuesto bioactivo *cis*platino, reduciendo los efectos secundarios y obteniendo una citotoxicidad parecida al fármaco libre.¹⁵³

Por otra parte, los materiales capaces de almacenar y liberar NO resultan interesantes para aplicaciones en las que se debe evitar la formación de trombos en la superficie de material quirúrgico, así como en los *stents* (cánulas) utilizados en cirugía.¹⁵⁴ Recientemente, se han estudiado algunos polímeros,¹⁵⁵ nanopartículas de sílice funcionalizadas¹⁵⁶ y zeolitas¹⁵⁷ para su aplicación en la liberación de NO. Sin embargo, la aplicabilidad de dichos

materiales está limitada, puesto que liberan a su vez especies cancerígenas o pro-inflamatorias como productos secundarios.¹⁵⁸ En este sentido, los MOFs se consideran buenos candidatos para el almacenamiento y liberación de NO pero hay que destacar que para que un material sea efectivo todo el gas almacenado debe liberarse en las condiciones deseadas.¹⁵⁹

El primer MOF estudiado para la liberación controlada de NO fue el HKUST-1, $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2(\text{H}_2\text{O})_3]$ (BTC = benceno-1,3,5-tricarboxilato) (también conocido como Cu-BTC).¹⁶⁰ El HKUST-1 presenta centros metálicos insaturados que, tras la activación del material, actúan como centros donde el NO se coordina fuertemente. Morris y sus colaboradores concluyeron que la capacidad de adsorción del HKUST-1 es 9 (3) mmol de NO / g de MOF a 196 (298) K y 1 bar de presión. A ambas temperaturas, y cuando la presión de NO se reduce a cero, este material es capaz de desorber 2.21 mmol de NO / g MOF (Figura 1.37). Sin embargo, el HKUST-1 solamente libera una pequeña cantidad de NO en contacto con gas húmedo, tras una reacción de intercambio de ligandos de NO por agua, 1 μmol de NO / g de MOF, casi 2 ordenes de magnitud menos que la cantidad inicialmente adsorbida. Este comportamiento se puede achacar a la baja estabilidad del sistema frente a la hidrólisis.

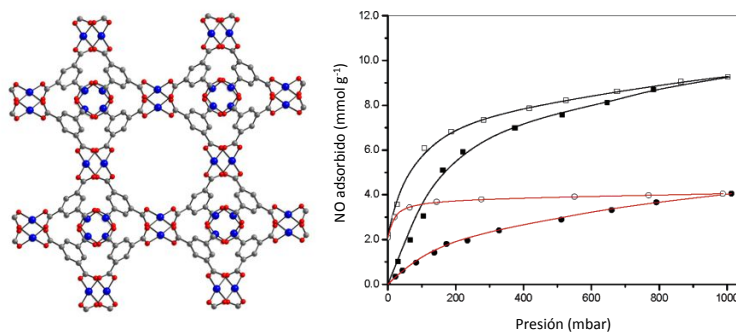


Figura 1.37. Derecha: Estructura cristalina del HKUST-1. **Cobre**, Carbono, **Oxígeno**, Hidrógeno. Izquierda: Isoterma de adsorción (símbolos rellenos) y desorción (símbolos vacíos) de NO a 196 K (cuadrados) y 298 K (círculos) para el MOF HKUST-1.

Posteriormente, Morris y sus colaboradores demostraron que los MOFs CPO-27-Co y CPO-27-Ni, $[\text{M}_2(2,5\text{-dhBDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (M: Ni y Co; H_4dhBDC : ácido 2,5-dihidroxitereftálico) son capaces de adsorber dos veces más NO que el MOF HKUST-1 a temperatura ambiente. Además, hay que destacar que, en este caso, se trata de un proceso reversible, puesto que, en contacto con un

flujo de gas húmedo, son capaces de liberar prácticamente todo el NO almacenado mediante la correspondiente reacción de intercambio de ligandos.¹⁶¹ Los compuestos CPO-27 (Co y Ni) son capaces de liberar aproximadamente 7 mmol NO / g de MOF, 7000 veces más NO que la red porosa HKUST-1 (Figura 1.38). Como en el caso anterior, la fuerte interacción de la serie CPO-27 con el gas se debe a un proceso de quimisorción del NO en los centros metálicos insaturados.

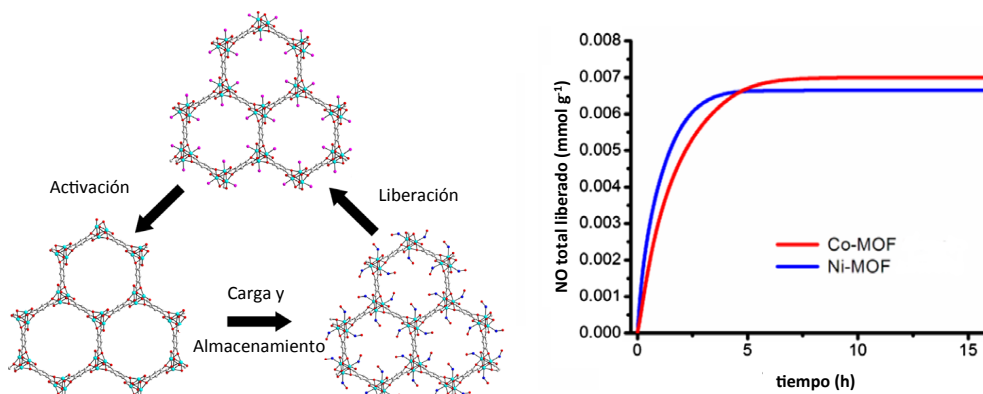


Figura 1.38. Comportamiento excepcional en la captura, almacenamiento y liberación de NO de la serie CPO-27. Derecha: liberación de ≈ 7 mmol de NO/ g de MOF frente a una corriente de gas húmedo. Carbono, Oxígeno, Oxígeno de moléculas de agua, Centros Metálicos, Nitrógeno.

Por otra parte, experimentos realizados utilizando diferentes redes metalorgánicas, demuestran la importancia de la presencia de centros metálicos insaturados en la capacidad de adsorción NO.¹⁶² Los MOFs MIL-53(Al) y MIL-53(Cr) no tiene centros metálicos insaturados en sus estructuras, y como consecuencia, adsorben poco NO (Figura 1.39). Comparando el comportamiento en la adsorción de NO de los MOFs HKUST-1, la serie CPO-27 y la serie MIL-53, queda demostrado que el diseño de las estructuras porosas es la clave para controlar la adsorción y la tasa de liberación de NO según la aplicación biológica deseada. Por ejemplo, si queremos aplicar estos materiales como agentes antitrombogénicos necesitamos un flujo de NO pequeño, mientras que para efectos antibacterianos necesitamos un flujo mayor.¹⁶³

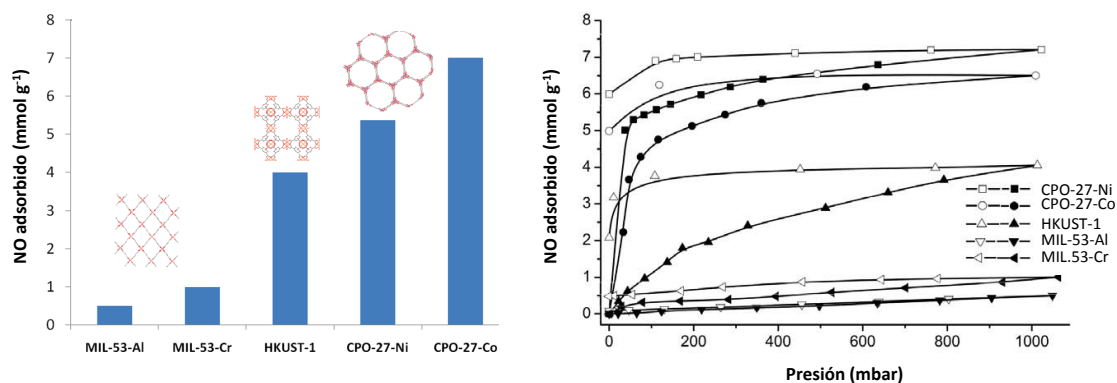


Figura 1.39. Estructuras e isotermas de adsorción de NO a 298 K de varios MOFs: MIL-53 (Al y Cr), HKUST-1 y CPO-27 (Ni y Co). Cuando hay centros de coordinación insaturados en la estructura, la isoterma de adsorción de NO presenta un ciclo de histéresis mayor. Adsorción (símbolos rellenos), desorción (símbolos vacíos).

Otro método utilizado para el almacenamiento y liberación de NO en la estructura de los MOFs es la incorporación de grupos diazeniodiolato liberadores de NO (o NONOatos), mediante modificaciones post-sintéticas. Cohen y sus colaboradores llevaron a cabo una investigación sistemática sobre la funcionalización post-sintética de los sistemas porosos IRMOF-3, $[\text{Zn}_4\text{O}(\text{H}_2\text{N-BDC})_3]$ y UMCM-1- NH_2 , $[\text{Zn}_4\text{O}(\text{BDC-NH}_2)(\text{BTB})_{4/3}]$ ($\text{H}_2\text{N-H}_2\text{BDC}$: ácido 2-amino-1,4-bencenodicarboxílico) (H_3BTB : ácido 4,4',4''-benceno-1,3,5-triil-tribenzoico). La presencia de grupos $-\text{NH}_2$ no coordinantes en los espaciadores orgánicos permitió llevar a cabo la síntesis de grupos NONOatos liberadores de NO, dando lugar a los MOFs IRMOF-3-NONO y UMCM-1-NONO, respectivamente.¹⁶⁴ Es de destacar que la modificación post-sintética no conlleva cambios en la estabilidad o cristalinidad de la estructura. El IRMOF-3-NONO y el UMCM-1-NONO son capaces de liberar 0.51 ± 0.11 y 0.10 ± 0.01 mmol de NO / g MOF, respectivamente. El IRMOF-3-NONO presenta una capacidad de adsorción/liberación de NO intermedia, puesto que libera mucho más NO que el MOF HKUST-1, pero 3.5 veces menos que la serie CPO-27. Asimismo, se ha demostrado que el almacenamiento de NO se produce gracias a la formación de NONOatos, ya que los compuestos no modificados IRMOF-3 y UMCM-1 no son capaces de adsorber/liberar NO en las mismas condiciones. A pesar de los buenos resultados obtenidos mediante la modificación post-sintética, cuando los materiales IRMOF-3-NONO y UMCM-1-NONO se

almacenan durante 10 días, el 20% del NO se pierde, lo que demuestra que los grupos NONOatos no son muy estables.

Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios acerca de la aplicación de los MOFs en la liberación de NO en el campo de la medicina. Al igual que en la liberación de otro tipo de moléculas bioactivas, la estabilidad de los MOFs debe tenerse en cuenta para su aplicación como liberadores de gases terapéuticos. Para aplicaciones biológicas resultaría interesante obtener MOFs capaces de almacenar y liberar NO durante días e incluso semanas. En este sentido, un estudio reciente muestra como el CPO-27-Co y el CPO-27-Ni son capaces de almacenar NO durante 20 semanas,¹⁶¹ lo que indica que estos materiales son unos candidatos excelentes para el almacenamiento y liberación de NO. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la toxicidad de estos materiales, sobre todo en el caso del CPO-27-Co.

En otro orden de cosas, existen diferentes técnicas de diagnóstico muy poderosas y no invasivas, tales como la imagen por resonancia magnética nuclear (RMN), la imagen óptica y la tomografía computacional, que permiten diferenciar entre tejidos normales y enfermos. Dichas técnicas poseen suficiente resolución espacial, pero tienen una baja sensibilidad. Por ello, son necesarios agentes de contraste que permitan identificar el tejido enfermo con una alta especificidad, especialmente, en tejidos blandos del sistema nervioso central, digestivo, linfático, cardiovascular, en hígado y pulmón. Los agentes de contraste utilizados para las técnicas de diagnóstico mencionadas anteriormente suelen estar basados en iones Mn(II) y Gd(III). Aunque dichos iones garantizan una considerable mejora en el contraste, debido a su toxicidad deben administrarse como quelatos. Los quelatos de Gd(III) proporcionan un aumento de la componente de relajación T_1 o positivo, mientras que los materiales supermagnéticos, como las nanopartículas de óxido de hierro, proporcionan un aumento de la componente de relajación T_2 o negativo. La efectividad de los agentes de contraste se evalúa mediante estudios de relajación (r_1 para un aumento positivo y r_2 para un aumento negativo) siendo los agentes más eficientes los que presentan valores de relajación mayores.¹⁶⁵ La aplicación de nanoMOFs basados en Gd(III) como agentes de contraste fue

ensayada por primera vez por Lin y colaboradores. Los nanoMOFs [Gd(BDC)_{1.5}(H₂O)₂] (BDC = 1,4-benzenodicarboxilato) y [Gd(BTC)(H₂O)₃]·H₂O (BTC = 1,2,4-benzenotricarboxilato) presentan valores de r_1 mucho mayores (35.8 y 13 mM⁻¹ s⁻¹, respectivamente) que el actual agente de contraste utilizado *Omniscan* (4.1 mM⁻¹ s⁻¹).¹⁶⁶ Varios estudios publicados demuestran que los nanoMOFs basados en el ión metálico Gd(III) presentan valores de relajación en RMN extraordinariamente altos.¹⁶⁷ Hay que destacar que, a diferencia de los quelatos de Gd(III) normalmente utilizados, algunos nanoMOFs de Gd(III) pueden actuar como agentes de contraste de tipo T₂. Por otro lado, el valor de relajación de las nanopartículas es inversamente proporcional al tamaño de partícula, así, partículas más pequeñas presentan un mayor tiempo de relajación.

Debido a la toxicidad del ión Gd(III), la utilidad *in vivo* de algunos de estos nanoMOFs es incierta por lo que es necesaria la búsqueda de otros nanoMOFs con aplicación en RMN basados en otros metales menos tóxicos. En este sentido, recientemente, se ha descrito varios nanoMOFs basados en Mn(II) [Mn(BDC)(H₂O)₂] y [Mn₃(BTC)₂((H₂O)₆)] y recubiertos por sílice. A pesar de que estos nanoMOFs presentan un tiempo de relajación modesto, se ha conseguido mejorar la señal introduciendo en sus cavidades iones Mn(II). El aumento de la señal se debe a la liberación de iones Mn(II) adsorbidos previamente en el nanoMOF.¹⁶⁸ Por otro lado, Horcajada y colaboradores demostraron la aplicabilidad en RMN de una serie de nanoMOFs basados en el ion biocompatible Fe(III) (MIL-88A y MIL-100), y de sus versiones recubiertas con una capa de polietilenglicol (PEG) (MIL-88A-PEG y MIL-100-PEG); para los que se obtuvieron valores de relajación r_2 de 56, 73, 95 y 92 mM⁻¹ s⁻¹, respectivamente. Experimentos con ratas tipo *Wistar* confirmaron que, tras la inyección de una suspensión de MIL-88A en hígado y bazo, estos órganos eran visiblemente más oscuros que el control, y que trascurridos 3 meses del tratamiento, las nanopartículas se habían eliminado (Figura 1.40).¹⁵² Por último, se han descrito nanoMOFs capaces de incorporar en sus estructura nanopartículas de óxido de hierro que también tienen aplicación en RMN.¹⁶⁹

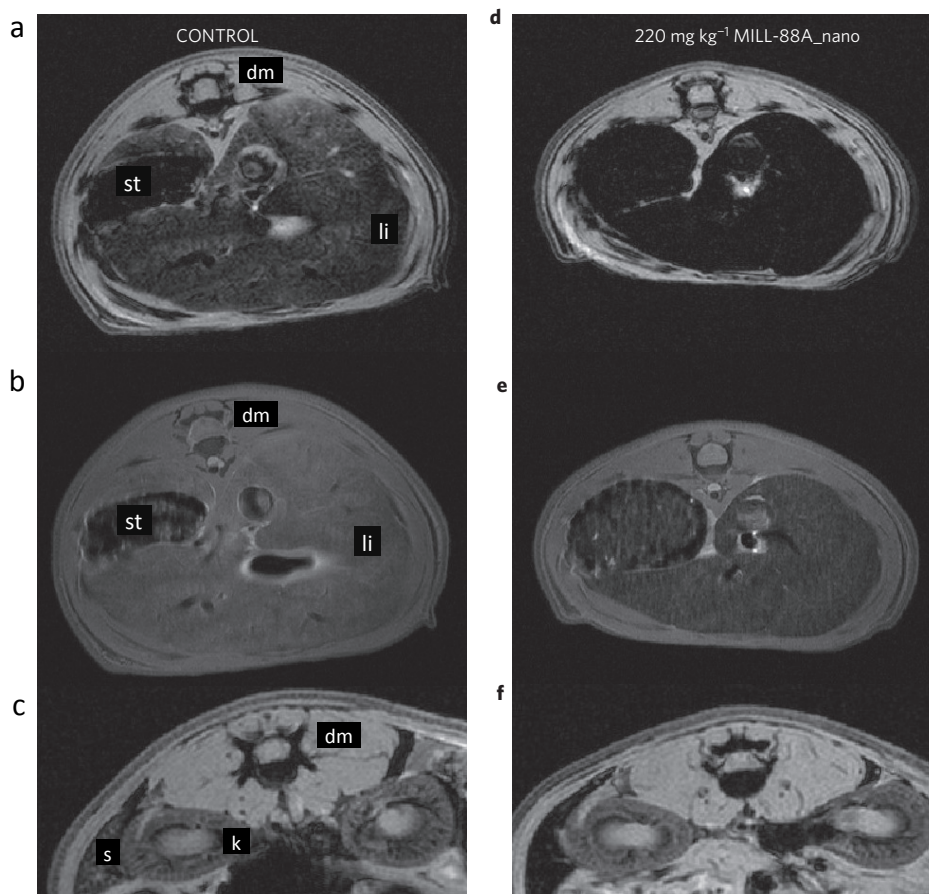


Figura 1.40. Imágenes de RMN tomada con gradiente eco (a, c, d, f) y gradiente espín-eco (b, e). A la izquierda, se muestra el control y a la derecha las imágenes 30 minutos después de inyectar como agente de contraste 200 mg Kg^{-1} de MIL-88A. Se puede observar la diferencia de los órganos tratados hígado y bazo. (dm, músculo dorsal; k, riñón; li, hígado; s, bazo; st, estómago).

Otra aplicación de los MOFs en el campo de la medicina de diagnóstico, es en técnicas de imagen óptica. Estas técnicas se basan en el uso de luz (normalmente visible) para excitar sondas moleculares fluorescentes, diseñadas para el contraste de una gran variedad de procesos biológicos, como la expresión de proteasas (apoptosis o inflamación), angiogénesis o microcalcificaciones óseas, entre otros. Las técnicas de imagen óptica se utilizan en estudios biológicos *in vivo* y *ex vivo*, aunque en estudios *in vivo* están limitadas por la penetración débil de la luz a través de los tejidos.¹⁷⁰ A pesar de que existe una gran variedad de nanoMOFs luminiscentes, todavía no se han evaluado como agentes biológicos de contraste.¹⁷¹ En algunos casos, la luminiscencia no es la idónea puesto que presentan rendimientos cuánticos

bajos. En otros casos, siguiendo la misma estrategia que para la liberación controlada de fármacos, la sonda fluorescente se ha incorporado a la red porosa, ya sea por modificación post-sintética o por encapsulación. La posibilidad que ofrecen los MOFs de combinar bioactividad e imagen, ha dado lugar a la aplicación de estos sistemas en teragnosis. Un ejemplo es el nanoMOF MIL-101_NH₂ que puede modificarse post-sintéticamente gracias a la presencia de grupos -NH₂ en el esqueleto estructural. De hecho, ha sido posible incorporar a la estructura del MIL-101_NH₂ el fármaco anticancerígeno *cis*platino (12.8% en peso) y el fluoróforo BODIPY (5.6 – 11.6% en peso) haciendo reaccionar etoxisuccinato de *cis*platino (ESCP) y bromuro de borodipirrometeno, respectivamente, con los grupos amino del esqueleto estructural con el fin de combinar técnicas de imagen óptica con terapia anticancerígena en este nanoMOF (Figura 1.41). Como resultado de la desactivación fluorescente o *quenching* del Fe(III), el agente fluoróforo se activa al ser liberado. Sin embargo, las nanopartículas han de recubrirse con sílice para aumentar la estabilidad del MOF, y así controlar la liberación del fármaco/fluoróforo adsorbido.¹⁷²

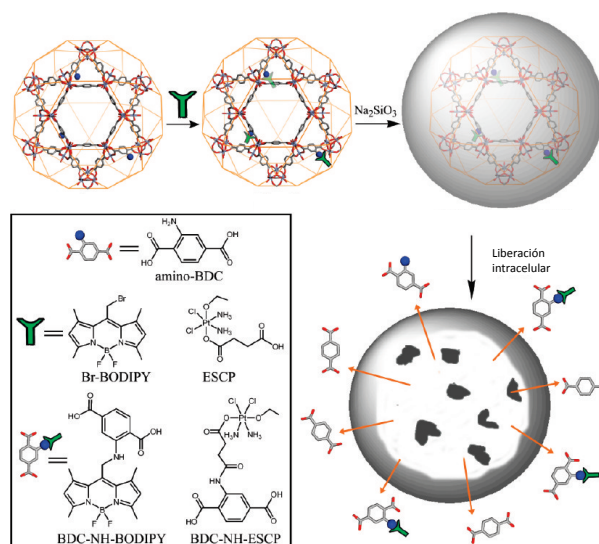


Figura 1.41. Método utilizado para la modificación post-sintética del MOF MIL-101_NH₂, con la incorporación del fármaco anticancerígeno *cis*platino y el grupo fluoróforo BODIPY.

Finalmente, la tomografía computacional es un procedimiento de diagnóstico basado en el uso de rayos X para la obtención de imágenes transversales del cuerpo. En tomografía computacional es necesario el uso de elementos con número atómico (*Z*) elevado, como I, Ba y Bi, que han de

administrarse en dosis elevadas (decenas de gramos) para conseguir un contraste adecuado. Un nanoportador se considera adecuado cuando es capaz de proporcionar un mayor contraste que los elementos libres. Lin y colaboradores han sintetizado varios nanoMOFs basados en el ligando I₄-BDC (2,3,5,6-tetraiodo-1,4-bencenodicarboxilato) unido a iones Cu(II) o Zn(II).¹⁷³ Mediante tomografía computacional, se ha demostrado que estos compuestos presentan una atenuación de rayos X mayor que el agente de contraste comercial *iodixanol*. La mayor atenuación que presentan estos nanoMOFs se debe a la contribución de los centros metálicos presentes en la estructura. Los nanoMOFs se presentan como una alternativa interesante en tomografía computacional como plataforma de otros elementos con elevado número atómico.

Teniendo en cuenta la información expuesta en este apartado, los MOFs ofrecen una gran diversidad de aplicaciones en biología y medicina. La gran variedad de estructuras y composiciones, y la habilidad de portar agentes terapéuticos y de imagen, los hacen buenos candidatos para aplicaciones biológicas. Sin embargo, existen pocos ejemplos de MOFs que combinen una aceptable toxicidad, biodegradación y liberación controlada de moléculas bioactivas. Por lo tanto, existe la necesidad de continuar investigando con mayor profundidad en la obtención de MOFs como sistemas para la liberación controlada de fármacos que presenten una aceptable toxicidad así como una cinética y capacidad de adsorción/liberación de fármaco adecuadas para su aplicación en medicina.

1.4 Nuestra investigación

1.4.1 Química biosupramolecular de asociaciones multinucleares de coordinación

El descubrimiento casual de la actividad antitumoral del *cisplatin* ha sido el origen del desarrollo masivo de nuevos compuestos organometálicos para el tratamiento del cáncer. La unión de complejos metálicos a la molécula de ADN a través de la formación de enlaces metal-ligando (por ejemplo, *cisplatin*, *carboplatin*, etc.) ha sido estudiada en gran medida. Sin embargo, los efectos secundarios derivados del uso de estos metalofármacos convencionales, requiere del desarrollo de nuevos compuestos con un mecanismo de acción diferente.

En este sentido, nuestro grupo de investigación se ha centrado en diseñar, sintetizar y caracterizar nuevos compuestos de coordinación polinucleares cíclicos, capaces de interactuar, de manera no covalente, con el ADN, con el fin de conseguir una interacción más selectiva y secuencial de dichos complejos con la doble hélice.

Las interacciones no covalentes de complejos metálicos con el ADN es un área poco estudiada, que se centró inicialmente en complejos con unidades planas capaces de intercalarse entre las bases de las hebras de ADN. El diseño racional mediante el uso de bloques estructurales precursores de geometría adecuada (fragmentos metálicos y ligandos puente), es la base para la obtención de compuestos de coordinación polinucleares cíclicos, de tamaño y forma adecuada, que permitan dar procesos de reconocimiento molecular en el interior de sus cavidades. Nuestro grupo de investigación se ha centrado en el uso de iones metálicos con posiciones de coordinación protegidas (con el fin de impedir la formación de polímeros) coordinados a ligandos orgánicos con posiciones de coordinación dirigidas, favoreciendo de esta manera la formación de oligómeros cíclicos, que imitan la estructura de los calixarenos orgánicos.

Para lograr un método de síntesis versátil y racional, la elección adecuada de diferentes parámetros de los bloques estructurales precursores es

la base para diseñar, modular y funcionalizar los sistemas deseados. Esto se ha conseguido mediante el uso de iones metálicos con geometrías planocuadradas (Pd(II), Pt(II), etc) y octaédricas (Ru(II)) y ligandos N-heterocíclicos puente, lineales y angulares, con disposición de los vectores de átomos donadores a 90°, 120° y 180° (Figura 1.42)

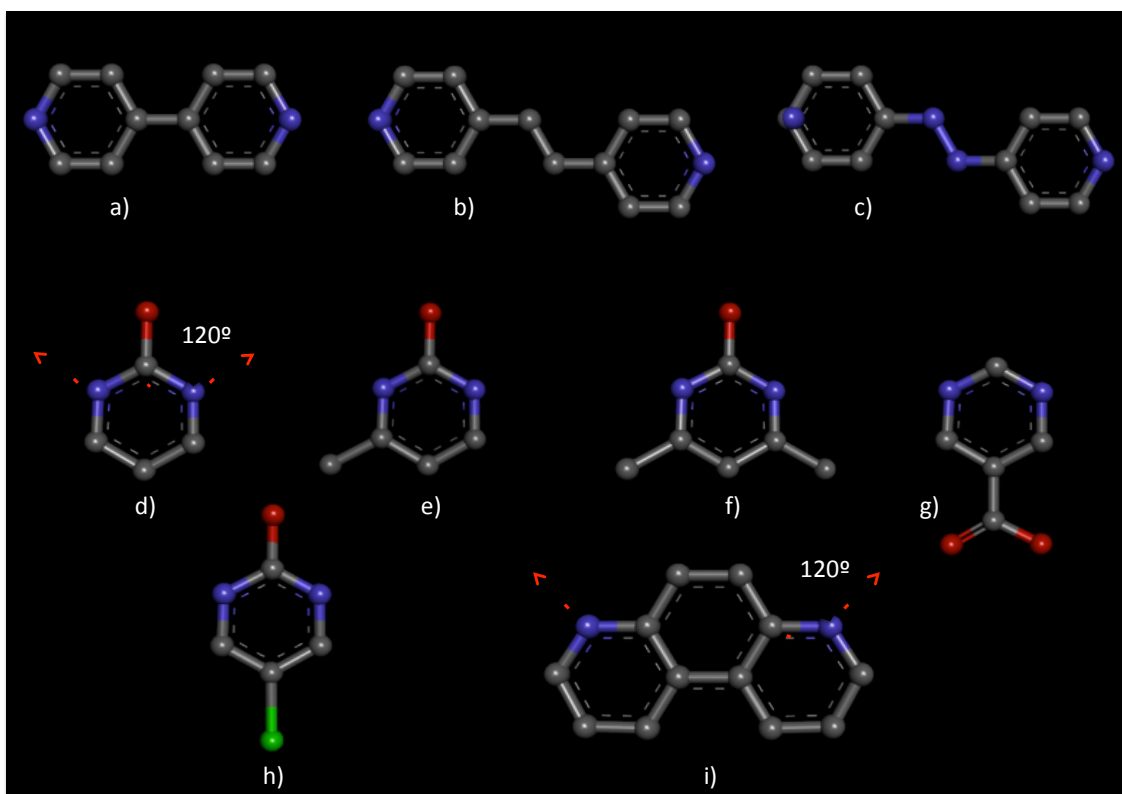


Figura 1.42. Ligandos puente lineales a) 4,4'-bipiridina, b) 4,4'-azopiridina, c) *trans*-1,2-bis(4-piridil)-eteno. Ligandos pirimidínicos angulares d) 2-hidroxipirimidina, e) 4-metil-2-hidroxipirimidina, f) 4,6-dimetil-2-hidroxipirimidina, g) 5-carboxi-pirimidina, h) 5-X-hidroxipirimidina (X = F, Cl, Br y I), i) 4,7-fenantrolina. Carbono, Nitrógeno, Oxígeno, Halógeno.

El uso de estos ligandos para la síntesis de oligómeros cíclicos, permite la síntesis de metalocalix[*n*]arenos de tipo homotópico y heterotópico. Posteriormente, con el fin de obtener nuevas propiedades electroquímicas, nuestro grupo de investigación estudió la funcionalización de estos sistemas utilizando fragmentos de tipo *cis*-[aPd(Cl)₂] (a: ferrocenilmetilbis(2-piridil)amina), y un nuevo ligando pirimidínico, la 5-etinilferroceno-2-hidroxipirimidina.

Las propiedades estructurales de los oligómeros cíclicos juegan un papel fundamental en procesos de reconocimiento molecular. En este sentido, la

carga catiónica de los centros metálicos contribuye a la participación de las interacciones de carácter no covalente frente al ADN aniónico. La interacción de los metalocalix[n]arenos sintetizados por nuestro grupo de investigación con mononucleótidos da lugar a una primera fase de reconocimiento molecular de naturaleza no covalente seguida de una reacción de intercambio de ligandos que conduce a la formación de enlaces de coordinación M-mononucleótidos y diversas reacciones de degradación (Figura 1.43).¹⁷⁴ Los metalocalix[n]arenos sintetizados interactúan con *ct*-ADN (*calf thymus DNA*), demostrando la capacidad de estas especies cíclicas para procesos de reconocimiento molecular. Además, dicha interacción da lugar a importantes e inusuales cambios conformacionales en la estructura del ADN, lo que sugiere una interacción selectiva y secuencial de dichos complejos a la doble hélice.

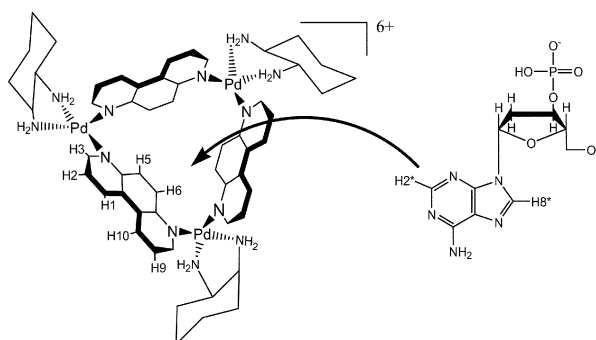


Figura 1.43. Proceso de reconocimiento supramolecular entre el metalocalix[3]areno $[(S,S)\text{-dach})\text{Pd}(\text{phen})_3]^{6+}$ (dach = *S,S*-1,2-diaminociclohexano, phen = 4,7-fenantrolina) y el nucleótido AMP (adenosín monofosfato).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha sintetizado una serie de compuestos de coordinación cíclicos basados en Ru(II) capaces de dar interacciones no covalentes con el ADN, induciendo cambios conformacionales importantes (Figura 1.44). Estas cajas supramoleculares, al contrario que los metalocalix[n]arenos descritos anteriormente, no sufren reacciones de intercambio de ligandos con biomoléculas N-dadoras (nucleobases). Por otro lado, algunos de estos compuestos cíclicos son capaces de reaccionar con biomoléculas S-dadoras (cisteína). Los resultados de citotoxicidad confirman la actividad antiproliferativa de estos compuestos frente a diversas líneas celulares, demostrándose en algunos casos una actividad citotóxica mayor que la del *cis*platino.¹⁷⁵

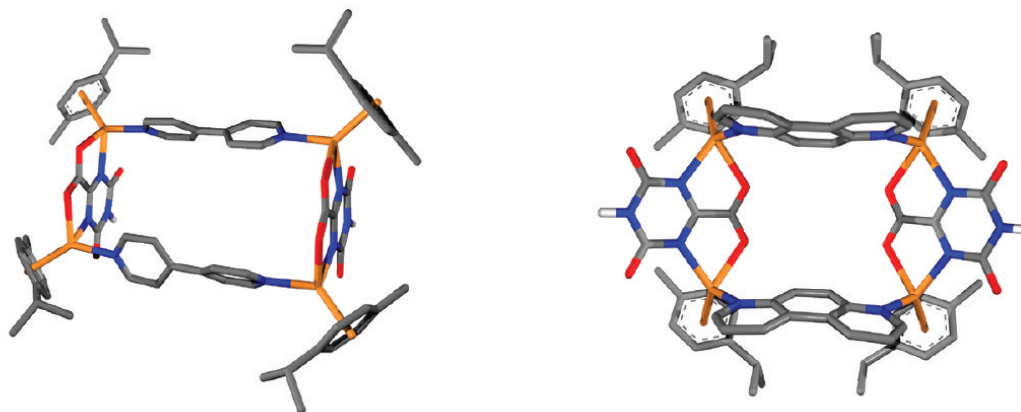


Figura 1.44. Estructura cristalina de los compuestos supramoleculares $[(\text{cimeno})_4\text{Ru}_4(\text{Hoxonato})_2(4,4'\text{-bpy})_2]^{4+}$ (izquierda) y $[(\text{cimeno})_4\text{Ru}_4(\text{Hoxonato})_2(4,7\text{-phen})_2]^{4+}$ (derecha). (H₃oxónico: ácido 4,6-dihidroxi-2-carboxi-1,3,5-triazina), (4,4'-bpy: 4,4'-bipiridina), (4,7-phen: 4,7- fenantrolina). Carbono, Nitrógeno, Oxígeno, Rutenio.

1.4.2 MOFs: aplicaciones en almacenamiento y separación de gases y captura de compuestos orgánicos volátiles.

Un gran número de MOFs publicados hasta la fecha presentan el inconveniente de tener una baja estabilidad térmica, química y mecánica en comparación con los materiales porosos clásicos (zeolitas y carbones activos). La estabilidad del material es una propiedad que se debe tener muy en cuenta la hora de considerar las posibles aplicaciones prácticas de los MOFs. En un intento de racionalizar la estabilidad de los MOFs, Low y colaboradores estudiaron la estabilidad hidrotérmica de algunos de los MOFs descritos en bibliografía (Figura 1.45).¹⁷⁶ La mayor parte de estos MOFs están basados en ligandos de tipo carboxilato que forman enlaces metal-ligando bastante lábiles y, como consecuencia, dan lugar a redes metalorgánicas con una gran sensibilidad a la hidrólisis.¹⁷⁷

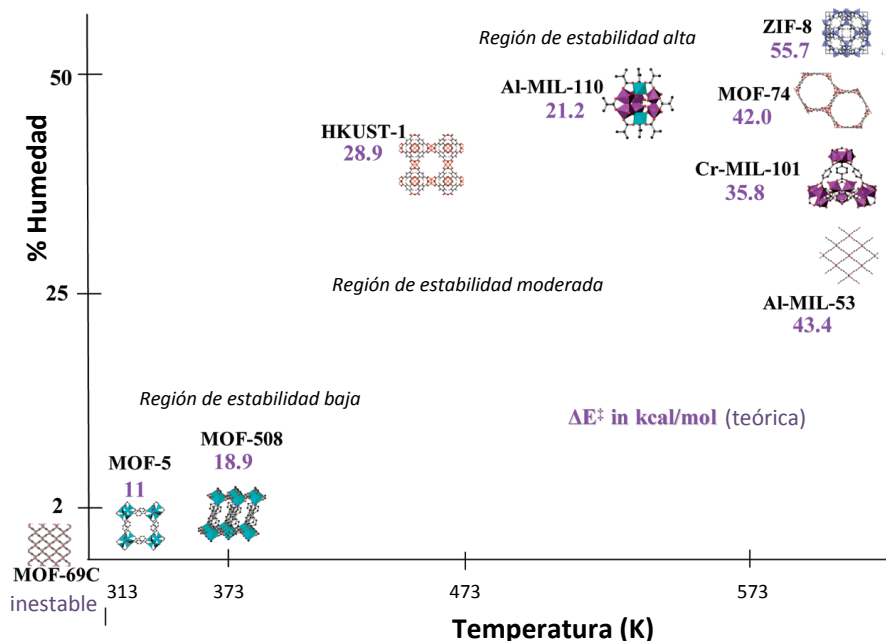


Figura 1.45. Estabilidad hidrotérmica de diferentes MOFs estudiada mediante medidas de DRX.

Con el fin de mejorar la estabilidad química de estos sistemas para su aplicación práctica, en los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en la construcción de MOFs basados en ligandos nitrogenados de tipo pirazol que dan lugar a enlaces de coordinación M-N(pirazolato) mucho más robustos que los enlaces M-O(carboxilato). En este contexto, y en colaboración con otros grupos de investigación, se ha sintetizado una gran variedad de ligandos lineales de tipo pirazol o una combinación de grupos carboxílicos y pirazol (Figura 1.46). La reacción de estos ligandos con metales de la primera serie de transición (Co(II), Ni(II), Cu(II) y Zn(II)) ha conducido a una serie de MOFs muy robustos con aplicaciones en separación de gases, captura de compuestos orgánicos volátiles tóxicos y catálisis.

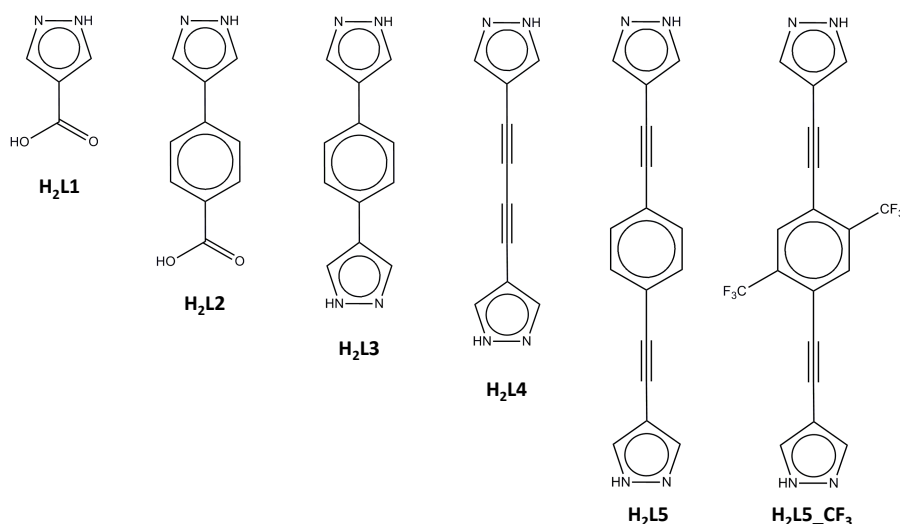


Figura 1.46. Ligandos aniónicos de tipo pirazolato o mixtos carboxilato/pirazolato utilizados por nuestro grupo de investigación para la síntesis de MOFs robustos.

Respecto a la separación de gases y vapores, debe destacarse el comportamiento del sistema $\text{NH}_4[\text{Cu}_3(\mu_3\text{-OH})(\text{L1})_3]$. Este compuesto presenta una red 3D porosa aniónica que, al igual que en las zeolitas, da lugar a procesos de intercambio de cationes que permiten modular sus propiedades adsorbentes. Los sistemas $\text{A}[\text{Cu}_3(\mu_3\text{-OH})(\text{L1})_3]$ ($\text{A} = \text{Na}^+, \text{Li}^+, \text{K}^+$, etc.) son capaces de discriminar mezclas de gases de acetileno/ CO_2 difíciles de separar debido a la similitud entre sus propiedades físicas. Asimismo, se ha demostrado que el sistema adsorbe selectivamente benceno de una mezcla 1:1 benceno:ciclohexano y que dicha selectividad se incrementa tras el intercambio de los cationes NH_4^+ con Li^+ . Finalmente, $\text{NH}_4[\text{Cu}_3(\mu_3\text{-OH})(\text{L1})_3]$ se comporta como un catalizador heterogéneo eficiente en procesos de oxidación.¹⁷⁸

Otra estrategia que puede utilizarse para optimizar la selectividad en el proceso de separación de mezclas de gases utilizando MOFs, consiste en la funcionalización de las cavidades de la matriz porosa introduciendo determinados grupos químicos en los ligandos espaciadores que permitirán interacciones más específicas con ciertas moléculas huésped. Con este objetivo, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo la funcionalización pre-sintética del ligando 4,4'-benceno-1,4-diilbis(1*H*-pirazol) (H_2BDP , $\text{H}_2\text{L3}$) introduciendo grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$ y $-\text{SO}_3\text{H}$ para obtener dos series isorreticulares de MOFs de fórmula general $\text{M}(\text{L3}_\text{X})$ ($\text{M} = \text{Ni}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II}); \text{X} = \text{NO}_2$,

NH₂, OH, SO₃H) (Figura 1.47). Se ha demostrado que la funcionalización de estas matrices porosas con grupos polares mejora la selectividad en el proceso de adsorción (coeficientes de participación) en la resolución de mezclas de gases apolares y polares (ej. N₂/CO₂ o CH₄/CO₂).¹⁷⁹

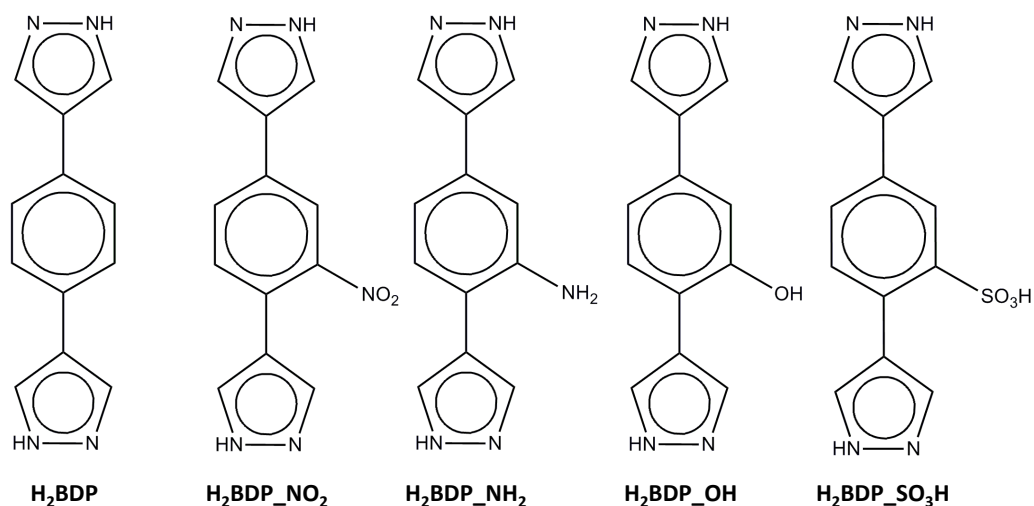


Figura 1.47. Esquema de los ligandos funcionalizados derivados del 1,4-bis(1*H*-pirazol-4-il) benceno (H₂L3): (H₂L3_NO₂), (H₂L3_NH₂), (H₂L3_OH) y (H₂L3_SO₃H).

Por otra parte, en relación a la captura de compuestos orgánicos volátiles, debe destacarse el comportamiento de los materiales hidrofóbicos Ni(L3) y Zn(L3). Estos compuestos muestran una fuerte interacción a temperatura ambiente con benceno y ciclohexano, en condiciones estáticas, así como con tiofeno, en condiciones dinámicas. De hecho, ambos MOFs son capaces de retener hasta 0.34 g de tiofeno/ g de MOF de una corriente de CH₄/CO₂ que contenía 30 ppm de tiofeno. Además, en el caso del Ni(L3), la presencia de un 60% de humedad en la corriente de gases no afecta a su capacidad de capturar este compuesto orgánico volátil.¹⁸⁰

Asimismo, debe destacarse la serie isorreticular [Ni₈(OH)₄(H₂O)₂(L)₆]_n basada en los ligandos espaciadores lineales de longitud creciente anteriormente descritos (Figura 1.47) y el MOF [Zn₄O(4-carboxi-3,5-dimetilpirazol)₆], análogo estructural del MOF-5, [Zn₄O(benceno-1,4-dicarboxilato)₃]. Estos MOFs se caracterizan por poseer porosidad permanente, además de una alta estabilidad térmica, mecánica y química, así como una elevada hidrofobicidad. Gracias a estas características, se ha demostrado que

estos materiales son útiles para la captura de compuestos orgánicos volátiles tóxicos entre los que se incluyen análogos de agentes de guerra química – dietilsulfuro (DES, modelo del gas mostaza) y diisopropilfluorofosfato (DIFP, modelo del gas sarín)- incluso en presencia de humedad extrema (80% de humedad relativa) como es requerido en condiciones operativas reales (Figura 1.48).¹⁸¹

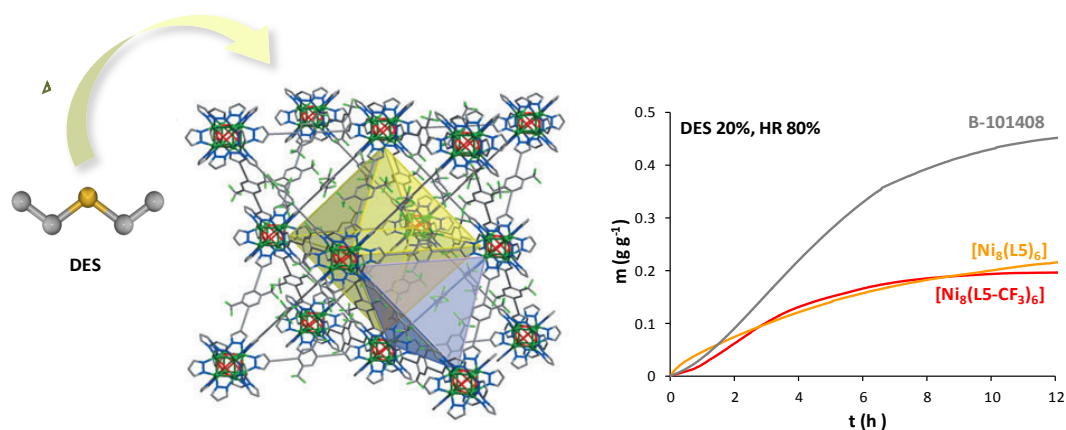


Figura 1.48. Izquierda: representación de la estructura cristalina $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{L5-CF}_3)_6]_n$ y la adsorción de DES. Derecha: gráfica de adsorción de DES en condiciones dinámicas para los MOFs $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{L5})_6]_n$ y $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{L5-CF}_3)_6]_n$, y el carbón activo B-101408 en condiciones del 80% de humedad relativa a 293 K. **Níquel**, **Nitrógeno**, **Carbono**, **Oxígeno**, **Azufre**, **Hidrógeno** (blanco).

Teniendo en cuenta la experiencia previa de nuestro grupo en las dos líneas de investigación descritas anteriormente, en esta Tesis Doctoral, se ha realizado un esfuerzo por aunar ambas líneas y desarrollar materiales porosos híbridos orgánicos-inorgánicos de tipo redes metalorgánicas (MOFs) para su aplicación en la liberación controlada de metalofármacos. Este campo de investigación que se encuentra en la interfase de la ciencia de nanomateriales y la biomedicina es bastante complejo y, como se ha descrito en el apartado 1.3.3, en él trabajan investigadores muy competitivos como el grupo liderado por la Dra. Horcajada y el Dr. Serre del Instituto Lavoisier así como el del Prof. Morris de la Universidad de St. Andrews.^{142b} Sin embargo, es interesante destacar que la mayor parte de los trabajos de investigación publicados en este campo se han centrado en el empleo de estos sistemas para la liberación controlada de fármacos orgánicos tradicionales (ej. ibuprofeno)¹⁴¹ mientras que sólo unos pocos de ellos se han utilizado para la liberación controlada de gases de interés terapéutico (ej. NO)¹⁶¹ o metalofármacos anticancerígenos convencionales (ej. cisplatino).¹⁷² En base a ello, nuestro grupo de investigación ha centrado sus esfuerzos en la posible utilidad de este tipo de materiales porosos en la liberación controlada de metalofármacos no convencionales con actividad antitumoral. En concreto, los metalofármacos estudiados son de tipo “*semi-sandwich*” de rutenio(II) que, como se ha descrito en el apartado 1.2.1, están adquiriendo cierta notoriedad puesto que presentan una menor toxicidad que los metalofármacos de Pt(II) tradicionales debido a la diferente naturaleza del centro metálico que da lugar a otro mecanismo de acción.¹⁸² Sin embargo, la mayor labilidad de estos sistemas de Ru(II) en comparación con los compuestos de Pt(II) hace que los primeros tengan una menor estabilidad en medios biológicos. Por este motivo, la búsqueda de sistemas de encapsulación adecuados que permitan administrar estos metalofármacos no convencionales en la diana deseada es de un enorme interés actual.^{33a}

1.5 Objetivos

Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de la síntesis y caracterización de redes metalorgánicas (MOFs) y su aplicación en la liberación controlada de fármacos no convencionales.

Los objetivos concretos que se pretende alcanzar son los siguientes:

1. Síntesis y caracterización de la nueva red metalorgánica altamente robusta e hidrofóbica $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil})\text{bispirazolato})_6]$ como prueba de concepto de la potencial aplicación práctica de los MOFs como cápsulas de metalofármacos antitumorales de Ru(II) no convencionales. En este contexto, se evaluará la aplicación de este MOF en la adsorción y liberación en condiciones fisiológicas simuladas de $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (RAPTA-C, pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano).

2. Estudio del MOF Ni-CPO-27, $[\text{Ni}_2(\text{dhBDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (H_4dhBDC : ácido 2,5-dihidroxitereftálico), con centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas, para el desarrollo de terapias combinadas avanzadas en las que se empleen drogas con un potencial efecto terapéutico sinérgico. Para ello, se aplicará este MOF en la adsorción y liberación simultánea, en condiciones biológicas simuladas, de varios agentes terapéuticos anticancerígenos no convencionales: NO y RAPTA-C.

3. Estudio del nanoMOF biocompatible MIL-100(Fe) $[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{btc})_2]$ (btc = benceno-1,3,5-tricarboxilato), como vehículo de metalofármacos antitumorales de Ru(II) no convencionales. Para ello, se seguirán dos estrategias de incorporación:

i) La metodología clásica de incorporación de RAPTA-C mediante la impregnación del nano MIL-100(Fe) en una disolución de este metalofármaco. Posteriormente, también se evaluará la liberación de RAPTA-C en fluido corporal simulado.

ii) La incorporación de la nueva metalodroga sintetizada por nuestro grupo de investigación $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ en las nanopartículas de MIL-100(Fe) mediante la estrategia del “barco en la botella”. El resultado satisfactorio de esta estrategia pone de manifiesto la necesidad del uso de vías de encapsulación de metalodrogas alternativas en el caso de que éstas tengan un tamaño mayor que la apertura de las ventanas de acceso a los poros de la matriz porosa, así como en el caso de metalodrogas con baja afinidad por la matriz porosa (ej. incorporación de metalodrogas hidrofóbicas en redes hidrofílicas). Asimismo, en una etapa posterior se evaluará la liberación de $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ en fluido corporal simulado.

4. Síntesis y caracterización de nanopartículas de la serie de MOFs isorreticular $\text{Zn}(\text{BDP_X})$, ($\text{H}_2\text{BDP} = 1,4\text{-bis}(1\text{H-pirazol-4-il})\text{benceno}$, $\text{X} = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH).

i) En primer lugar, se estudiará la estabilidad coloidal de una dispersión de nanopartículas de $\text{Zn}(\text{BDP_OH})$ en diferentes condiciones biológicas simuladas en presencia de distintas proteínas y sales características de medios intravenosos y orales. Con esta investigación se pretende determinar si las nanopartículas se agregan bajo determinadas condiciones químicas (pH) o en presencia de determinadas moléculas presentes en los medios biológicos (proteínas). Debe destacarse que los fenómenos de agregación de estos nanovehículos pueden provocar cambios en su internalización en las células y en su citotoxicidad lo que afectaría al tratamiento.

ii) Por otra parte, se investigará el efecto de la funcionalización de los ligandos en la capacidad de los MOFs para la incorporación y liberación del fármaco anticancerígeno convencional mitoxantrona y de la metalodroga antitumoral no convencional RAPTAC. La presencia de distintos grupos químicos en las paredes de las cavidades de la matriz porosa puede afectar a la interacción metalofármaco-anfitrión y, por tanto, modificar la capacidad de carga así como las cinéticas de adsorción y liberación del metalofármaco.

1.6 Referencias bibliográficas

- ¹ Bravo-Gómez M. E., Ruiz-Azuara L., *New Approaches in the Treatment of Cancer*, **2010**, 139-172.
- ² (a) Ronconi L., Sadler P. J., *Coordination Chemistry Reviews*, **2007**, *251*, 1633-1648; (b) Kraatz H. B., Metzler-Nolte N., *Concepts and Models in Inorganic Chemistry*, Ed. Wiley-VCH, **2006**.
- ³ Komeda S., Casini A., *Current topics in Medical Chemistry*, **2012**, *12*, 1-15.
- ⁴ Süß-Fink G., *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 1673–1688.
- ⁵ Farrell N., *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, **1989**, *11*, 809-840.
- ⁶ (a) Fricker S. P., *Dalton Trans.*, **2007**, 4903; (b) Cancer Research UK.
- ⁷ Berg J. W., *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **1967**, *38*, 741-752.
- ⁸ Lippard B., *Cisplatin*, Ed. Wiley-VCH, Zurich, **1999**.
- ⁹ Kaluderović G. N., Gómez-Ruiz S., Maksimović-Ivanić D., Paschke R., Mijatović S., *Metals in medicine*, **2002**, Wiley-VCH.
- ¹⁰ (a) Rosenberg L., VanCamp J. E., Trosko V. H., Mansour V. H., *Nature*, **1969**, *222*, 385; (b) Rosenberg B., VanCamp L., Krigas T., *Nature*, **1965**, *205*, 698.
- ¹¹ (a) Dyson P. J., Sava G., *Dalton Trans.*, **2006**, 1929-1933; (b) Amin A., Buratovich M. A., *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, **2009**, *9*, 1489-1503.
- ¹² Harrap K. R., *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 2761.
- ¹³ Kostova I., *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **2006**, *1*, 1-22.
- ¹⁴ Jamieson E. R., Lippard S. J., *Chemical reviews*, **1999**, *99*, 2467-2498.
- ¹⁵ (a) Ohndorf U. M., Rould M. A., He Q., Pabo C. O., Lippard S. J., *Nature*, **1999**, *399*, 708; (b) Jamieson E. R., Lippard S. J., *Chemical reviews*, **1999**, *99*, 2467-2498.
- ¹⁶ (a) Todd R. C., Lippard S. J., *Metallomics*, **2009**, *1*, 280-292; (b) Hannon M. J., *Pure Appl. Chem.*, **2007**, *79*, 2243–2261.
- ¹⁷ Vock C. A., Ang W. H., Scolaro C., Phillips A. D., Lagopoulos L., Juillerat-Jeanneret L., Sava G., Scopelliti R., Dyson P. J., *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2166-2175.
- ¹⁸ Guo Z., Sandler P. J., *Advances in Inorganic Chemistry*, **2000**, *9*, 183-306.
- ¹⁹ (a) Farrell N., Ha T. T. B., Souchard J. P., Wimmer F. L., Cros S., Johnson N. P., *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 2240; (b) Farrell N., Qu Y., *Inorg. Chem.*, **1989**, 3416-1420.
- ²⁰ Montero E. I., Diaz S., González-Vadillo A. M., Perez J. M., Alonso C., Navarro-Ranninger C., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4264.
- ²¹ Coluccia M., Nassi A., Loseto F., Boccarelli A., Mariggio M. A., Giordano D., Intini F. P., Caputo P. A., Natile G., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 510.
- ²² Aris S. M., Farrell N. P., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *10*, 1293-1302.
- ²³ Heringova P., Woods J., Mackay F. S., Kasparkova J., Sadler P. J., Brabec V., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7792-7798.
- ²⁴ Wong E., Giandomenico C. M., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2451-2466.
- ²⁵ Farrell N., Qu Y., *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 3416-3420.
- ²⁶ a) Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. B., Hartinger C. G., Keppler B. K., *Dalton Trans.*, 2008, 183-184; b) Brabec V., Nováková O., *Drug Resistance Updates*, **2009**, *9*, 111-122.
- ²⁷ (a) Clarke M. J., Zhu F., Frasca D. R., *Chem. Rev.*, **1999**, 2511-2533; (b) Gianferrara T., Bratsos I., Alessio E., *Dalton Trans.*, **2009**, 7588-7598; (c) Amouri H., Moussa J., Renfrew A. K., Dyson P. J., Rager M. N., Chamoreau L. M., *Angew. Chem.*, **2010**, *122*, 7692-7695; (d) Giraldi T., Sava G., Bertoli G., *Cancer Research*, **1977**, *37*, 2662-2666; (e) Durig J. R., Danneman J., Behnke W. D., Mercer E. E., *Chem. Biol. Interactions*, **1976**, *13*, 287-294; (f) Meng X., Leyva M. L., Jenny M., *Cancer Res.*, **2009**, *69*, 5458.
- ²⁸ Pongratz M., Schluga P., Jakupec M. A., Arion V. B., Hartinger C. G., Allmaier G., Keppler B. K., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, *19*, 46-51.

- ²⁹ Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. B., Hartinger C. G., Keppler B. K., *Dalton Trans.*, **2008**, 183-194.
- ³⁰ Allardyce C. S., Dyson P. J., *Platinum Metals Rev.*, **2001**, *45*, 62-69.
- ³¹ Clarke M. J., *Coordination Chemistry Reviews*, **2003**, *236*, 209-233.
- ³² Antonarakis E. S., Emadi A., *Cancer Chemother Pharmacol.*, **2010**, *66*, 1-9.
- ³³ (a) Barry N. P. E., Sadler P. J., *ACS Nano*, **2013**, *7*, 5654-5659; (b) Süss-Fink G., *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 1673-1688.
- ³⁴ (a) Frasca D., Diampa J., Emerson J., Umans R. S., Clarke M. J., *Metal-Based Drugs*, **1996**, *3*, 197-209; (b) Clarke M. J., Buchbinder M., *Inorganica Chimica Acta*, **1978**, *27*, 87-88.
- ³⁵ (a) Casini A., Edefe F., Erlandsson M., Gonsalvi L., Ciancetta A., Re N., Ienco A., Messori L., Peruzzini M., Dyson P. J., *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 5556; (b) Amouri H., Moussa J., Renfrew A. K., Dyson P. J., Ranger M. N., Chamoreau L. -M., *Angew Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7530.
- ³⁶ (a) Fletcher J. M., Greenfield B. F., Hardy C. J., Scargill D., Woodhead J. L., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2000; (b) Sava G., Bergamo A., *International Journal of Oncology*, **2000**, *17*, 353.
- ³⁷ Hartinger C. G., Zorbas-Seifried S., Jakupec M. A., Kynast B., Zorbas H., Keppler B. K., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2006**, *100*, 891-904.
- ³⁸ Clarke M. J., Zhu F., Frasca D. R., *Chem Rev.*, **1999**, *99*, 2511-2533.
- ³⁹ Schluga P., Hartinger C. G., Egger A., Reisner E., Galansky M., Jakupec M. A., Keppler B. K., *Dalton Trans.*, **2006**, 1796-1802.
- ⁴⁰ Hartinger C. G., Jakupec M. A., Zorbas-Seifried S., Groessi M., Egger A., Berger W., Zorbas H., Dyson P. J., Keppler B. K., *Chemistry and Biodiversity*, **2008**, *5*, 2140-2155.
- ⁴¹ (a) Antonarakis E. S., Emadi A., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2010**, *66*, 1-9; (b) Bergamo A., Masi A., Jakupec M. A., Keppler B. K., Sava G., *Metal-Based Drugs*, **2009**, 1-9; (c) Frasca D., Ciampa J., Emerson J., Umans R. S., Clarke M. J., *Metal-Based Drugs*, **1996**, *3*, 197-209.
- ⁴² (a) Bergers G., Benjamin L. E., *Nature Reviews*, **2003**, *3*, 401; (b) Carmeliet P., Jain R. K., *Nature*, **2000**, *407*, 249.
- ⁴³ <http://www.clinicaloptions.com>.
- ⁴⁴ Alessio E., Mestroni G., Nardin G., Attia W. M., Calligaris M., Sava G., Zorzet S., *Inorganic Chemistry*, **1988**, *27*, 4099-4106.
- ⁴⁵ Bratsos I., Jedner S., Gianferrara T., Alessio E., *Chimia*, **2007**, *61*, 692-697.
- ⁴⁶ Bergamo A., Sava G., *Dalton Trans.*, **2007**, 1267-1272.
- ⁴⁷ (a) Velders A. H., Kooijman H., Spek A. L., Haasnoot J. G., Vos de D., Reedijk J., *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 2966-2967; (b) Hotze A. C. G., Bacac M., Velders, A. H., Jansen B. A. J., Kooijman H., Spek A. L., Haasnoot J. G., Reedijk J., *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 1743-1750.
- ⁴⁸ (a) Ronconi L., Sadler P. J., *Coordination Chemistry Reviews*, **2007**, *251*, 1633; (b) Yan Y. K., Melchart M., Habtemariam A., Sadler P. J., *Chem. Commun.*, **2005**, 4764.
- ⁴⁹ (a) Ang W. H., Daldini E., Scolaro C., Scopelliti R., Juillerat-Jeannerat L., Dyson P. J., *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 9006; (b) Vock C. A., Ang W. H., Scolaro C., Phillips A. D., Lagopoulos L., Juillerat-Jeannerat L., Sava G., Scopelliti R., Dyson P. J., *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2166.
- ⁵⁰ Allardyce C. S., Dyson P. J., Ellis D. J., Heath S. L., *Chem. Commun.*, **2001**, 1396.
- ⁵¹ Bergamo A., Masi A., Dyson P. J., Sava G., *International Journal of Oncology*, **2008**, *33*, 1281.
- ⁵² Casini A., Gabbiani C., Sorrentino F., Rigobello M. P., Bindoli A., Geldbach T. J., Marrone A., Re N., Hartinger C. G., Dyson P. J., Messori L., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6773.

- ⁵³ (a) Scolaro C., Hartinger C. G., Allardyce C. S., Keppler B. K., Dyson P. J., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2008**, 1743; (b) Scolaro C., Bergamo A., Brescacin L., Delfino R., Cocchietto M., Laurency G., Geldbach T. J., Sava G., Dyson P. J., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4161.
- ⁵⁴ Scolaro C., Bergamo A., Brescacin L., Delfino R., Cocchietto M., Laurency G., Geldbach T. J., Sava G., Dyson P. J., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4161.
- ⁵⁵ (a) Pizzarro A. M., Habtemariam A., Sadler P. J., *Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes*, **2010**, Ed. Springer-Verlag, 21-56; (b) Ang W. H., De Luca A., Chapis-Bernasconi C., Juillerat-Jeanneret L., Lo Bello M., Dyson P. J., *Chem. Med. Chem.*, **2007**, 1799.
- ⁵⁶ Marques A. R., Kromer L., Gallo D. J., Penacho N., Rodrigues S. S., Seixas J. D., Bernades G. J. L., Reis P. M., Otterbein S. L., Ruggieri R. A., Gonçalves A. S. G., Gonçalves A. M. L., De Matos M. N., Bento I., Otterbein L. E., Blättler W. A., Romão C. C., *Organometallics*, **2012**, *31*, 5810.
- ⁵⁷ Motterlini R., Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B. E., Green C. J., *Circulation Research*, **2002**, 17.
- ⁵⁸ Romão C. C., Blättler W. A., Seixas J. D., Bernades G. J. L., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 3571.
- ⁵⁹ Boczkowski J., Poderoso J. J., Motterlini R., *Trends in Biochemical Sciences*, **2006**, *31*, 614
- ⁶⁰ Mann B. E., *Medicinal Organometallic Chemistry*, Ed. Springer-Verlag, **2001**.
- ⁶¹ Gullotta F., di Masi A., Ascenzi P., *IUBMB Life*, **2012**, *64*, 378.
- ⁶² Pizzarro M. D., Rodriguez J. V., Mamprin M. E., Fuller B. J., Mann B. E., Motterlini R., Guibert E. E., *Cryobiology*, **2009**, *58*, 248.
- ⁶³ Foresti R., Bani-Hani M. G., Motterlini R., *Intensive Care Med.*, **2008**, *34*, 649.
- ⁶⁴ (a) Clark J. E., Naughton P., Shurey S., Green C. J., Johson T. R., Mann B. E., Foresti R., Motterlini R., *Circulation Research*, **2003**, *93*, 2; (b) Alberto R., Motterlini R., *Dalton Trans.*, **2007**, 1651.
- ⁶⁵ Ma M., Noei H., Mienert B., Niesel J., Bill E., Muhler M., Fischer R. A., Wang Y., Schatzschneider U., Metzler-Nolte N., *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 6785-6790.
- ⁶⁶ Mann B. E., Motterlini R., *Chem. Comm.*, **2007**, 4197.
- ⁶⁷ Muntané J., de la Mata M., *World J. Hepatology*, **2010**, *9*, 337.
- ⁶⁸ Choudhari S. K., Chaudhary M., Bagde S., Gadbaill A. R., Joshi V., *World Journal of Surgical Oncology*, **2013**, *11*, 118.
- ⁶⁹ Fumumura D., Kashiwagi S., Jain R. K., *Nature Reviews - Cancer*, **2006**, *6*, 521.
- ⁷⁰ Hirst D., Robson T., *Current Pharmaceutical Design*, **2010**, *16*, 411.
- ⁷¹ Huerta S., Chilka S., Bonavida B., *International Journal of Oncology*, **2008**, *33*, 909.
- ⁷² Wink D. A., Cook J. A., Christodoulou D., Krishna M., Pacelli R., Kim S., DeGraff W., Gamson J., Vodovotz Y., Russo A., Mitchell J. B., *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1997**, *1*, 88.
- ⁷³ Frederiksen L. J., Sullivan R., Maxwell L. R., *Clin Cancer Res.*, **2007**, *13*, 2199.
- ⁷⁴ (a) Jo Y. S., van der Vlies A. J., Gantz J., Thacher T. N., Antonijevic S., Cavadini S., Demurtas D., Stergiopoulos N., Hubbell J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14413-14418; (b) Ostrowski A. D., Lin B. F., Tirrell M. V., Ford P. C., *Mol. Pharmaceutics*, **2012**, *9*, 2950-2955; (c) Rothrock A. R., Donkers R. L., Schoenfisch M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 9362-9363.
- ⁷⁵ (a) Ghosh K., Eroy-Reveles A. A., Avila B., Holman T. R., Olmstead M. M., Mascharak P. K., *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 2988-2997; (b) Heilman B. J., St. John J., Oliver S. R. J., Mascharak P. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 11573.
- ⁷⁶ Kim J., Saravanakumar G., Choi H. W., Park D., Kim W. J., *J. Mater. Chem. B.*, **2014**, *2*, 341.
- ⁷⁷ Van der Meel R., Vehmeijer L. J. C., Kok R. J., Storm G., Van Gaal E. V. B., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, *65*, 1284.
- ⁷⁸ Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Research*, **1986**, *46*, 6387-6392.

- ⁷⁹ Alexis F., Rhee J. -W., Richie J. P., Radovic-Moreno A. F., Langer R., Farokhzad O. C., *Urologic Oncology*, **2008**, 26, 74.
- ⁸⁰ Khan I. U., Serra C. A., Anton N., Vandamme T., *Journal of Controlled Release*, **2013**, 172, 1065-1074.
- ⁸¹ Bae Y. H., Park K., *Journal of Controlled Release*, **2011**, 153, 198.
- ⁸² Hess C., Venetz D., Neri D., *Med. Chem. Commun.*, **2014**, 5, 408.
- ⁸³ Dawar S., Singh N., Kanwar R. K., Kennedy R. L., Veedu R. N., Zhou S., Krishnakumar S., Hazra S., Sasidharan S., Duan W., Kanwar J. R., *Drug Discovery Today*, **2013**, 18, 1292.
- ⁸⁴ Wang F., Wang Y., Zhang X., Zhang W., Guo S., Jin F., *Journal of Controlled Release*, **2014**, 174, 126.
- ⁸⁵ Storr T., Thompson K. H., Orvig C., *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 534.
- ⁸⁶ Barry N. P. E., Sadler P. J., *Chem. Commun*, **2013**, 49, 5106.
- ⁸⁷ Mohanty C., Manasi D., Kanwar J. R., Sahoo S. K., *Current Drug Delivery*, **2011**, 8, 45.
- ⁸⁸ Almeida de A., Oliveira B. L., Correia J. D. G., Soveral G., Casini A., *Coord. Chem. Rev.*, **2013**, 257, 2689.
- ⁸⁹ Hall J. B., Dobrovolskaia M. A., Patri A. K., McNeil S. E., *Nanomedicine*, **2007**, 2, 789-803.
- ⁹⁰ Clavel C. M., Păunescu E., Nowak-Sliwinska P., Dyson P. J., *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 1097.
- ⁹¹ Koo H., Huh M. S., Ryu J. H., Lee D. -E., Sun I. -C., Choi K., Kim K., Kwon I. C., *Nano Today*, **2011**, 6, 204-220.
- ⁹² Bloemink M. J., Diederer J. J. H., Dorenbos J. P., Heetebrij R. J., Keppler B. K., Reedijk J., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, 1655.
- ⁹³ Sakamoto J. H., van de Ven A. L., Godin B., Blanco E., Serda R. E., Grattoni A., Ziemys A., Bouamrani A., Hu T., Ranganathan S. I., De Rosa E., Martinez J. O., Smid C. A., Buchanan R. M., Lee S. -Y., Srinivasan S., Landry M., Meyn A., Tasciotti E., Liu X., Decuzzi P., Ferrari M., *Pharmacological Research*, **2010**, 62, 57.
- ⁹⁴ Hoare T., Santamaria J., Goya G. F., Irusta S., Lin D., Lau S., Padera R., Langer R., Kohane D. S., *Nano Letters*, **2009**, 9, 3651.
- ⁹⁵ (a) Kratochwil N. A., Parkinson J. A., Bednarski P. J., Sadler P. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1460; (b) Ryu J. H., Koo H., Sun I. -C., Yuk S. H., Choi K., Kim K., Kwon I. C., *Advanced Drug Reviews*, **2012**, 64, 1447.
- ⁹⁶ Smith G. S., Therrien B., *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 10793.
- ⁹⁷ (a) Ramogida C. F., Orvig C., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 4720; (b) Alberto R., Schibli R., Waibel R., Abram U., Schubiger A. P., *Coordination Chemistry Reviews*, **1999**, 190, 901
- ⁹⁸ (a) Mura S., Couvreur P., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, 64, 1394; (b) Choi K. Y., Liu G., Lee S., Chen X., *Nanoscale*, **2012**, 4, 330.
- ⁹⁹ Bregman H., Carroll P. J., Meggers E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 877.
- ¹⁰⁰ Bruijninx P. C. A., Sadler P. J., *Current Opinion in Chemical Biology*, **2008**, 12, 197.
- ¹⁰¹ Bregman H., Carroll P. J., Meggers E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 877-884.
- ¹⁰² Vessières A., Top S., Beck W., Hillard E., Jaouen G., *Dalton Trans.*, **2006**, 529.
- ¹⁰³ Torchilin V. P., *Pharmaceutical Research*, **2006**, 24, 1.
- ¹⁰⁴ Vallet-Regí M., Balas F., Arcos D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 7548-7558.
- ¹⁰⁵ Chien Y. W., Lin S., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Third Edition*, **2006**, Informa Healthcare.
- ¹⁰⁶ Sáez V., Hernández E., López L., *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **2003**, 4, 111.
- ¹⁰⁷ Couvreur P., Vauthier C., *Pharmaceutical Research*, **2006**, 23, 1417.
- ¹⁰⁸ Blanco E., Ferrari M., *The Breast*, **2014**, 23, 10-18.
- ¹⁰⁹ Mishra D., Hubenak J. R., Mathur A. B., *Journal of Biomedical Materials Research A*, **2013**, 101, 3647.

- ¹¹⁰ (a) Rahis-Uddin I. A., Salim K., Rather M. A., Haque W., Haque A., *Current Cancer Drug Targets*, **2011**, *11*, 135-146; (b) Alexis F., Rhee J. -W., Richie J. P., Radovic-Moreno A. F., Langer R., Farokhzad O. C., *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, **2008**, *26*, 74-85.
- ¹¹¹ Uhrich K. E., Cannizzaro S. M., Langer R. S., Shakesheff K. M., *Chem. Rev.*, **2009**, *99*, 3181-3198.
- ¹¹² Thakor A. S., Gamhir S. S., *Ca. Cancer J. Clin.*, **2013**, *63*, 395.
- ¹¹³ Van der Poll D. G., Kieler-Ferguson H. M., Floyd W. C., Guillaudeu S. J., Jerger K., Szoka F. C., Fréchet J. M., *Bioconjug. Chem.*, **2010**, *21*, 764-773.
- ¹¹⁴ Hasegawa U., van de Vlies A. J., Simeoni E., Wandrey C., Hubbell J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 18273-18280.
- ¹¹⁵ (a) Oberoi H. S., Nukolova N. V., Kabanov A. V., Bronich T. K., *Advance Drug Delivery Reviews*, **2013**, *65*, 1667-1685; (b) Gu F. X., Karnik R., Wang A. Z., Alexis F., Levy-Nissenbaum E., Hong S., Langer R. S., Farokhzad O. C., *Nanoday*, **2007**, *2*, 14; (c) Khandare J., Calderón M., Dagia N. M., Haag R., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2824-2848; (d) Torchilin V. P. (Ed), *Nanoparticulates as Drug Carriers*, **2006**, Imperial College Press.
- ¹¹⁶ (a) Fatouros D. G., Douroumis D., Nikolakis V., Ntais S., Moschovi A. M., Trivedi V., Khima B., Roldo M., Nazar H., Cox P. A., *J. Mat. Chem.*, **2011**, *21*, 7789; (b) Rivera A., Farías T., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2005**, *80*, 337-346.
- ¹¹⁷ Vallet-Regi M., Rámila A., del Real R. P., Pérez-Pariente J., *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 308-311.
- ¹¹⁸ Vallet-Regi M., *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5934-5943.
- ¹¹⁹ Colilla M., González B., Vallet-Regí M., *Biomater. Sci.*, **2013**, *1*, 114.
- ¹²⁰ (a) Feazell R. P., Nakayama-Ratchford N., Dai H., Lippard S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8438-8439; (b) Zhang X., Meng L., Lu Q., Fei Z., Dyson P. J., *Biomaterials*, **2009**, *30*, 6041-6047.
- ¹²¹ Frandsen J. L., Ghandehari H., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2696-2706.
- ¹²² Nicolas J., Mura S., Brambilla D., Mackiewicz N., Couvreur P., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 1147.
- ¹²³ Van der Meel R., Vehmeijer L. J. C., Kok R. J., Storm G., van Gaal E. V. B., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, *65*, 1284-1298.
- ¹²⁴ Deng J., Yu D., Gao C. Y., *Sci. China Chem.*, **2013**, *56*, 1533-1541.
- ¹²⁵ Lee D. -U., Koo H., Sun I. -C., Ryu J. H., Kim K., Kwon I. C., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2656-2672.
- ¹²⁶ Oberoi H. S., Nukolova N. V., Kabanov A. V., Bronich T. K., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, *65*, 1667-1685.
- ¹²⁷ Karaman D. S., Gulin-Sarfraz T., Hedström G., Duchanoy A., Eklund P., Rosenholm J. M., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2014**, *418*, 300-310.
- ¹²⁸ Loomis K., McNeeley K., Bellamkonda R. V., *Soft Matter.*, **2011**, *7*, 839-856.
- ¹²⁹ Tian H., Lin L., Chen J., Chen X., Park T. G., Maruyama A., *Journal of Controlled Release*, **2011**, *155*, 47-53.
- ¹³⁰ Fukushima T., Horike S., Inubushi Y., Nakagawa K., Kubota Y., Takata M., Kitagawa S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 4820.
- ¹³¹ (a) Rieter W. J., Pott K. M., Taylor M. L., Lin W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 11584; (b) Dan-Hardi M., Serre C., Frot T., Rozes L., Maurin G., Sánchez C., Ferey G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 10857.
- ¹³² (a) Roques N., Mugnaini V., Veciana J., *Topics in Current Chemistry*, **2010**, 293. 207; (b) Allendorf M. D., Bauer C. A., Bhakta R. K., Houk R. J. T., *Chem. Soc.*, **2009**, *38*, 1330.
- ¹³³ (a) Barea E., Turra F., Navarro J. A. R., *Gas separation and purification by MOFs (in Metal-Organic Frameworks: Applications from Catalysis to Gas Storage)*, Farrusseng D. (Ed.), **2011**, Wiley-VCH; (b) Li J. R., Kuppler R. J., Zhou H. C., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1477.

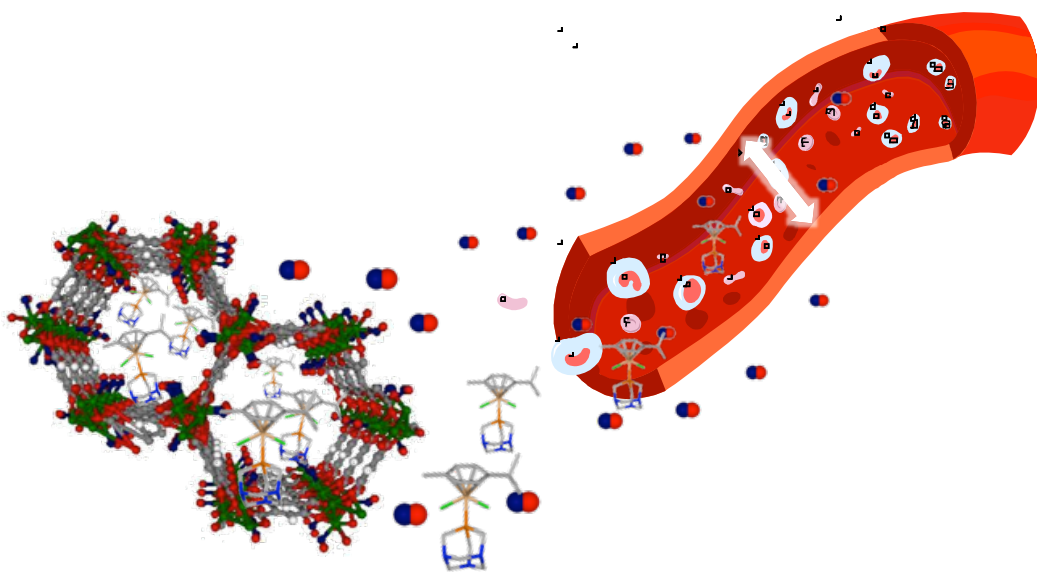
- ¹³⁴ (a) Corma A., García H., Llabrés i Xamena F. X., *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 4606; (b) Ma L., Abney C., Lin W., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1248; (c) Cohen S. M., *Chemical Science*, **2010**, *1*, 32.
- ¹³⁵ (a) Bonhommeau B., Molnàar G., Galet A., Zwick A., Real J. A., MCGargrey J. J., Bousseksou A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4069; (b) Naumov P., Sakurai K., Nukui A., Tanaka M., *Chem. Commun.*, **2007**, 347; (c) Zacher D., Shekhah O., Wöll C., Fishcer R. A., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1418.
- ¹³⁶ (a) Xiao B., Wheatley P. S., Zhao X., Fletcher A. J., Fox S., Rossi A. G., Megson I. L., Bordiga S., Regli L., Thomas K. M., Morris R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1203; (b) McKinlay A. C., Morris R. E., Horcajada P., Férey G., Gref R., Couvreur P., Serre C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 6260-6266.
- ¹³⁷ Hinks N. J., McKinlay C., Xiao B., Wheatley P. S., Morris R. E., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2010**, *129*, 330-334.
- ¹³⁸ Férey G., Mellot-Draznieks C., Serre C., Millange F., Dutour J., Surblé S., Margiolaki I., *Science*, **2005**, *309*, 2040.
- ¹³⁹ Horcajada P., Serre C., Vallet-Regí M., Sebban M., Taulelle F., Férey G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5974-5978.
- ¹⁴⁰ Bauer S., Serre C., Devic T., Horcajada P., Marrot J., Férey G., Stock N., *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 7568.
- ¹⁴¹ Horcajada P., Serre C., Maurin G., Ramsahye N. A., Balas F., Vallet-Regí M., Sebban M., Taulelle F., Férey G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6774-6780.
- ¹⁴² (a) Horcajada P., Ramila A., Gerard F., Vallet-Regí M., *Solid State Sci.*, **2006**, *8*, 1243; (b) Horcajada P., Gref R., Baati T., Allan P. K., Maurin G., Couvreur P., Férey G., Morris R. E., Serre C., *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 1232-1268.
- ¹⁴³ Xie Y., Yu Z., Huang X., Wang Z., Niu L., Teng M., Li J., *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 9399-9405.
- ¹⁴⁴ Anokhina E. V., Go Y. B., Lee Y., Vogt T., Jacobson A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 9957-9962.
- ¹⁴⁵ Ueda E., Yoshikawa Y., Kishimoto N., Tadokoro M., Sakurai H., Kajiwara N., Kojima Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2004**, *77*, 981-986.
- ¹⁴⁶ Radford R. J., Lawrenz M., Nguyen P. C., McCammon J. A., Tezcan F. A., *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 313-315.
- ¹⁴⁷ An J., Geib S. J., Rosi N. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 38-39.
- ¹⁴⁸ Smaldone R. A., Forgan R. S., Furukawa H., Gassensmith J. J., Slawin A. M. Z., Yaghi O. M., Stoddart J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 8630-8634.
- ¹⁴⁹ Dybtsev D. N., Chun H., Yoon S. H., Kim D., Kim K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 32-33.
- ¹⁵⁰ An J., Geib S. J., Rosi N. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8376-8377.
- ¹⁵¹ (a) Maspocho D., Ruiz-Molina D., Veciana J., *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 770-818; (b) Kurmoo M., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1353-1379; (c) Maspocho D., Ruiz-Molina D., Veciana J., *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2713-2723; (d) Allendorf M. D., Bauer C. A., Bhakta R. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 1330-1352.
- ¹⁵² Horcajada P., Chalati T., Serre C., Gillet B., Sebrie C., Baati T., Eubank J. F., Heurtaux D., Clayette P., Kreuz C., Chang J. -S., Hwang Y. K., Marsaud V., Bories P. -N., Cynober L., Gil S., Férey G., Couvreur P., Gref R., *Nature Materials*, **2010**, *9*, 172.
- ¹⁵³ Rieter W. J., Pott K. M., Taylor K. M. L., Lin W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 11584-11585.
- ¹⁵⁴ Gorbet M. B., Sefton M. V., *Biomateriales*, **2004**, *25*, 5681-5703.
- ¹⁵⁵ DeRosa F., Kibbe M. R., Najjar S. F., Citro M. L., Keefer L. K., Hrabie J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 3786-3787.
- ¹⁵⁶ Zhang H. P., Annich G. M., Miskulin J., Stankiewicz K., Osterholzer K., Merz S. I., Bartlett R. H., Meyerhoff M. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5015-5024.

- ¹⁵⁷ (a) Shin J. H., Schoenfish M. H., *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 239-249; (b) Wheatley P. S., Butler A. R., Crane M. S., Fox S., Xiao B., Rossi A. G., Megson I. L., Morris R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 502-509.
- ¹⁵⁸ Kroncke K. -D., Suschek C. V., *J. Invest. Dermatol.*, **2008**, *128*, 258-260.
- ¹⁵⁹ Keskin S., Kizilel S., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2011**, *50*, 1799-1812.
- ¹⁶⁰ Xiao B., Wheatley P. S., Zhao X., Fletcher A. J., Fox S., Rossi A. G., Megson L., Bordiga S., Regli L., Thomas K. M., Morris R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1203-1209.
- ¹⁶¹ McKinlay A. C., Xiao B., Wragg D. S., Wheatley P. S., Megson I. L., Morris R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10440-10444.
- ¹⁶² Hinks N. J., McKinlay A. C., Xiao B., Wheatley P. S., Morris R. E., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2010**, *129*, 330-334.
- ¹⁶³ Seabra A. B., Duran N., *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 1624.
- ¹⁶⁴ Nguyen J. G., Tanabe K. K., Cohen S. M., *Cryst. Eng. Comm.*, **2010**, *12*, 2335-2338.
- ¹⁶⁵ Della Rocca J., Liu D., Lin W., *Accounts of Chemical Research*, **2011**, *44*, 957-968.
- ¹⁶⁶ Rieter W. J., Taylor K. M. L., An H., Lin W., Lin W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 9024-9025.
- ¹⁶⁷ (a) Taylor K. M. L., Jin A., Lin W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 7722-7725; (b) Nishiyabu R., Hashimoto N., Cho T., Watanabe K., Yasunaga T., Endo A., Kaneko K., Niidome T., Murata M., Adachi C., Katayama Y., Hashizume M., Kimizuka N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2151-2158; (c) Rowe M. D., Chang C. -C., Thamm D. H., Kraft S. L., Harmon J. F., Vogt A. P., Sumerlin B. S., Boyes S. G., *Langmuir*, **2009**, *25*, 9487-9499.
- ¹⁶⁸ Taylor K. M. L., Rieter W. J., Lin W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14358-14359.
- ¹⁶⁹ (a) Imaz I., Hernando J., Ruiz-Molina D., Maspocho D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2325-2329; (b) Kim S. B., Cai C., Sun S., Sweigart D. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2907-2910.
- ¹⁷⁰ Weesels J. T., Yamauchi K., Hoffman R. M., Wouters F. S., *Cytometry Part A*, **2010**, *77A*, 667-676.
- ¹⁷¹ (a) Aime C., Nishiyahu R., Gondo R., Kimizuka N., *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 3604-3607; (b) Kerbellec N., Catala L., Daiguebonne C., Gloter A., Stephan O., Bunzli J. C., Guillou O., Mallah T., *New J. Chem.*, **2008**, *32*, 584-587; (c) Lee H., Cho W., Oh M., *Cryst. Eng. Comm.*, **2010**, *12*, 3959-3963; (d) Zhang X. J., Ballen M. A., Ahren M., Suska A., Bergman P., Uvdal K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10391-10397.
- ¹⁷² Taylor-Pashow K. M. L., Della Rocca J., Xie Z., Tran S., Lin W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14261-14263.
- ¹⁷³ deKrafft K. E., Xie Z., Cao G., Tran S., Ma L., Zhou O. Z., Lin W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 9901-9904.
- ¹⁷⁴ Galindo M. A., Navarro J. A. R., Romero M. A., Quirós M., *Dalton Trans.*, **2004**, 1563-1566.
- ¹⁷⁵ (a) Linares F., Galindo M. A., Galli S., Romero M. A., Navarro J. A. R., Barea E., *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 7413-7420; (b) Linares F., Quartapelle-Procopio E., Galindo M. A., Romero M. A., Navarro J. A. R., Barea E., *Cryst. Eng. Comm.*, **2010**, *2*, 2343-2346.
- ¹⁷⁶ Low J. J., Benin A. I., Jakubczak P., Abrahamian J. F., Faheem S. A., Willis R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15834-15842.
- ¹⁷⁷ (a) Chae H. K., Siberio-Pérez D. Y., Kim J., Go Y. B., Eddaoudi M., Matzger A. J., O'Keeffe M., Yaghi O. M., *Nature*, **2004**, *427*, 523; (b) Eddaoudi M., Kim J., Rosi N., Vodak D., Wachter J., O'Keeffe M., Yaghi O. M., *Science*, **2002**, *295*, 469; (c) Yaghi O. M., Eddaoudi M., Li H., Kim J., Rosi N., (The Regents of the University of Michigan, USA). Application: WO, 2002.
- ¹⁷⁸ Quartapelle Procopio E., Linares F., Montoro C., Colombo V., Maspero A., Barea E., Navarro J. A. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7308 -7311.

- ¹⁷⁹ Colombo V., Montoro C., Maspero A., Palmisano G., Masciocchi N., Galli S., Barea E., Navarro J. A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 12830–12843.
- ¹⁸⁰ Galli S., Masciocchi N., Colombo V., Maspero A., Palmisano G., López-Garzón F. J., Domingo-García M., Fernández-Morales I., Barea E., Navarro J. A. R., *Chem. Mater.*, **2010**, *22*, 1664–1672.
- ¹⁸¹ (a) Montoro C., Linares F., Quartapelle Procopio E., Senkovska I., Kaskel S., Galli S., Masciocchi N., Barea E., Navarro J. A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 11888–11891; (b) Padial N. M., Quartapelle-Procopio E., Montoro C., López E., Oltra J. E., Colombo V., Maspero A., Masciocchi N., Galli S., Senkovska I., Kaskel S., Barea E., Navarro J. A. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 8290–8294.
- ¹⁸² Aird R. E., Cummings J., Ritchie A. A., Muir M., Morris R. E., Chen H., Sadler P. J., Jodrell D. I., *Br. J. Cancer*, **2002**, *86*, 1652–1657.

Capítulo 2

Redes Metalorgánicas Porosas como agentes portadores y liberadores de moléculas bioactivas



2.1. $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil})\text{bispirazolato})_6]_n$ para la incorporación y liberación de RAPTA-C

Como se ha indicado en la introducción y objetivos de este trabajo de investigación, los metalofármacos no convencionales de rutenio como el $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano), conocido como RAPTA-C, presentan una cinética de intercambio de ligandos rápida por lo que son susceptibles de degradarse en el medio fisiológico de forma previa a su interacción con el objetivo biológico deseado. Debido a esto, es de interés el desarrollo de materiales capaces de actuar como vehículos de estos sistemas.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos hemos planteado sintetizar MOFs robustos y con una porosidad adecuada para incorporar y liberar este tipo de metalodrogas. Con esta finalidad, en esta Tesis Doctoral, se ha utilizado un ligando de tipo pirazolato simétrico 4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato en combinación con *clusters* octanucleares de Ni para dar lugar a la red porosa $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-}4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil})\text{bispirazolato})_6]_n \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 13\text{DMF}$ (**1@H₂O@DMF**) como una primera aproximación al desarrollo de materiales como vehículos de metalodrogas no convencionales. Las razones que han motivado la elección de este ligando para la síntesis de MOFs hidrofóbicos altamente robustos son las siguientes: *i*) la alta simetría del ligando facilita el proceso de autoasociación espontánea, para formar sistemas poliméricos ordenados; *ii*) su naturaleza aniónica elimina la necesidad de contraiones, que compensen la carga del metal y, como consecuencia, facilita la formación de una red porosa; y *iii*) la alta basicidad de los ligandos pirazolato da lugar a enlaces de coordinación M-N robustos.

Discusión y resultados

Con el objetivo de obtener nuevas redes metalorgánicas porosas, se ha sintetizado el nuevo ligando orgánico 1,1'-di-Boc-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazol (**Boc₂L₄**) en colaboración con el grupo del Profesor Enrique Oltra del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada. La

etapa determinante en la síntesis de este ligando es la reacción de homoacoplamiento catalizada por Pd/Cu del precursor protegido con grupos Boc, 4-etinil-pirazol, para obtener como producto el ligando simétrico espaciador deseado **Boc₂L₄** (Figura 2.1). La posterior reacción de este sistema con sales de iones metálicos de la primera serie de transición sólo condujo a una red metalorgánica abierta en el caso de la reacción llevada a cabo con Ni(AcO)₂·4H₂O. Los resultados muestran que es importante mantener la proporción 4:3 Ni(AcO)₂·4H₂O:Boc₂L₄ y que la reacción tenga lugar en una mezcla DMF/H₂O (4:1) con el objeto de obtener la fase cristalina deseada. La suspensión resultante se hizo reaccionar a reflujo durante 7 horas (véase el Anexo A). El uso del ligando protegido con grupos tert-butiloxycarbonilo (Boc) facilita la liberación lenta de ligando en el medio de reacción de formación del MOF, facilitando la formación de sistemas cristalinos. Este resultado se puede justificar atendiendo a la robustez de los enlaces M-N(pirazolato) que aunque facilitan la formación de redes robustas por la misma razón dificultan la formación de fases cristalinas. Las condiciones de reacción mencionadas dieron lugar a la formación de un material verdoso microcristalino con buen rendimiento,

$$[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)}_6]_n \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 13\text{DMF} \text{ (1@H}_2\text{O@DMF)} \text{ (Figura 2.2).}$$

En presencia de otras sales de iones metálicos de la primera serie de transición, se obtuvieron fases densas no porosas, y por tanto, no aptas para su aplicación como agentes liberadores de fármacos.

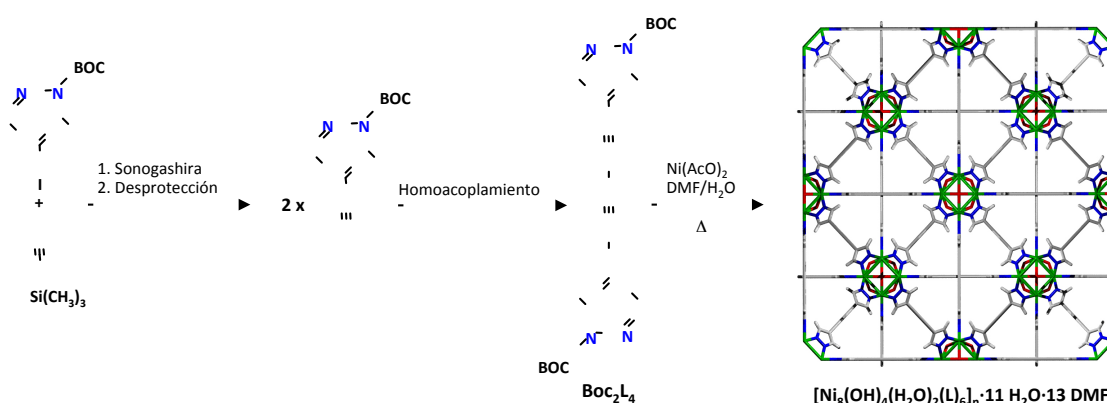


Figura 2.1. Esquema de la síntesis de $[(\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(1,4\text{-bispirazolatobut-1,3-diino})_6)]_n \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 13\text{DMF}$.

Desafortunadamente, debido en parte a la notable fortaleza del enlace Ni-azolato, no ha sido posible la obtención de monocristales para su estudio

mediante difracción de rayos X en monocristal. Sin embargo, la estructura cristalina del compuesto (**1@H₂O@DMF**) se ha resuelto a partir de datos de difracción de rayos X en polvo que han puesto de manifiesto que es estructuralmente similar a los sistemas de tipo $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-L})_6]_n \cdot n\text{Solv}$ (L: pbp o tet) (H₂pbp: 4,4'-bis(1*H*-pirazol-4-il)bifenilo, H₂tet: 2,6-bis(1*H*-pirazol-4-il)pirrol[3,4-*f*]isoindol-1,3,5,7(2*H*,6*H*)-tetrona) sintetizados previamente por el grupo del Profesor Masciocchi.¹ La obtención de un patrón de difracción de gran precisión (rango de 2θ , 277-373 K), ha permitido la determinación de los parámetros de celdilla unidad y la asignación del grupo espacial cristalográfico. Para ello, se han utilizado las herramientas implementadas en el paquete de software TOPAS² que incluye el refinamiento Le Bail del perfil total del patrón de difracción. Por último, la resolución de la estructura se realizó mediante la técnica de *Simulated Annealing* y el refinamiento final se llevó a cabo mediante el método de Rietveld (Figura 2.2). Siguiendo esta metodología de resolución estructural, se han obtenido los siguientes parámetros cristalográficos, $a = 26.49 \text{ \AA}$, $V = 18590(1) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho = 1.00 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu(\text{Cu-K}\alpha) = 14.2$, R_P , R_{WP} y $R_{\text{Bragg}} = 0.016$, 0.022 y 0.010 , respectivamente.

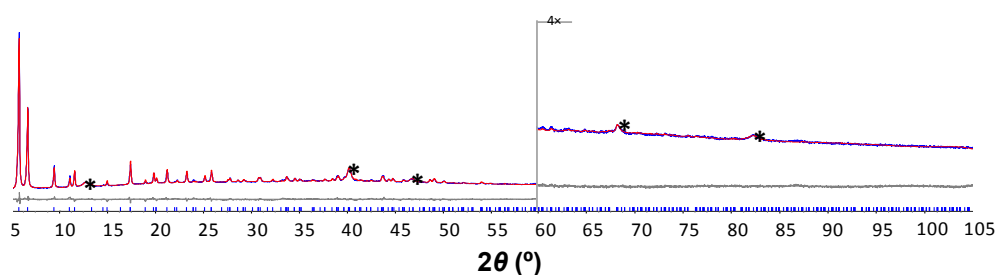


Figura 2.2. Representación del refinamiento de Rietveld para el compuesto **1@H₂O@DMF**. La región de ángulo alto se ha magnificado para su mejor visualización. Valores experimentales (rojo), calculados (azul) y diferencia entre ambos (gris). Los picos marcados con asterisco corresponden con la reflexión del aluminio del portamuestras.

El compuesto **1@H₂O@DMF** cristaliza en el grupo espacial cúbico *Fm-3m* y, está formado por agrupaciones de hidroxocomplejos de Ni(II) octanucleares, conectadas entre sí por ligandos tetradentados $\mu_4\text{-L}$ para dar lugar a agregados de tipo $\text{Ni}_8(\mu_4\text{-X})_6(\mu_4\text{-L})_6$ de simetría cúbica (X: OH⁻ o H₂O). Según la estereoquímica local de los nodos octanucleares, cada ión Ni(II) se encuentra hexacoordinado en un entorno de tipo *fac*-NiN₃O₃ y presenta

distancias de no-enlace intermetálicas de cerca de 3.0 Å. A su vez, los *clusters* cúbicos de tipo $\text{Ni}_8(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2$ se encuentran conectados entre sí por 12 ligandos lineales exotetradentados N,N,N',N' 4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato. Debe destacarse que esta topología presenta un empaquetamiento cúbico compacto (*ccp*) semejante al de muchos elementos metálicos en estado nativo, como el níquel (Figura 2.3). Este tipo de topología da lugar a una red 3D altamente porosa con n huecos octaédricos y $2n$ tetraédricos con un diámetro interno aproximado de 1.6 nm y 1.0 nm, respectivamente (Figura 2.4). El tamaño interno de estas cavidades se ha estimado como dos veces la distancia entre el centro de la cavidad y el átomo más cercano, A. Para la estimación del radio de A se ha aplicado el factor de corrección de Van der Waals. Como consecuencia del gran tamaño de los huecos y la baja demanda estérica de los residuos diino de los ligandos orgánicos, el volumen de poro accesible calculado a partir de la estructura es muy alto, alcanzando el 71% del volumen de todo el cristal. De acuerdo con estas características estructurales, $1@H_2O@DMF$ presenta huecos en su estructura del tamaño adecuado, que son fácilmente accesibles a través de ventanas triangulares, donde pueden tener lugar procesos de reconocimiento molecular. Por otro lado, es interesante resaltar que a pesar de la longitud del ligando, debe destacarse que en el sólido aislado no se observaron fenómenos de interpenetración de redes que limitarían la porosidad del material resultante, como se ha visto en algunos MOFs que contiene dicarboxilatos y que cristalizan en una red cúbica primitiva.³ Por tanto, esta matriz porosa sería un candidato ideal en aplicaciones de incorporación y liberación de metalofármacos como se demostrará posteriormente.

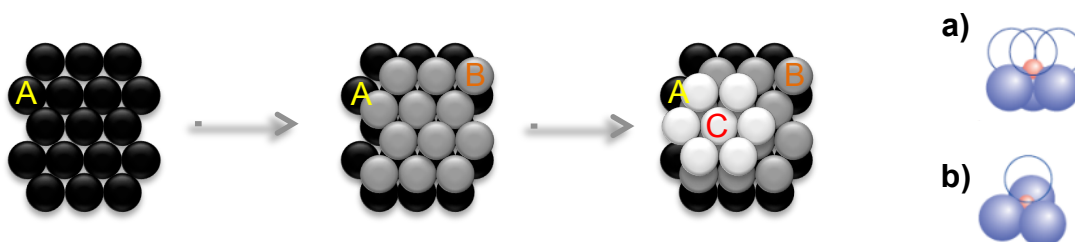


Figura 2.3. Topología del apilamiento de esferas compacto de secuencia ABC (*ccp*) típico de muchos sólidos elementales y que se encuentra en el compuesto $1@H_2O@DMF$. A la derecha se resaltan los huecos intersticiales de tipo (a) octaédrico y (b) tetraédrico característicos de este tipo de empaquetamiento.

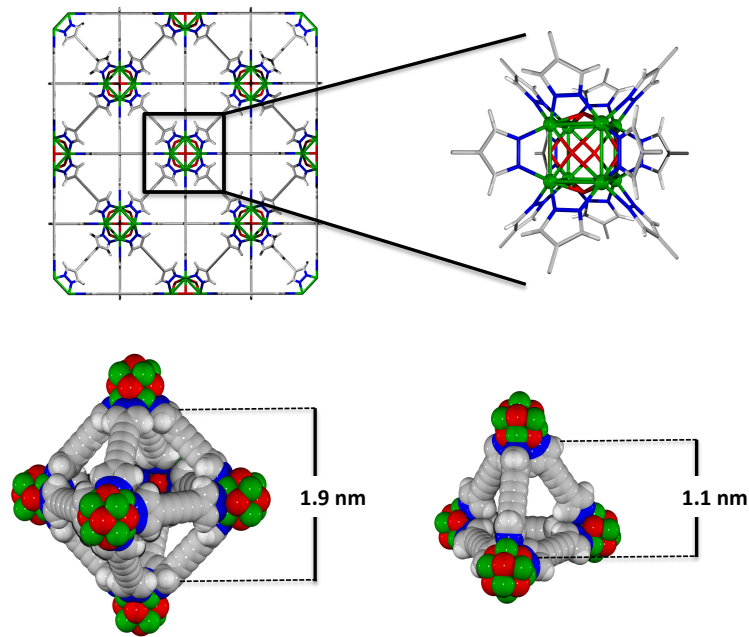
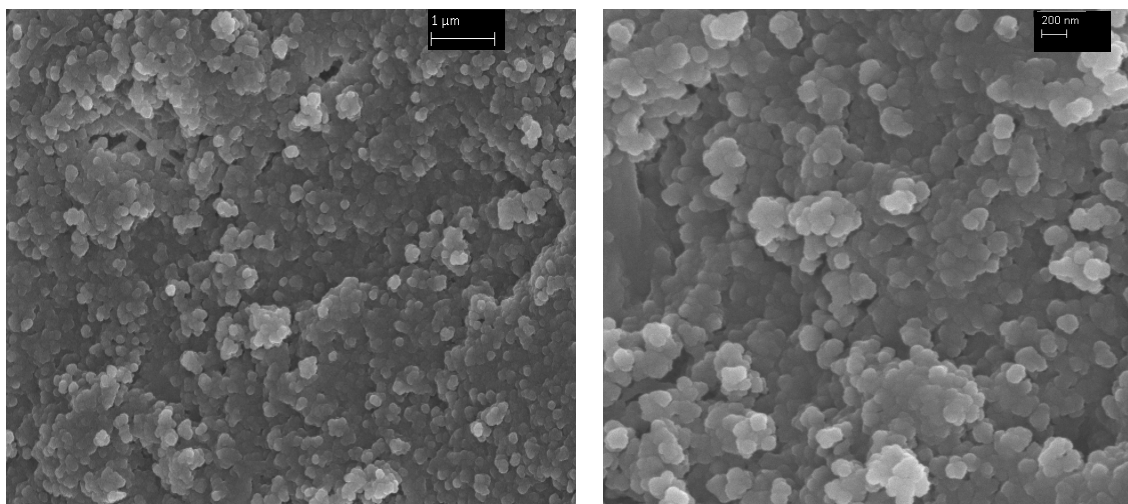


Figura 2.4. Perspectiva de la estructura cristalina del esqueleto $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato})_6]_n$ en la dirección [100]. Arriba: Representación ampliada del *cluster* cúbico $\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2$ con sus 12 ligandos. Abajo: Perspectiva de los huecos octaédricos y tetraédricos presentes en la estructura con un diámetro interior de 1.9 y 1.1 nm, respectivamente. **Níquel**, **Oxígeno**, **Nitrógeno**, **Carbono**, **Hidrógeno** (blanco).

Hay que destacar que, existe un desorden estructural importante en la estructura anteriormente descrita, puesto que las moléculas de disolvente (atrapadas en la red durante la fase de nucleación) se alojan en los huecos de la estructura. Este desorden conlleva la imposibilidad de evaluar la verdadera naturaleza de los ligandos X, que han sido modelizados como una proporción 2:1 de residuos OH^- y H_2O , respetando la neutralidad de carga de forma similar al *cluster* $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2)_{12}]$, descrito por Ovcharenko y colaboradores.⁴

Como se ha mencionado anteriormente, el control del tamaño de partícula en los sistemas de liberación de fármacos es esencial para determinar su modo de administración. En este sentido, hay que destacar que la tasa de eliminación de un fármaco o portador depende de su tamaño. Diversas revisiones bibliográficas afirman que el tamaño “ideal” de partícula para agentes portadores de fármacos para tratamientos contra el cáncer es entre 70 y 200 nm.⁵ De forma general, en sistemas nanométricos las propiedades que

dependen del área superficial de la partícula son mucho más importantes o dominantes debido a la mayor relación área superficial/volumen. Por ejemplo, el contacto entre la superficie de la partícula y el medio externo aumenta en preparaciones nanométricas, y por lo tanto, las cinéticas de adsorción y liberación de fármacos se ven afectadas por el tamaño del portador. De acuerdo con todo lo expuesto, se estudió el tamaño y la morfología del compuesto **1@H₂O@DMF** mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Presión Variable (*Variable Pressure Scanning Electron Microscopy*, VP-SEM). Las figuras que aparecen a continuación muestran dos imágenes representativas del material **1@H₂O@DMF** tomadas en diferentes regiones del portamuestras (Figura 2.5). Estas imágenes muestran como **1@H₂O@DMF** está formando por nanopartículas esféricas aglomeradas. Debe destacarse la homogeneidad en la morfología y el tamaño de las mismas, requisito fundamental para la aplicación biológica de cualquier sistema nanométrico. El tamaño promedio de las nanopartículas de **1@H₂O@DMF** es de 130 ± 30 nm (determinado mediante recuento manual, midiendo un total de 220 nanopartículas).⁶ Según se mencionó anteriormente, este tamaño es óptimo para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos anticancerígenos.



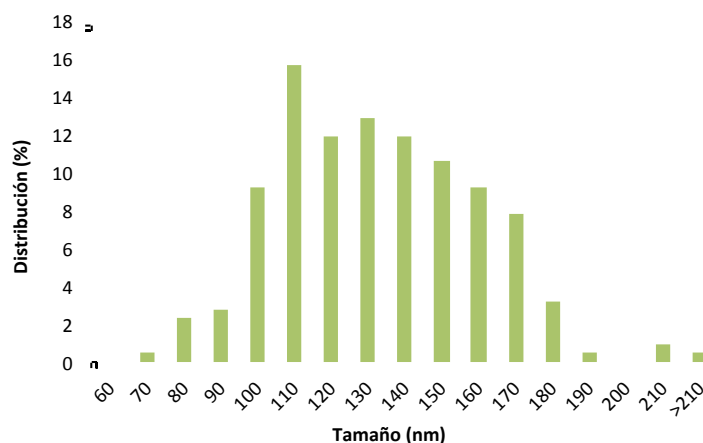


Figura 2.5. Arriba: Imágenes de VP-SEM del compuesto **1@H₂O@DMF**. Abajo: Histograma de distribución de tamaño.

Después de caracterizar estructuralmente el compuesto, se procedió a estudiar sus propiedades térmicas con dos objetivos principales: *i*) establecer a qué temperatura tiene lugar la pérdida de las moléculas de disolvente incluidas en las cavidades, con la finalidad de obtener la fase evacuada con las cavidades vacías disponibles para alojar otras moléculas huésped; *ii*) la temperatura de descomposición del compuesto. Para ello, en primer lugar, se procedió a intercambiar las moléculas de DMF atrapadas en las cavidades de **1@H₂O@DMF** durante la síntesis, por un disolvente mucho más volátil como el diclorometano suspendiendo el material de partida en este disolvente durante 4 horas. Posteriormente, se hizo un análisis termogravimétrico tanto de la especie original, tal y como se obtiene de la síntesis, con moléculas de agua y DMF incluidas en sus cavidades, **1@H₂O@DMF**, como de la especie intercambiada con moléculas de cloruro de metileno ocupando los poros, **1@CH₂Cl₂**. El análisis termogravimétrico de **1@CH₂Cl₂** muestra que, a medida que tiene lugar el calentamiento, **1@CH₂Cl₂** sufre una pérdida de peso progresiva del 25.8%, desde temperatura ambiente hasta 473 K, asociada a la pérdida de las moléculas de CH₂Cl₂ de solvatación incluidas en las cavidades de la matriz porosa. A continuación, a 603 K se observa una pérdida de peso muy pronunciada debida a la descomposición térmica del compuesto. Si se comparan los diagramas termogravimétricos de la especie intercambiada **1@CH₂Cl₂** y de la especie original **1@H₂O@DMF** (Figura 2.6), se observa que la temperatura de activación necesaria para eliminar las moléculas de disolvente incluidas en las cavidades es mucho menor en el caso de **1@CH₂Cl₂**

que en **1@H₂O@DMF** (473 K frente a 613 K). Además, en el caso de **1@H₂O@DMF**, la descomposición térmica tiene lugar justo después del proceso de desolvatación, por lo que se demuestra que el proceso de intercambio de las moléculas de agua y DMF de solvatación por moléculas de CH₂Cl₂ mucho más volátiles es necesario para poder activar apropiadamente la muestra evitando su descomposición.

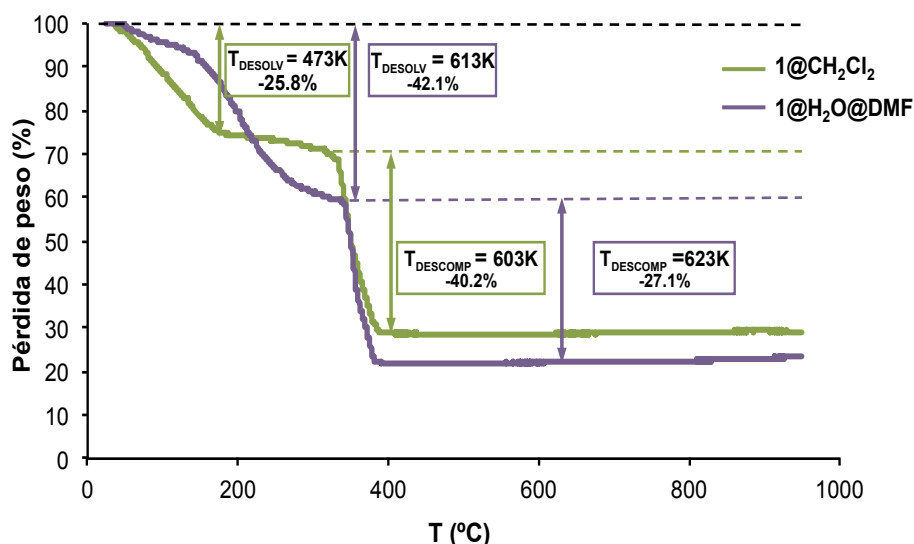


Figura 2.6. Diagramas termogravimétricos de **1@H₂O@DMF** y **1@CH₂Cl₂**.

Por otro lado, también se ha estudiado la estabilidad mecánica de **1@H₂O@DMF**. Para ello, se prepararon pastillas de **1@H₂O@DMF** a las que se le aplicaron presiones de hasta 2 toneladas cm⁻² y, posteriormente, se evaluó si se producía alguna modificación en la cristalinidad y porosidad de la matriz porosa mediante difracción de RX en polvo y medidas de adsorción de N₂ a 77 K, respectivamente (Figura 2.7). De estas investigaciones se dedujo que el compuesto **1@H₂O@DMF** presenta una gran estabilidad frente al estrés mecánico, puesto que tanto su cristalinidad como su porosidad permanecen prácticamente inalteradas después de someterse al proceso descrito anteriormente. Este resultado es interesante puesto que permitiría el modelado de **1@H₂O@DMF** con el fin de elaborar formulaciones en forma de pastillas simplemente compactando el material pulverulento mediante presión sin necesidad de añadir aglutinantes.

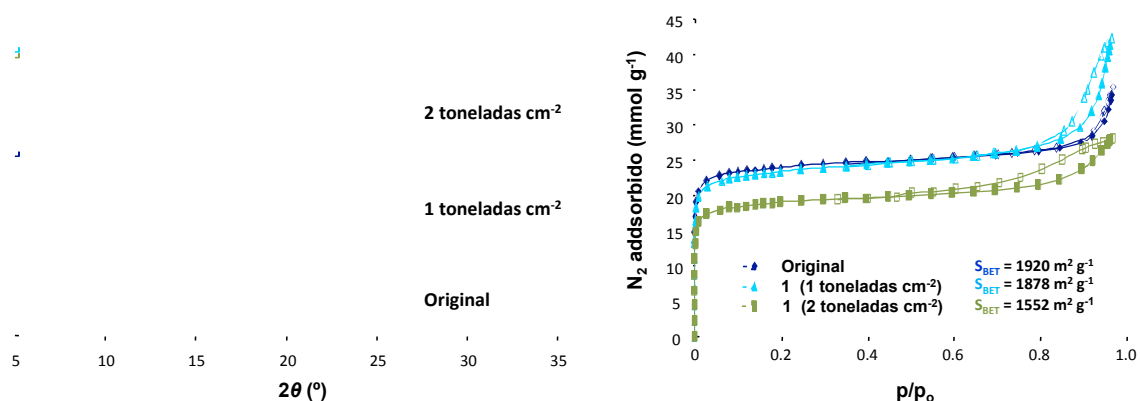


Figura 2.7. Difractogramas de rayos X en polvo e isothermas de adsorción de N_2 a 77 K que ponen de manifiesto la estabilidad mecánica de **1@H₂O@DMF** cuando se somete a presiones de 1 y 2 toneladas cm^{-2} . Las curvas de desorción se representan con símbolos vacíos.

Por otra parte, es importante el estudio de la estabilidad química de **1** con el objetivo de determinar si dicho material permanecerá inalterado al enfrentarse a las condiciones del medio fisiológico durante su aplicación como agente liberador de moléculas activas. Mediante estudios de difracción de rayos X en polvo, se ha demostrado que la red estructural de **1** permanece inalterada después de someterse a reflujo bajo agitación, durante 24 h, en agua y disolventes orgánicos comunes, tales como metanol, ciclohexano, benceno, etc., así como en disoluciones acuosas ligeramente básicas (NaOH, 0.05 M) (Figura 2.8). Asimismo, este compuesto es estable en fluido corporal simulado (FCS) a 310 K durante 7 días. En este caso concreto, las medidas de absorción atómica (AA) de la disolución filtrada después del tratamiento, prueban la estabilidad del material, e indican una baja lixiviación de Ni. De hecho, los niveles de concentración de Ni obtenidos en FCS son de 0.7 ppm lo que equivale a una degradación de **1** del 0.43%. Debe destacarse que este valor está por debajo del límite de Ni tolerado en dosis terapéuticas (1 ppm). Por tanto, esta investigación demuestra la robustez de **1** en medio fisiológico lo que evitaría problemas de toxicidad derivados de la degradación de la matriz.

La combinación de una alta estabilidad mecánica, térmica y química del compuesto **1** es una característica poco habitual para un MOF. Además, Es interesante destacar que, este tipo de red porosa 3D presenta una estabilidad que sólo supera el sistema $[Ni_3(BTP)_2]$ (H_3BTP : 1,3,5-tris(1H-pirazol-4-

il) benceno), que también contiene enlaces Ni-N(pirazolato), descrito por Long y colaboradores.⁷

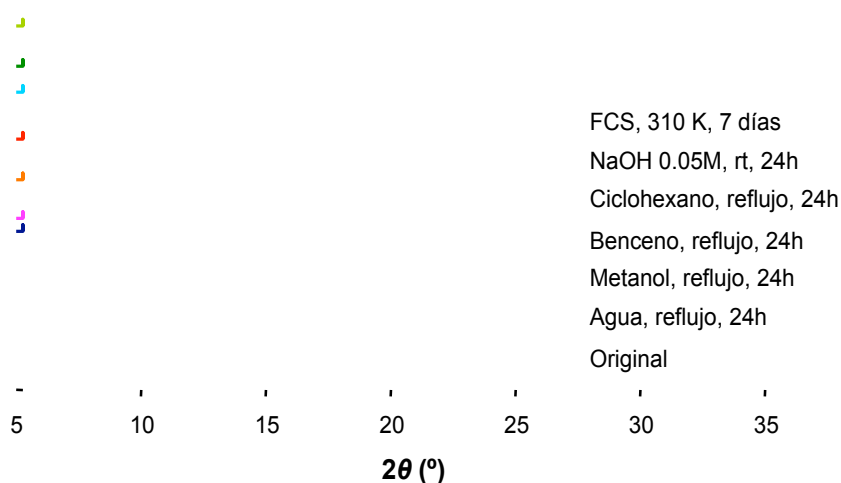


Figura 2.8. Difractogramas de RX en polvo de la especie **1@H₂O@DMF** original (azul) en comparación con los difractogramas obtenidos de esta misma especie después de realizar ensayos de estabilidad química en distintos disolventes y condiciones.

Una vez que se concluyó con la caracterización estructural, mecánica, térmica y química de **1**, se procedió a evaluar la accesibilidad real a dicha red porosa por medio de la molécula sonda N₂ a 77 K. Con estos estudios se pretende determinar si la porosidad de este compuesto es permanente, y si las cavidades presentes en su estructura cristalina son efectivamente accesibles a moléculas huésped. Como se indicó anteriormente, previo a la medida de adsorción, la muestra se intercambia con CH₂Cl₂, de bajo punto de ebullición, con objeto de facilitar la activación térmica del material. Posteriormente, **1@CH₂Cl₂** fue activado a 403 K en vacío dinámico (10⁻⁶ bar) durante 7 h. Las medidas de adsorción de N₂ a 77 K indican que **1** muestra una isoterma de adsorción de tipo I, típica de materiales cristalinos microporosos (Figura 2.9), es decir, materiales con un tamaño de poro inferior a 2 nm, lo que está de acuerdo con el tamaño de las cavidades calculado a partir de los datos cristalográficos. Debe destacarse que **1** posee una estructura altamente porosa con una superficie de BET de 1920 m² g⁻¹ capaz de adsorber 26 mmol g⁻¹ de N₂ a una presión relativa de 0.3, lo que corresponde con un volumen de poro de 0.90 cm³ g⁻¹ (0.57 cm³ cm⁻³). Como se puede observar, el valor del volumen de poro obtenido a partir de los datos de la isoterma de adsorción de N₂ a 77 K es

un poco más bajo que el calculado a partir de los datos de la estructura cristalina ($0.71 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$) lo que indica que hay una pequeña porción de los poros de este material que no es accesible al N_2 . De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se ha demostrado que **1** posee una matriz porosa altamente accesible por lo que se espera que sea adecuada para incorporar otras moléculas huésped de interés de tamaño mediano como, por ejemplo, metalofármacos.

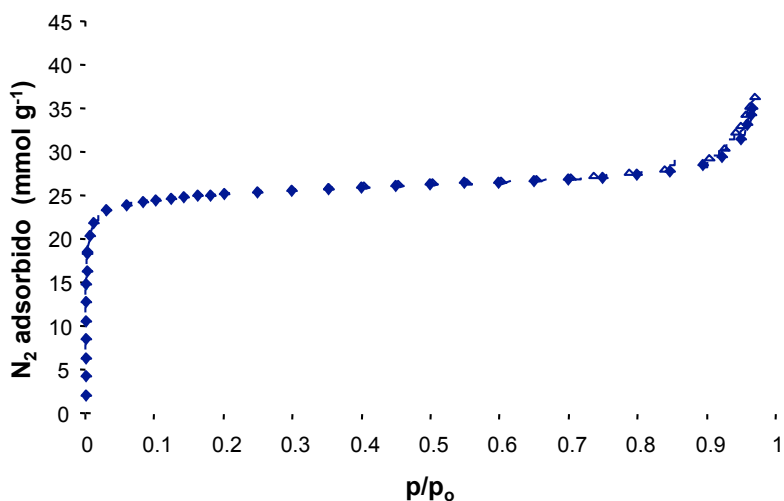


Figura 2.9. Isotherma de adsorción de N_2 (77 K) para el MOF $[\text{Ni}_6(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)}_6)_n$. La desorción se denota con símbolos vacíos.

La gran estabilidad química de **1** en condiciones fisiológicas y sus características porosas (elevado tamaño de poro) hacen pensar en su posible aplicación como sistema de liberación controlada de la metalodroga no convencional $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$, RAPTA-C (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano). De hecho, el RAPTA-C tiene un diámetro estimado de 0.9 nm ,⁸ que permitiría su acceso a las cavidades tetraédricas y octaédricas del MOF a través de las ventanas de los poros (0.9 nm). Por tanto, con el objetivo de evaluar esta aplicación, se realizaron estudios de adsorción/desorción de la metalodroga RAPTA-C en **1** a temperatura controlada. Para ello, en primer lugar, el MOF activado **1** se suspendió con agitación en disoluciones con una concentración de RAPTA-C determinada hasta alcanzar el equilibrio (medida de la isoterma de adsorción sólido-líquido). A continuación, el ritmo y cantidad de fármaco liberado por el sistema de tipo **1@RAPTA-C**, en un disolución de fluido corporal simulado a 310 K se determinó analizando alícuotas de dicha

disolución cada cierto período de tiempo mediante UV-vis. Siguiendo esta metodología, se determinó la capacidad, cinética y reversibilidad del proceso de adsorción-desorción (Figura 2.10).

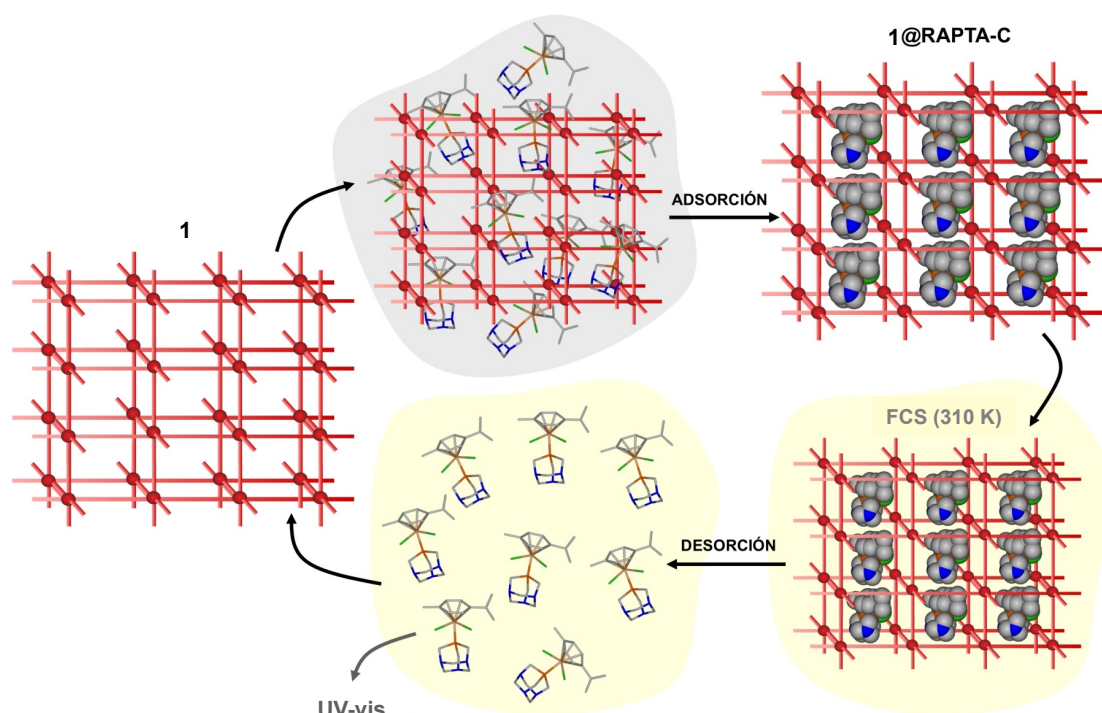


Figura 2.10. Proceso de incorporación y liberación de RAPTA-C en **1**. Durante el proceso de desorción en fluido corporal simulado (FCS), se produce la liberación de la metalodroga al medio fisiológico mientras que el MOF, altamente robusto, permanece inalterado.

En efecto, la impregnación de **1** con una disolución acuosa de RAPTA-C (0.025 M) conlleva una rápida incorporación de esta metalodroga en **1**, alcanzándose el equilibrio a las 4 horas. La incorporación de RAPTA-C en las cavidades de **1** se pone de manifiesto por la drástica disminución de su capacidad de adsorción de N_2 , desde 21.2 mmol g^{-1} del material original, hasta 4.4 mmol g^{-1} tras la carga con RAPTA-C, aunque se mantiene su integridad estructural, tal y como se aprecia en el difractograma de rayos X en polvo medido después de la incorporación de RAPTA-C (Figura 2.11).

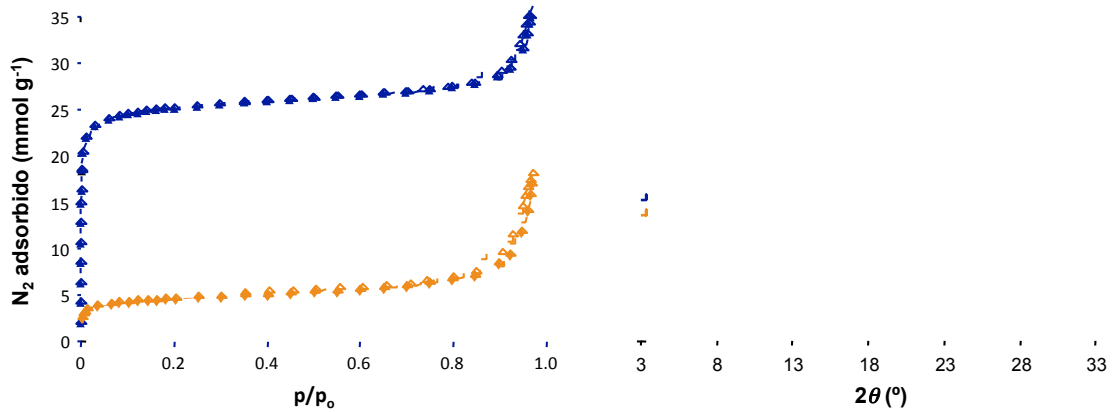


Figura 2.11. Izquierda: isoterma de adsorción de N_2 a 77 K para el compuesto activado **1** (triángulos azules) y para la matriz porosa cargada con RAPTA-C, **1@RAPTA-C** (rombos naranjas). Los símbolos vacíos denotan el proceso de desorción. Derecha: difractograma de **1** antes de la adsorción de RAPTA-C (azul), y después de la adsorción de la metalodroga (naranja).

A continuación, se estudió de forma detallada el proceso de adsorción sólido-líquido a 298 K. Los resultados demostraron que el proceso de adsorción presenta una isoterma tipo I (Figura 2.12), cuyos puntos se pueden ajustar a la forma lineal del modelo de Langmuir (ecuación [2.1]):

$$\frac{C}{n} = \frac{C}{n_m} + \frac{1}{Kn_m} \quad [2.1]$$

donde C es la concentración de la disolución acuosa de RAPTA-C (M) en el equilibrio, n es la cantidad de RAPTA-C incorporado en **1** (mmol g^{-1}), K es la constante de Langmuir y n_m corresponde a la saturación prevista de RAPTA-C en **1** (mmol g^{-1}).

Los resultados muestran un valor máximo de carga n_m de 2.4 mmol (1.1 g) de RAPTA-C por gramo de **1** (3.97 mmol de RAPTA-C por mmol de **1**). Este valor de carga corresponde con cuatro moléculas de RAPTA-C por fórmula unidad de **1**. Teniendo en cuenta el tamaño interno aproximado de los huecos octaédricos y tetraédricos que presenta **1** (1.6 y 1.0 nm, respectivamente), así como el tamaño de la molécula de RAPTA-C (0.9 nm), podemos concluir que, en cada cavidad octaédrica se alojan dos moléculas de RAPTA-C mientras que, en cada cavidad tetraédrica se incluye una molécula de RAPTA-C (Figura

2.13). Por tanto, mediante esta estrategia se consigue una carga máxima de la metalodroga RAPTA-C en la red porosa.

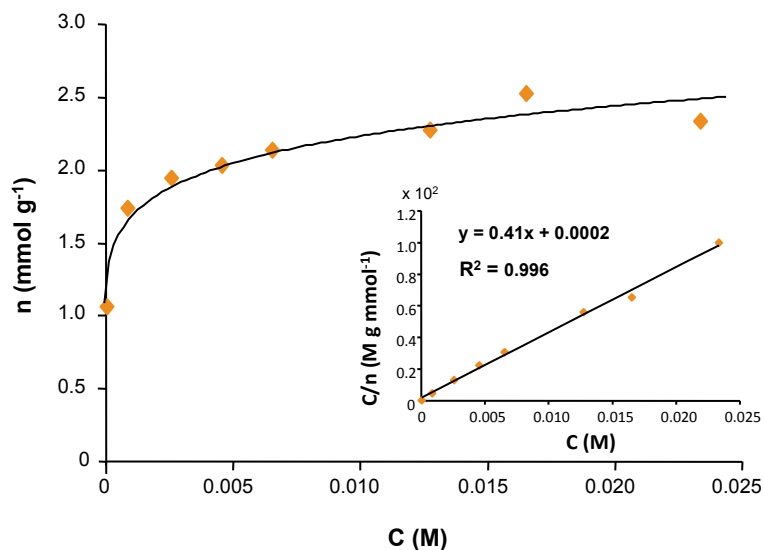


Figura 2.12. Isotherma de adsorción sólido-líquido de una disolución acuosa de RAPTA-C en **1** a 298 K. Los datos obtenidos se ajustan al modelo lineal de Langmuir (gráfica insertada).

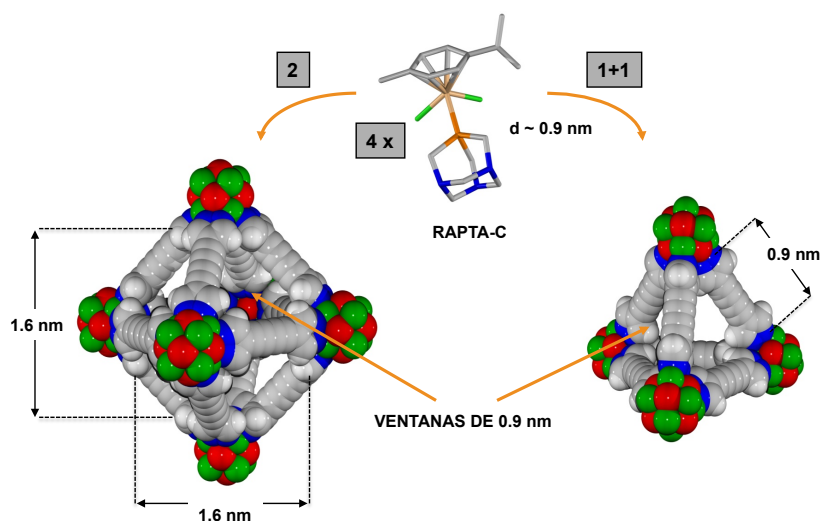


Figura 2.13. Representación de la incorporación de RAPTA-C (4 moléculas por fórmula unidad de MOF) en el material poroso **1**.

Finalmente, se estudió la capacidad de **1** para liberar RAPTA-C en fluido corporal simulado (FCS) a 310 K con el propósito de considerar su posible aplicación como agente para la liberación controlada de este metalofármaco. Para ello, en primer lugar, se determinó la cinética de liberación de RAPTA-C midiendo la cantidad de metalodroga liberada a la disolución sobrenadante de FCS a diferentes tiempos mediante UV-vis. Los resultados obtenidos a

volumen contante (20 mL) de FCS muestran que el equilibrio del proceso de desorción se alcanza a las 5 horas (Figura 2.14). Estos datos de desorción se pueden ajustar a una cinética de primer orden, de acuerdo con la ecuación [2.2]:

$$q_E - q_t = q_E e^{-kt} \quad [2.2]$$

donde q_E y q_t son las cantidades de RAPTA-C liberadas por gramo de MOF (mmol g^{-1}) en el equilibrio y a un cierto tiempo t (h), respectivamente, y k es la constante cinética de primer orden (h^{-1}). El ajuste de datos da como resultado un valor de k de 1.63 h^{-1} , que corresponde con un tiempo de vida media, $t_{1/2}$ de liberación de la metalodroga de 25 minutos. La facilidad con que se da el proceso de adsorción/desorción está de acuerdo con que la incorporación de la metalodroga en **1** tiene lugar mediante un proceso de fisorción, descartándose, por tanto, la quimisorción ya que implicaría reacciones de intercambio de ligandos y la coordinación del Ru a los grupos alquino de los ligandos bispirazolato. La reversibilidad del proceso de adsorción puede demostrarse cuantificando la cantidad de RAPTA-C liberado después de alcanzar el equilibrio (isoterma de desorción sólido-líquido) a 310 K. Los resultados muestran que cuando se suspenden 10 mg de **1@RAPTA-C** en 20 mL de FCS, el 20% de la metalodroga se libera, dando lugar a una disolución de RAPTA-C con una concentración de 0.1 mM (Figura 2.14). Por otro lado, resulta interesante determinar la cantidad máxima de metalodroga que el MOF es capaz de liberar. Así pues, se suspendió la matriz porosa cargada **1@RAPTA-C** en volúmenes crecientes de FCS bajo agitación durante 1.5 horas a 310 K. De esta forma, se determinó que la cantidad de metalofármaco liberada aumenta hasta el 70% cuando el volumen de FCS en el que se suspende **1@RAPTA-C** aumenta hasta 200 mL, lo que corresponde con una disolución final de RAPTA-C con una concentración de 0.004 mM.

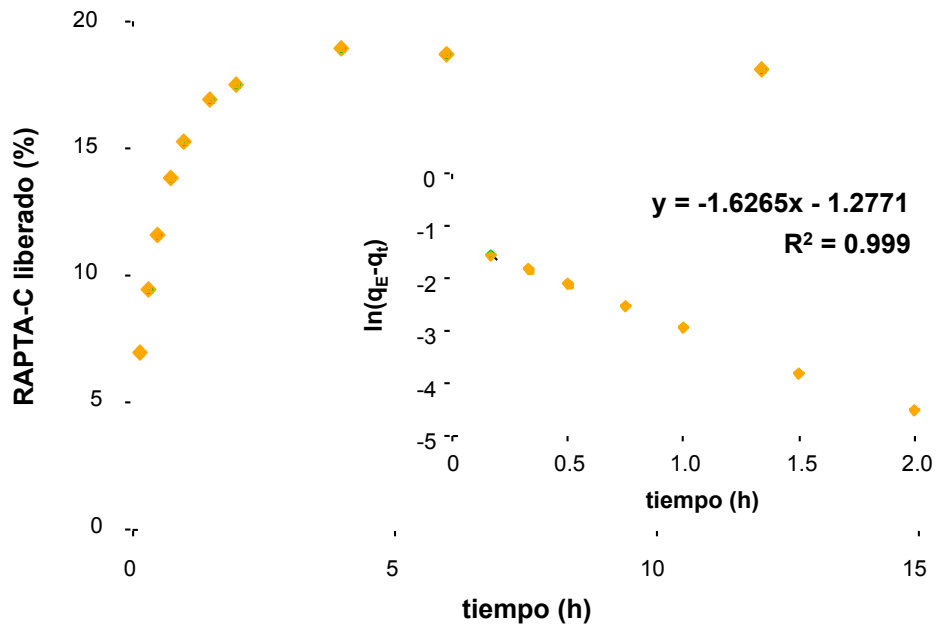


Figura 2.14. Proceso de desorción de RAPTA-C a partir de 10 mg de 1@RAPTA-C en 20 mL de fluido corporal simulado a 310 K. En la gráfica insertada, se representa el ajuste de los datos a un cinética de primer orden.

Conclusiones

En este apartado, se ha propuesto una red metalorgánica porosa, $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-}4,4'\text{-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)}_6]_n$ (**1**), con una excepcional estabilidad química y mecánica, incluso en fluido corporal simulado, para su aplicación en la encapsulación y liberación de un metalofármaco no convencional de rutenio, RAPTA-C. La estrategia seguida para la obtención de este MOF revela que el uso de enlaces de coordinación robustos metal-azolato da lugar a materiales con una estabilidad mayor que la que ofrecen muchos MOFs tradicionales basados en sistemas metal-carboxilato.

Por otra parte, utilizando diferentes técnicas de caracterización se ha demostrado que **1**: *i*) tiene un tamaño de partícula óptimo (130 ± 30 nm) para su aplicación como sistema de liberación controlada de fármacos anticancerígenos; *ii*) es estable térmicamente ($T_d = 623$ K); *iii*) posee porosidad permanente (con una superficie de BET de $1920 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y con un volumen de poro de $0.90 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$); *iv*) es estable mecánicamente, manteniendo su cristalinidad y porosidad incluso tras la aplicación de cargas de 1 y 2 toneladas cm^{-2} ; y *v*) presenta una extraordinaria estabilidad química cuando se somete a reflujo en disolventes orgánicos comunes, agua, disoluciones ligeramente ácidas o básicas, o incluso en fluido corporal simulado (FCS).

En vista de la elevada porosidad y estabilidad en fluido corporal simulado de **1**, se ha investigado su capacidad para la captura de la metalodroga no convencional $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (RAPTA-C). El material activado ha demostrado una capacidad de carga significativa de RAPTA-C, mediante fisisorción, de 3.97 mmol de RAPTA-C por mmol de MOF (1.1 g de fármaco por gramo de MOF). Este valor se corresponde con 4 moléculas de RAPTA-C por fórmula unidad de MOF, que se alojan tanto en cavidades octaédricas (2 moléculas) como tetraédricas (1 molécula). Debe destacarse que el proceso de adsorción es reversible y que el compuesto RAPTA-C puede liberarse en fluido corporal simulado siguiendo una cinética de primer orden con un $t_{1/2}$ de liberación de la metalodroga de 25 minutos .

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran que $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-H}_2\text{O})_2(\mu_4\text{-}4,4'\text{-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato})_6]_n$ puede considerarse una prueba de concepto adecuada para demostrar la utilidad de los polímeros de coordinación porosos o redes metalorgánicas como agentes liberadores de metalofármacos no convencionales. Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, es la primera vez que aparece descrito en la bibliografía la aplicación de una red metalorgánica porosa como agente portador y liberador de un metalofármaco no convencional. Sin embargo, **1** presenta algunas limitaciones como son la presencia de metales potencialmente tóxicos en su estructura (Ni(II)) y una cinética de liberación de RAPTA-C demasiado rápida. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de seguir desarrollando nuevos MOFs para esta aplicación que contengan iones metálicos biocompatibles en sus estructuras (ej. Ca(II), Fe(II), Al(III), Zn(II)), y que den lugar a interacciones más específicas con las metalodrogas para conseguir una verdadera liberación controlada de las mismas, es decir, una liberación constante durante un tiempo prolongado.⁹

Referencias bibliográficas

- ¹ Masciocchi N., Galli S., Colombo V., Maspero A., Palmisano G., Seyyedi B., Lamberti C., Bordiga S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 7902-7904.
- ² 3.0 V.: Karlsruhe, Germany, **2005**.
- ³ Eddaoudi M., Kim J., Rosi N., Vodak D., Wachter J., O'Keeffe M., Yaghi O. M., *Science*, **2002**, 295, 469.
- ⁴ Ovcharenko V., Fursova E., Romanenko G., Eremenko I., Tretyakov E., Ikorskii V., *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 5338-5350.
- ⁵ (a) Storm G., Belliot S. O., Daemen T., Lasic D. D., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1995**, 17, 31-48; (b) Guamet M., Vargas A., Gurny R., Delie F., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2008**, 69, 1-9.
- ⁶ Utilizando el programa de procesamiento digital de dominio público *ImageJ*.
- ⁷ Colombo V., Galli S., Choi, H. J., Han G. D., Maspero A., Palmisano G., Masciocchi N., Long J. R., *Chem. Sci.*, **2011**, 2, 1311.
- ⁸ El tamaño de la molécula de RAPTAC ha sido estimado como el diámetro de la esfera equivalente que ocupa el mismo volumen que el modelo derivado de la estructura cristalina de la metalodroga calculado con el programa SMILE (Eufri D., Sironi A., *J. Mol. Graphics*, **1989**, 7, 165).
- ⁹ Chien Y. W., Lin S., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Ed. James Swarbrick, Third Edition, **2006**, 1082-1103.

2.2 CPO-27-Ni en terapias combinadas de NO y RAPTA-C

Como ya se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, el monóxido de nitrógeno (NO) es una molécula señal muy importante involucrada en numerosos procesos biológicos,¹ como la vasodilatación² y la re-epitelización.³ Además, se ha comprobado que juega un papel importante en procesos cancerígenos puesto que el NO tiene en sí mismo actividad citotóxica y, además, puede aumentar la sensibilidad de las células cancerígenas frente a tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Consecuentemente, se ha empezado a estudiar su aplicación combinada con otros fármacos antitumorales con el fin de desarrollar terapias mejoradas para el tratamiento del cáncer. En este sentido, algunos estudios recientes demuestran que el NO potencia la actividad citotóxica de ciertos agentes quimioterapéuticos como, por ejemplo, del *cisplatino* frente a células de fibroblastoma pulmonar V79 y cáncer escamoso de cabeza y cuello;⁴ de la fludarabina en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica;⁵ del melfalán frente a células de fibroblastoma pulmonar V79 y de cáncer de mama MCF-7;⁶ así como de la doxorubicina para el tratamiento de cáncer de pecho y cáncer de colon humanos.⁷ Asimismo, debe destacarse que se ha comprobado que el NO retrasa los procesos de resistencia adquirida al tratamiento con doxorubicina.⁸

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este apartado, se presenta el MOF **CPO-27-Ni** como vehículo para la liberación combinada de NO y RAPTA-C. En los últimos años, se han descrito numerosos compuestos porosos de naturaleza inorgánica como agentes liberadores de NO. Este es el caso de algunas zeolitas⁹ y de la serie de MOFs isoestructurales $[M_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**CPO-27-M**) (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico, $M = \text{Ni}, \text{Zn}, \text{Mg}, \text{Mn}, \text{Fe}$ y Co). El **CPO-27-Co** fue el primer compuesto cristalino de esta serie sintetizado con éxito por Dietzel y sus colaboradores en 2005 (Figura 2.15).¹⁰ A partir de esa primera estructura cristalina, se han descrito una gran variedad de análogos basados en Ni(II) ,¹¹ Zn(II) ,¹² Mg(II) ,¹³ Mn(II) ¹⁴ y, recientemente, Fe(II) .¹⁵

La estructura cristalina de estos compuestos está basada en una topología similar a la de un panal de abejas con grandes poros unidimensionales (1D) con diámetros de 11 - 12 Å. El átomo metálico se encuentra coordinado a seis átomos de oxígeno, formando un octaedro distorsionado. Cinco de esos oxígenos proceden de los ligandos orgánicos desprotonados, mientras que el sexto pertenece a una molécula de agua. La eliminación de estas moléculas de agua coordinadas a los centros metálicos mediante un proceso de activación térmica da lugar a la formación de centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas. Se ha demostrado que la presencia de estos centros activos de adsorción en esta serie de MOFs mejora su capacidad de adsorción frente a determinados gases y su selectividad en la separación de mezclas de gases.¹⁶ Esto se debe a que los centros metálicos insaturados pueden dar lugar a interacciones específicas de formación de enlaces de coordinación con moléculas huésped, como por ejemplo H₂O, CO₂, NO, CO, etc., dando lugar a la formación de aductos.

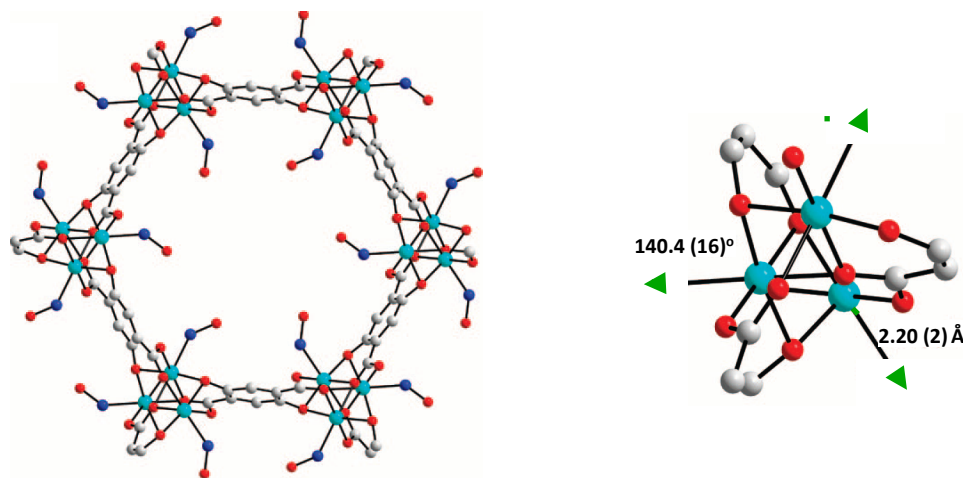


Figura 2.15. Estructura cristalina del MOF [Co₂(dhtp)(H₂O)₂] \cdot 8H₂O (**CPO-27-Co**) cargado con NO resuelta a partir de un refinamiento de tipo Rietveld de los datos de difracción de RX en polvo. Izquierda: coordinación de las moléculas de NO a los centros metálicos insaturados del MOF de Co. Derecha: ampliación de las posiciones de coordinación libres donde pueden tener lugar procesos de reconocimiento molecular. Cobalto. Oxígeno. Nitrógeno. Carbono.

Debe destacarse que de la serie **CPO-27-M**, particularmente, el derivado de Ni(II) presenta una gran capacidad de adsorción y liberación de NO.¹⁷ El mecanismo de adsorción se ha descrito como la coordinación de las moléculas de NO a los centros de Ni(II) con posiciones de coordinación insaturadas.

Durante el proceso de adsorción, se forma un aducto Ni-NO que hace posible la incorporación y posterior liberación, mediada por agua, de 7 mmol de NO por gramo de material. Además, el **CPO-27-Ni** presenta un buen equilibrio entre estabilidad y solubilidad en suero bovino durante un largo período de tiempo (~10 días) (Figura 2.16). Esta característica es clave en sistemas portadores de fármacos que han de ser lo suficientemente estables como para liberar el agente terapéutico, en este caso NO, antes de su degradación en condiciones fisiológicas pero, después, deben degradarse para ser eliminados y evitar su acumulación endógena.¹⁸

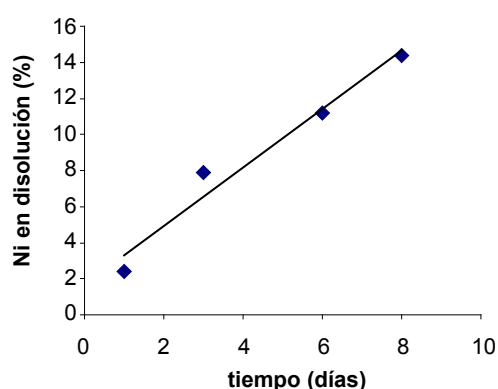


Figura 2.16. Estabilidad química del MOF **CPO-27-Ni** al incubarse en suero bovino a 310 K durante varios días. Después de cuatro días, tiempo suficiente para la liberación de todo el NO almacenado, menos del 10% del MOF se ha disuelto en el suero.

Es necesario, destacar que a pesar de la incorporación de NO en los centros metálicos de la estructura de **CPO-27-Ni** sigue existiendo una porosidad residual (12 Å) que permite la incorporación de moléculas bioactivas adicionales. Por tanto, se puede considerar que este material es un candidato prometedor como agente liberador de múltiples fármacos no convencionales. Así, mientras que las moléculas de NO pueden coordinarse a las posiciones de coordinación insaturadas de los centros metálicos, las moléculas de RAPTA-C pueden ocupar el volumen de poro residual de la estructura (Figura 2.17).

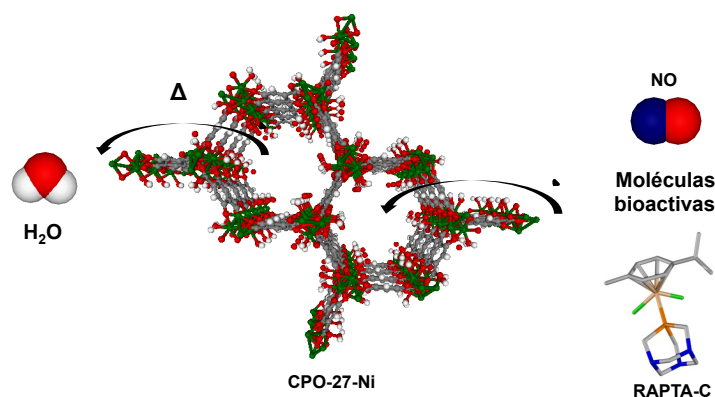


Figura 2.17. Activación térmica de la red metalorgánica **CPO-27-Ni**, con el fin de eliminar las moléculas de H_2O adsorbidas en su estructura, y la posterior encapsulación de NO y RAPTA-C. **Níquel.** Carbono. **Oxígeno.** Hidrógeno (blanco). **Nitrógeno.** **Rutenio.** **Fósforo.** **Cloro.**

Discusión y resultados

Para la síntesis del **CPO-27-Ni** se siguió la metodología descrita en bibliografía. Para ello, se disolvieron $Ni(AcO)_2 \cdot 4H_2O$ y ácido 2,5-dihidroxitereftálico (H_4dhtp) en relación 2:1 en H_2O y THF, respectivamente. La mezcla de ambas disoluciones se hizo reaccionar en condiciones solvotermales a 383 K durante 72 horas (Figura 2.18). Trascurrido el tiempo de reacción, se obtuvo una suspensión que se filtró dando lugar a un sólido microcristalino de color amarillo y formulación $[Ni_2(dhtp)(H_2O)_2] \cdot 8H_2O$ (**CPO-27-Ni**). El análisis posterior de este material mediante difracción de rayos X en polvo, demostró que se trataba de la fase pura **CPO-27-Ni** publicada por Dietzel y colaboradores (para más detalles experimentales véase el Anexo A).¹¹

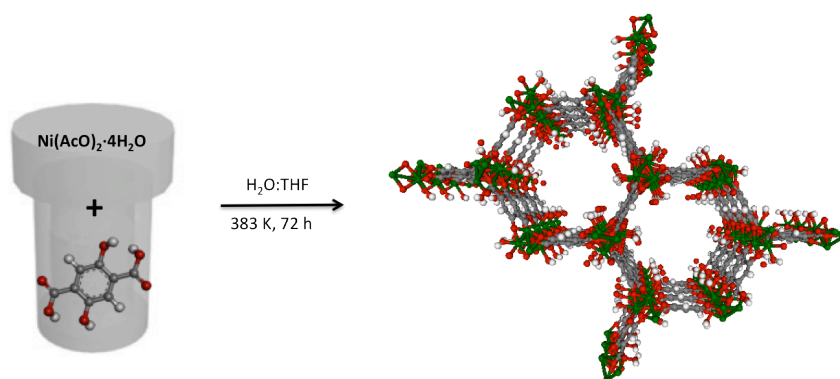


Figura 2.18. Síntesis solvotermal para la obtención del compuesto microcristalino **CPO-27-Ni**. **Níquel.** Carbono. **Oxígeno.** Hidrógeno (blanco).

De acuerdo con la estructura descrita en bibliografía, el polímero **CPO-27-Ni** cristaliza en el sistema trigonal en el grupo espacial $R\bar{3}$ ($a = b = 25.9783$, $c = 6.6883$ Å, $V = 3967.1$ Å³, $Z = 18$, $\delta = 1.195$ g cm⁻³, $V_p = 0.56$ cm³ g⁻¹). Su estructura cristalina se basa en una red tridimensional neutra de canales hexagonales que recuerda a un panal de abejas. El componente inorgánico forma una cadena helicoidal de octaedros compartidos de NiO₆, donde cada átomo metálico está unido a dos oxígenos pertenecientes a grupos olato del ligando, tres oxígenos de grupos carboxilato y una molécula de agua (Figura 2.19).¹⁹ Las cadenas helicoidales del **CPO-27-Ni** están separadas por ligandos dihidroxitereftalato. Estos espaciadores orgánicos actúan como pilares rígidos entre cadenas, de forma que cada ligando orgánico está unido a tres posiciones metálicas diferentes de cada cadena.

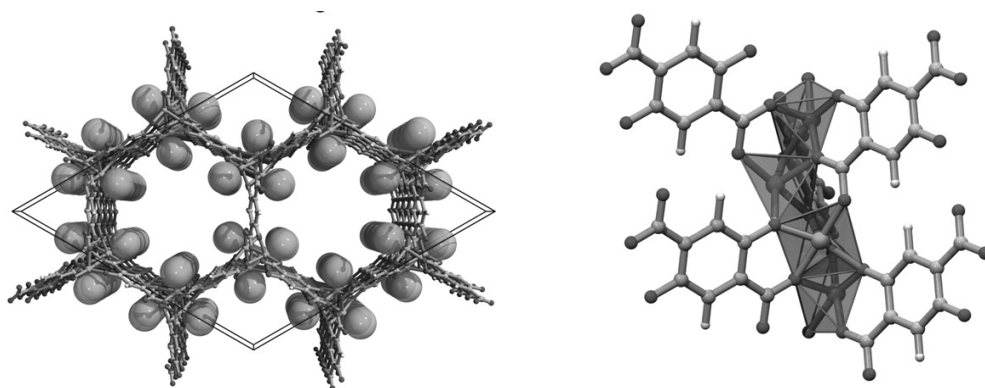


Figura 2.19. Izquierda: estructura cristalina del **CPO-27-Ni** donde se pueden ver los canales hexagonales y las posiciones de adsorción representadas con grandes esferas. Derecha: vista de la cadena helicoidal del **CPO-27-Ni** donde se muestran las posiciones de coordinación insaturadas.

Una vez aislada la matriz porosa **CPO-27-Ni**, se estudió el tamaño de sus partículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido a Presión Variable (VP-SEM). El recuento manual de 210 partículas y el posterior tratamiento estadístico de los datos proporcionó un tamaño promedio de partícula de 1093 ± 580 nm, con un alto grado de dispersión, coincidiendo con resultados previamente publicados (Figura 2.20).²⁰ Sin embargo, recientemente, se han publicado dos estudios donde se describen nuevas estrategias de síntesis para el **CPO-27-Ni** (síntesis mediada por microondas²¹ y síntesis mediante mezcla

rápida de disolventes)²² que dan lugar a materiales con tamaños de partícula menores (entre 20 y 600 nm).

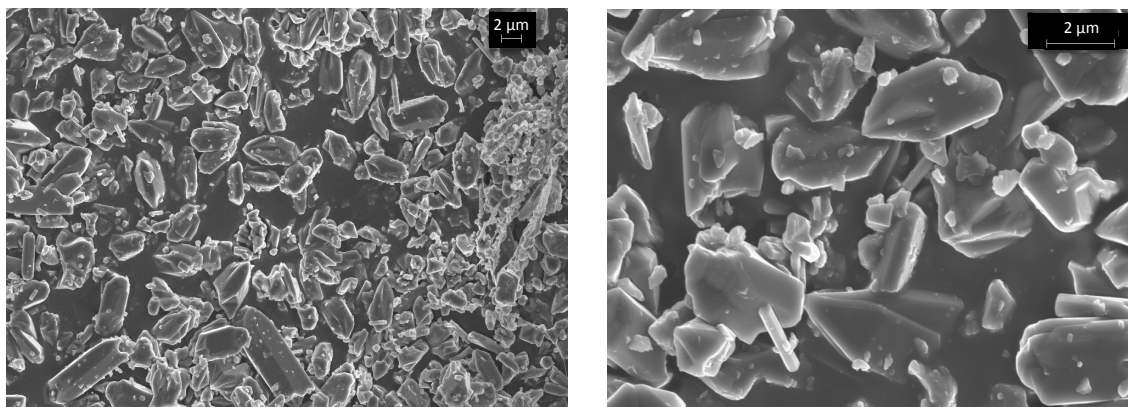


Figura 2.20. Imágenes de VP-SEM para el compuesto **CPO-27-Ni**.

Por otra parte, en relación a las propiedades térmicas del **CPO-27-Ni**, debe destacarse que la red estructural es estable hasta los 523 K. Además, las moléculas de agua adsorbidas o coordinadas a los centros de Ni(II) se pueden eliminar fácilmente mediante la activación térmica del compuesto a 423 K en vacío dinámico (10^{-4} bar) durante 12 h. Este proceso de deshidratación no provoca la destrucción de la conectividad de la red y, gracias a él, se alcanza una porosidad accesible del 60%. Tras la eliminación de las moléculas de agua, se forman centros metálicos con sólo cinco de las seis posiciones de coordinación ocupadas con una geometría de pirámide de base cuadrada, con las posiciones de coordinación vacías orientadas hacia el interior de los poros (Figura 2.19). Este entorno de coordinación desfavorable se traduce en una gran afinidad de los centros metálicos por la coordinación de moléculas huésped de tipo base de Lewis (NO, CO, H₂O, etc.).

Tras llevar a cabo la activación de la matriz porosa **CPO-27-Ni**, se procedió a estudiar la estabilidad química de la misma en diferentes disolventes orgánicos comunes anhidros (para evitar la coordinación de moléculas de agua a los centros metálicos), con el fin de evaluar su posible uso en la encapsulación de RAPTA-C. Para este estudio, se escogieron disolventes capaces de solubilizar el RAPTA-C. Los mejores valores de solubilidad de RAPTA-C se obtuvieron para el diclorometano (CH₂Cl₂) (9 mg de RAPTA-C por mL), el metanol (MeOH) (7 mg de RAPTA-C por mL) y el tetrahidrofurano (THF)

(2 mg de RAPTA-C por mL). De acuerdo con estos resultados, a continuación, se demostró que la matriz porosa activada poseía una elevada estabilidad química en dichos disolventes, puesto que su patrón de difracción de RX en polvo permanecía inalterado después de someterla a agitación en los mismos durante 72 h (Figura 2.21).

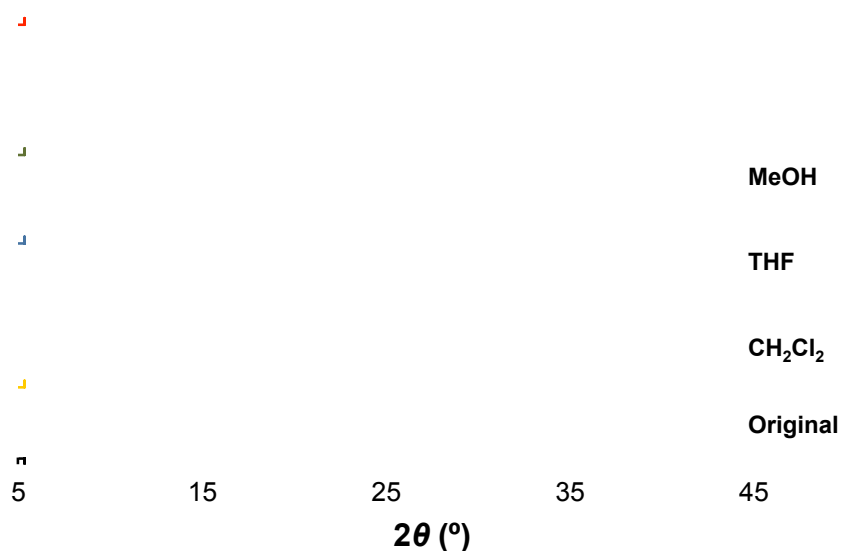


Figura 2.21. Difractogramas de rayos X en polvo para el **CPO-27-Ni** después de los ensayos de estabilidad química en diferentes disolventes orgánicos anhidros (THF, CH₂Cl₂ y MeOH).

Gracias a la estabilidad química que presenta la red porosa en los disolventes anteriormente mencionados, se pudo llevar a cabo el estudio de la encapsulación de RAPTA-C y NO en **CPO-27-Ni** siguiendo la metodología representada en la Figura 2.22. En primer lugar, se llevó a cabo la encapsulación de RAPTA-C en el MOF **CPO-27-Ni** mediante la impregnación de la matriz porosa en disoluciones saturadas al 80% de RAPTA-C a 298 K. Los resultados obtenidos mediante UV-vis y análisis elemental demuestran que el CH₂Cl₂ es el disolvente más adecuado para llevar a cabo la incorporación de la metalodroga y obtener la matriz cargada **CPO-27-Ni@RAPTA-C** puesto que, en este disolvente, se consigue la mayor carga de RAPTA-C de ~ 4 moléculas de RAPTA-C por celdilla unidad de **CPO-27-Ni** (1 mmol de RAPTA-C por gramo de **CPO-27-Ni** ó 0.23 mmol de RAPTA-C por mmol de **CPO-27-Ni**). Probablemente, estos resultados se deben a la mayor concentración de RAPTA-C en la disolución resultante puesto que la solubilidad de RAPTA-C en el disolvente apolar CH₂Cl₂ es significativamente mayor que en MeOH o THF.

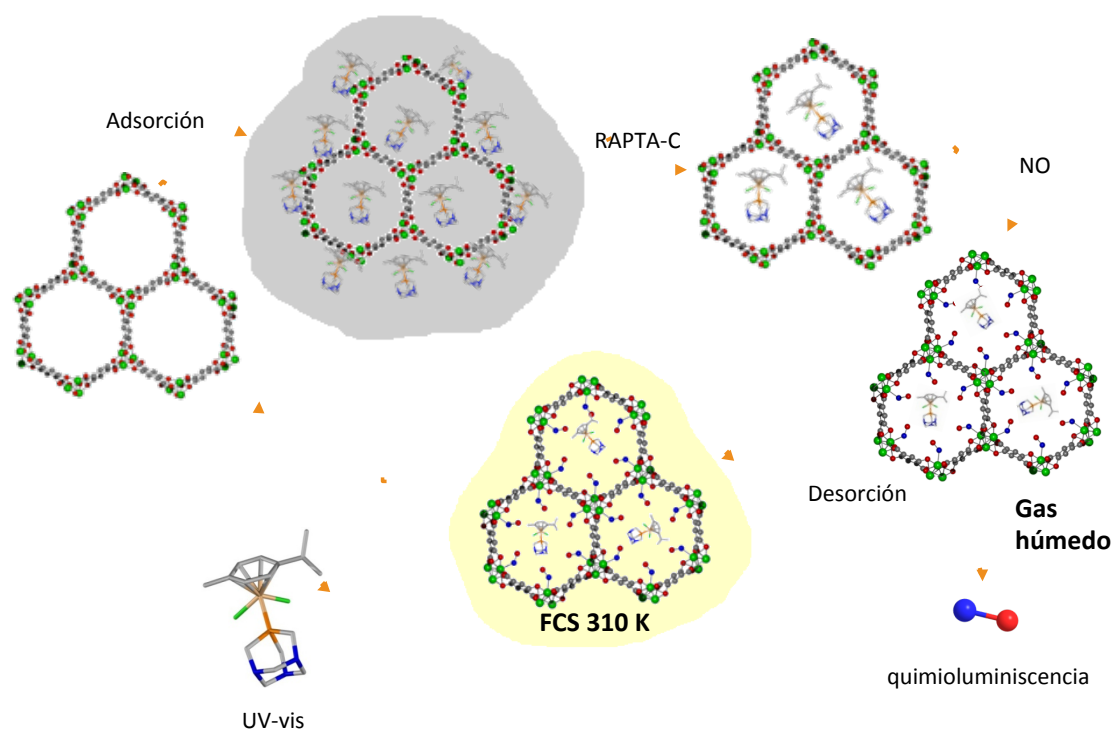
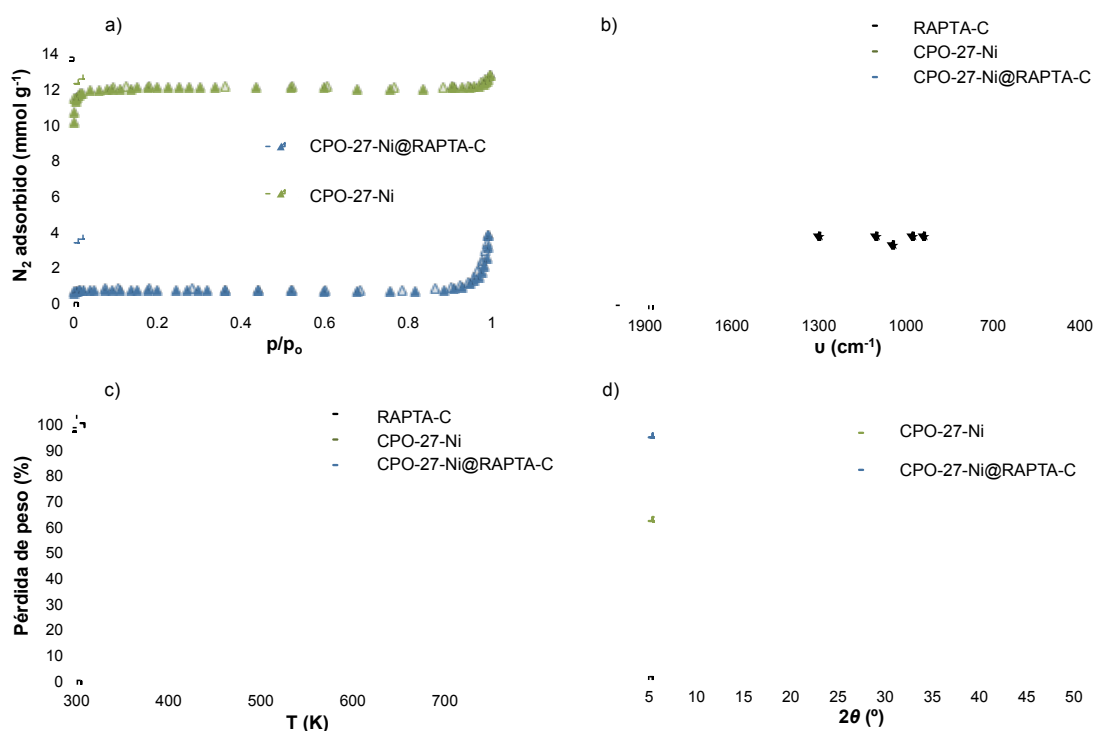


Figura 2.22. Proceso de incorporación y liberación de RAPTA-C y NO en la matriz porosa **CPO-27-Ni**. En primer lugar, se estudió la liberación de NO al poner en contacto el MOF cargado con un gas húmedo. Por otro lado, se estudió la liberación de RAPTA-C en fluido corporal simulado (FCS). **Níquel**. **Carbono**. **Oxígeno**. **Nitrógeno**. **Rutenio**. **Fósforo**. **Cloro**.

La incorporación de la metalodroga en los poros de la red del **CPO-27-Ni** queda demostrada por: *i*) la drástica disminución en la capacidad de adsorción de N_2 a 77 K, de hecho la superficie de BET disminuye desde $720 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para el material original hasta $45 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ tras la carga con RAPTA-C (Figura 2.23a); *ii*) la presencia de algunos picos característicos del RAPTA-C en el IR del MOF cargado **CPO-27-Ni@RAPTA-C** (Figura 2.23b); y *iii*) la mayor estabilidad térmica de la matriz porosa cargada en comparación con el MOF original (Figura 2.23c). Por otra parte, debe destacarse que la integridad estructural de la red se mantiene después de la incorporación de RAPTA-C, tal y como se aprecia en el difractograma de rayos X en polvo medido después de la incorporación del metalofármaco (Figura 2.23d).



2.23. (a) Isothermas de adsorción de N₂ a 77 K; (b) espectros IR; (c) diagrama de análisis termogravimétrico y (d) difractogramas de RX en polvo para los compuestos **CPO-27-Ni**, **CPO-27-Ni@RAPTA-C** y RAPTA-C. La desorción se denota con símbolos vacíos.

Un vez que se logró incorporar el metalofármaco RAPTA-C en la estructura porosa del **CPO-27-Ni**, se estudió la capacidad de la especie resultante **CPO-27-Ni@RAPTA-C** para adsorber NO. Las medidas de adsorción gravimétrica de NO a temperatura ambiente demostraron que la red **CPO-27-Ni@RAPTA-C** es capaz de adsorber 6.0 mmol de NO/g de MOF activado (2.51 mmol de NO/mmol de MOF). Este valor es similar al obtenido para el **CPO-27-Ni** original (7 mmol/g, ó 2.2 mmol de NO/mmol de MOF) (Figura 2.24), lo que significa que la presencia de RAPTA-C en las cavidades del MOF no impide el acceso del NO a los centros de metálicos insaturados de la estructura. Asimismo, se mantiene la forma de las isothermas en las que se observa un ciclo de histéresis característico de materiales donde la molécula de NO se enlaza fuertemente al átomo metálico. La cantidad de NO adsorbido corresponde, aproximadamente, con 1 molécula de NO por centro de coordinación insaturado, aunque también hay una pequeña cantidad de NO fisiorbido que interacciona débilmente con la superficie de los poros. Debe destacarse, que las especies activadas muestran un color (amarillo) diferente al

de los materiales resultantes después de la exposición a una corriente de NO (verde oscuro), lo que confirma la coordinación de estas moléculas huésped a los centros de Ni(II). Esto mismo sucede con otros compuestos con centros metálicos de coordinación insaturados en su estructura.²³ Los resultados obtenidos demuestran que el mecanismo de adsorción del RAPTA-C (fisisorción) es independiente del de NO (quimisorción).

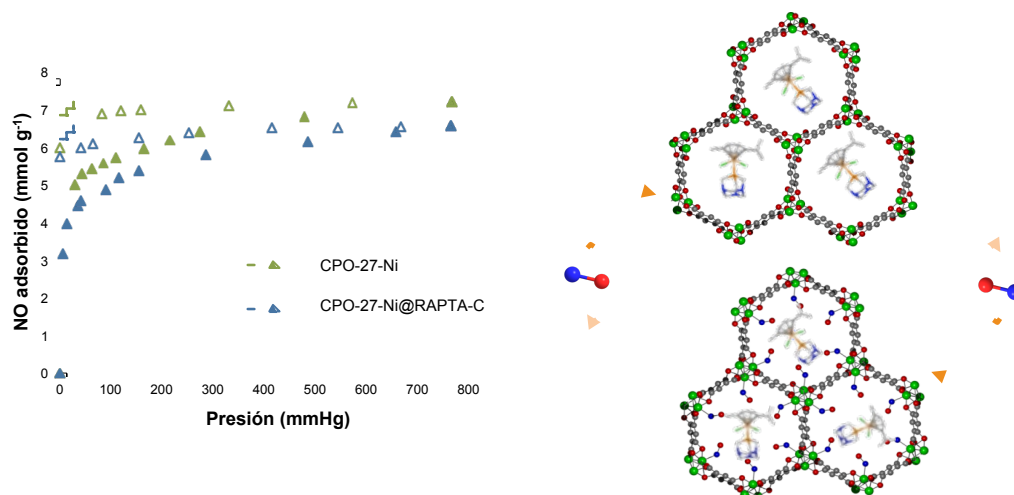


Figura 2.24. Isotherma de adsorción de NO a 298 K para el compuesto activado **CPO-27-Ni** y para el material derivado cargado **CPO-27-Ni@RAPTA-C**. La desorción se denota con símbolos vacíos. **Níquel**. **Carbono**. **Oxígeno**. **Nitrógeno**. **Rutenio**. **Fósforo**. **Cloro**.

Por otro lado, la presencia de NO en la matriz porosa se confirmó mediante espectroscopía IR en colaboración con la Prof. Bárbara Gil del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Jaguelónica de Polonia. Para llevar a cabo dicha caracterización se prepararon dos pastillas prensadas de **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C**. Posteriormente, se introdujeron en una celda de gases que permitió llevar a cabo la activación térmica de las muestra, para después exponerlas a una corriente de NO (véanse los detalles experimentales en el Anexo A). Los resultados muestran que la banda de *stretching* a 1839 cm^{-1} , característica de la molécula de NO, es menos intensa en el compuesto **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** que en el MOF original cargado con NO. Este hecho confirma de nuevo que la cantidad de NO adsorbida por la matriz porosa previamente cargada con RAPTA-C es algo menor que en el caso del MOF original debido, seguramente, al espacio que ocupan las moléculas de RAPTA-C en las cavidades de la estructura (Figura 2.25). Por otro lado, la forma y posición de la banda es similar en ambos casos

lo que demuestra que también en el **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** la adsorción de NO se produce en los centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas y no se debe sólo a un fenómeno de fisisorción sobre la superficie.

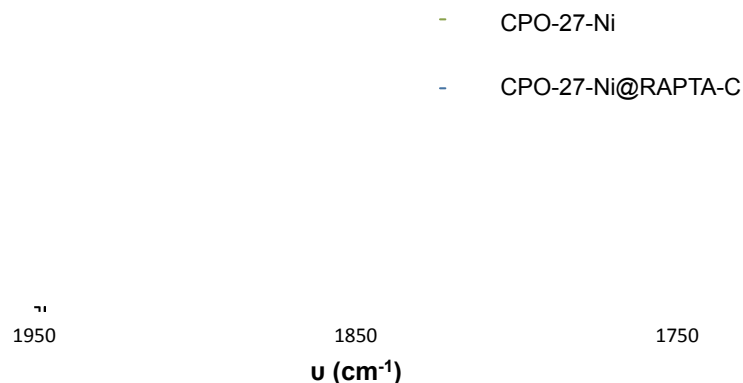


Figura 2.25. Espectros IR de **CPO-27-Ni@NO** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** en la región de NO. A pesar de la presencia de moléculas de RAPTA-C en los poros, podemos concluir que los centros metálicos coordinativamente insaturados del **CPO-27-Ni** continúan siendo accesibles.

Por último, se estudió la capacidad de la matriz porosa **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** para liberar NO y RAPTA-C. Tal y como describieron Morris y sus colaboradores, las moléculas de agua son capaces de reemplazar las moléculas de NO coordinadas a los centros metálicos, provocando la liberación de NO de la matriz porosa.¹⁷ De acuerdo con esto, en primer lugar, se estudió la cinética de liberación de NO a 298 K mediante quimioluminiscencia, al poner en contacto las matrices cargadas, **CPO-27-Ni@NO** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO**, con una corriente de gas con una humedad relativa del 11% para simular situaciones como la liberación de NO en la piel para tratamientos topológicos mediante parches. Al igual que ocurría con el compuesto **CPO-27-Ni@NO**, la matriz **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** libera rápidamente el NO fisisorbido como se demuestra por el pico intenso que aparece en los primeros minutos de la cinética de desorción. A continuación, la liberación del NO quimisorbido se produce más lentamente (Figura 2.26) y parece que se ve afectada por la presencia de RAPTA-C en sus poros. De hecho, **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** libera más rápidamente las moléculas de NO ($t_{1/2} = 23$ min) que **CPO-27-Ni@NO** ($t_{1/2} = 40$ min) como se puede apreciar en una caída de la concentración de NO más pronunciada en el primer caso. Hay que destacar que en ambos casos se libera todo el NO almacenado.

Además, aunque para el **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** la mayoría del NO se libera durante las dos primeras horas, este compuesto continua liberando cantidades significativas de NO después de 12 horas. A pesar de que la cinética de liberación de NO es más rápida en **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** que en el material original, se puede considerar que la incorporación de RAPTA-C en los huecos de la estructura no afecta significativamente al proceso de adsorción/desorción del NO.

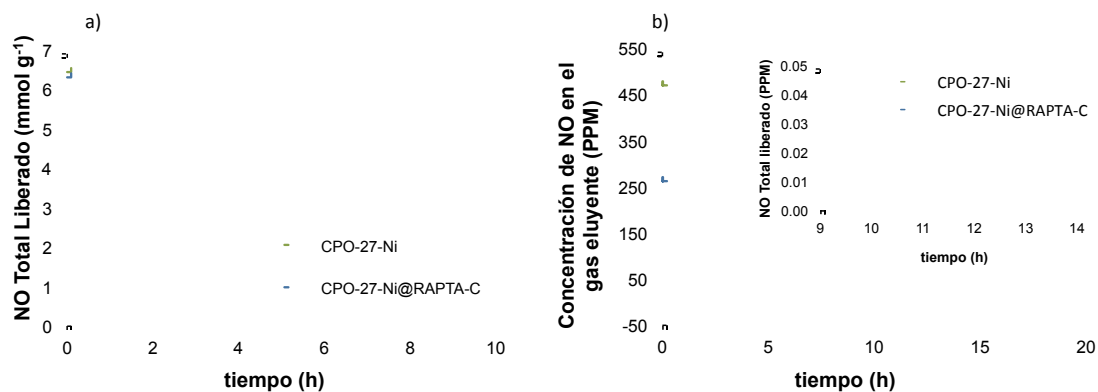


Figura 2.26. Cinética de desorción de NO a 298K al poner en contacto las matrices porosas **CPO-27-Ni@NO** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** con un gas húmedo (11% de humedad relativa). (a) Cantidad total de NO liberado expresado en mmol g⁻¹ y (b) variación de la concentración de NO en el gas eluido expresada en ppm. Ambos materiales liberan cantidades significativas de NO después de 12 horas.

Finalmente, se estudió la liberación de RAPTA-C de las matrices porosas **CPO-27-Ni@RAPTA-C** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** en fluido corporal simulado (FCS) a 310 K, con el propósito de evaluar los posibles efectos de la presencia de NO en los centros de coordinación metálicos. Para ello, se suspendieron las dos muestras **CPO-27-Ni@RAPTA-C** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** en FCS a 310 K con el fin de comparar la cinética de desorción de RAPTA-C. Como en el apartado anterior, se determinó la cinética de liberación de RAPTA-C midiendo la cantidad de metalodroga liberada a la disolución sobrenadante de FCS a diferentes tiempos mediante UV-vis. Los resultados obtenidos a volumen constante (20 mL) de FCS muestran que no existen diferencias significativas entre la muestra cargada con NO y la que no lo está, ya que en ambos casos el perfil de la cinética es muy similar. El equilibrio del proceso de desorción se alcanza aproximadamente a las 2 horas con un 25% de la metalodroga total liberada, dando lugar a disoluciones de

RAPTA-C con una concentración de 0.12 mM (Figura 2.27). Estos datos de desorción se pueden ajustar a una cinética de primer orden, de acuerdo con la ecuación [2.2]. El ajuste de datos da como resultado valores de k de 2.31 y 2.29 h^{-1} , para **CPO-27-Ni@RAPTA-C** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO**, respectivamente, que corresponden con un tiempo de vida media $t_{1/2}$ de liberación de la metalodroga de 18 minutos. Este comportamiento es razonable puesto que no existe interacción entre el RAPTA-C y el NO adsorbidos. De hecho, se sabe que al poner el MOF en contacto con una disolución acuosa la liberación del NO es casi instantánea, por lo que las dos matrices porosas serían idénticas a los pocos minutos de suspenderlas en FCS.^{17b} Debe destacarse que la rápida liberación de NO en FCS puede producir un impacto positivo en aplicaciones biológicas, puesto que sus propiedades vasodilatadoras podrían aumentar el flujo sanguíneo facilitando la penetración de RAPTA-C en células cancerosas, como se ha descrito previamente para el uso combinado de antitumorales con otros vasodilatadores.²⁴ Por otra parte, debe destacarse que la rápida cinética de desorción de RAPTA-C está de acuerdo con que la interacción de estas moléculas huésped con la matriz porosa **CPO-27-Ni** tiene lugar mediante un mecanismo de fisorción.

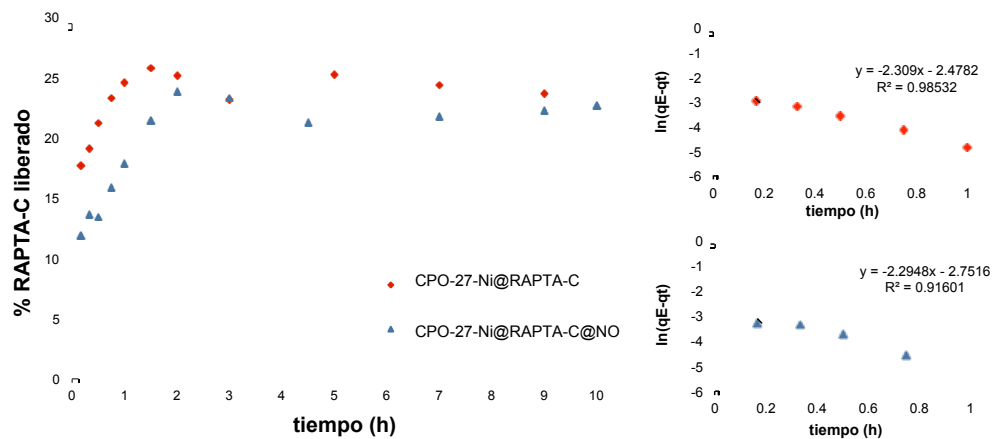


Figura 2.27. Izquierda: proceso de desorción de RAPTA-C a partir de **CPO-27-Ni@RAPTA-C** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** en fluido corporal simulado a 310 K. Derecha: representación del ajuste de los datos a una cinética de primer orden para ambos materiales.

Conclusiones

El MOF **CPO-27-Ni** presenta un comportamiento excepcional en la captura y liberación de NO, además de ser un material poroso que posee una elevada estabilidad química, incluso en condiciones fisiológicas. Estas características lo hacen un buen candidato para su aplicación en la incorporación de múltiples fármacos no convencionales como, RAPTA-C y NO.

En este apartado, se ha demostrado que es posible la incorporación combinada de RAPTA-C y NO en la matriz porosa **CPO-27-Ni**, y que la adsorción/liberación de ambas especies es independiente. Este hecho se atribuye a las diferencias entre la interacción que tiene lugar entre la matriz porosa y las moléculas de adsorbato: las moléculas de NO reaccionan directamente con los centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas (quimisorción), mientras que las moléculas de RAPTA-C se encuentran fisisorbidas dentro de los poros.

Por otro lado, la liberación del metalofármaco en FCS se ve poco influenciada por la presencia de NO en la red, principalmente porque el NO se libera instantáneamente al suspenderse la matriz porosa en medio acuoso. Sin embargo, la liberación de NO al someter a la matriz a una corriente de gas húmedo es más rápida para **CPO-27-Ni@RAPTA-C** que para el material original **CPO-27-Ni**.

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran que este sistema puede considerarse como una prueba de concepto adecuada para demostrar la utilidad de los polímeros de coordinación porosos como agentes liberadores de varias moléculas bioactivas. El estudio del efecto sinérgico de la liberación de múltiples fármacos puede dar lugar al desarrollo de terapias combinadas avanzadas. Asimismo, sería interesante extender estos estudios a nuevos MOFs basados en iones metálicos de menor toxicidad, de hecho este MOF está descrito para otros metales menos tóxicos (Fe, Zn, etc.).

Referencias bibliográficas

- ¹ Lancaster J. R., *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1997**, 18-30.
- ² (a) Furchgott R. F., Zawadzki H. V., *Nature*, **1980**, 373; (b) Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S., *Nature*, **1987**, 524.
- ³ Zhu H., Ka B., Murad F., *World J. Surg.*, **2007**, 31, 624-631.
- ⁴ (a) Wink D. A., Cook J. A., Christodoulou D., Krishna M., Pacelli R., Kim S., DeGraff W., Gamson J., Vodovotz Y., Russo A., Mitchell J. B., *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1997**, 1, 88; (b) Azizzadeh B., Yip H. T., Blackwell K. E., Horvath S., Calcaterra T. C., Buga G. M., Ignarro L. J., Wang M. B., *The Laryngoscope*, **2001**, 1896.
- ⁵ Evig C. B., Kelley E. E., Weydert C. J., Chu Y., Buettner G. R., Burns P., *Nitric Oxide*, **2004**, 10, 119-129.
- ⁶ Cook J. A., Krishna M. C., Pacelli R., DeGraff W., Liebmann J., Mitchell J. B., Russo A., Wink D. A., *British Journal of Cancer*, **1997**, 76, 325-334.
- ⁷ (a) Muir C. P., Adams M. A., Graham C. H., *Breast Cancer Research and Treatment*, **2006**, 96, 169-176; (b) Riganti C., Miraglia E., Viarisio D., *Cancer Res.*, **2005**, 65, 516.
- ⁸ (a) Konovalova N. P., Goncharova S. A., Volkova L. M., Rejewskaya T. A., Eremenko L. T., Korolev A. M., *Nitric Oxide*, **2003**, 8, 59-64; (b) Adams D. J., Levesque M. C., Weinberg J. B., Smith K. L., Flowers J. L., Moore J., Colvin O. M., Silber R., *Leukemia*, **2001**, 15, 1852-1859.
- ⁹ Fox S., Wilkinson T. S., Wheatley P. S., Xiao B., Morris R. E., Sutherland A., Simpson A. J., Barlow P. G., Butler A. R., Megson I. L., Rossi A. G., *Acta Biomater.*, **2010**, 6, 1515.
- ¹⁰ Dietzel P. D. C., Morita Y., Blom R., Fjellvag H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 6354.
- ¹¹ Dietzel P. D. C., Panella B., Hirscher M., Blom R., Fjellvag H., *Chem. Commun.*, **2006**, 959.
- ¹² (a) Rosi N. L., Kim J., Eddaoudi M., Chem B., O'Keeffe M., Yagui O. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1504; (b) Rowsell J. L. C., Yagui O. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1304; (c) Dietzel P. D. C., Johnsen R. E., Blom R., Fjellvag H., *Chem. - Eur. J.*, **2008**, 14, 2389.
- ¹³ (a) Dietzel P. D. C., Blom R., Fjellvag H., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 23, 3624; (b) Caskey S. R., Wong-Foy A. G., Matzger A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 10870.
- ¹⁴ Zhou W., Wu H., Yildirim T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 15268.
- ¹⁵ Bhattacharjee S., Choi J. S., Yang S. T., Choi S. B., Kim J., Ahn W. S., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2010**, 10, 135.
- ¹⁶ (a) Dietzel P. D. C., Johnsen R. E., Fjellvag H., Bordiga S., Groppo E., Chavan S., Blom R., *Chem. Commun.*, **2008**, 5125-5127; (b) Dietzel P. D. C., Besikiostis V., Blom R., *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 7362-7370; (c) Chavan S. M., Shearer G. C., Bloch E., Bordiga S., *Chem. Phys. Chem.*, **2012**, 13, 366.
- ¹⁷ McKinlay A. C., Xiao B., Wragg D. S., Wheatley P. S., Megson I. L., Morris R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 10440.
- ¹⁸ Hinks N. J., McKinlay A. C., Xiao B., Wheatley P. S., Morris R. E., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2010**, 129, 330-334.
- ¹⁹ Dietzel P. D. C., Johnsen R. E., Blom R., Fjellvåg H., *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 2389-2397.
- ²⁰ (a) Díaz-García M., Mayoral A., Díaz I., Sánchez-Sánchez M., *Cryst. Growth. Des.*, **2014**, 14, 2479-2487; (b) Kahr J., Morris R. E., Wright P. A., *Cryst. Eng. Comm.*, **2013**, 15, 9779.
- ²¹ Lee J. S., Halligudi S. B., Jang N. H., Hwang D. W., Chang J. -S., Hwang Y. K., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2010**, 31, 1489.

- ²² Gimeno-Fabra M., Munn A. S., Stevens L. A., Drage T. C., Grant D. M., Kashtiban R. J., Sloan J., Lester E., Walton R. I., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 10642-10644.
- ²³ (a) Barea E., Navarro J. A. R., Salas J. M., Masciocchi N., Galli S., Sironi A., *Polyhedron*, **2003**, *22*, 3051-3057; (b) Quartapelle Procopio E., Fukushima T., Barea E., Navarro J. A. R., Horike S., Kitagawa S., *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 13117-13125.
- ²⁴ (a) Senan S., Smit E. F., *The Oncologist*, **2007**, *12*, 465-477; (b) Azzi S., Hebda J. K., Gavard J., *Frontiers in Oncology*, **2013**, *3*, 1.

2.3 Nanopartículas de MIL-100(Fe)

Actualmente, una de las redes metalorgánicas con más éxito para su aplicación en la adsorción y liberación controlada de fármacos es el nanoMOF $[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3)]_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \sim 14.5$), también conocido como **MIL-100(Fe)** (MIL: Materiales del Instituto Lavoisier). El **MIL-100(Fe)** está basado en el ensamblaje del ion metálico Fe(III) y el ligando benceno-1,3,5-tricarboxilato (btc), y junto al **MIL-101**, se considera el primer sólido cristalino sintético de naturaleza metalorgánica que presenta huecos mesoporosos en su estructura.¹ Este MOF ha sido descrito para varios metales de transición, como por ejemplo Cr(III),² Al(III),³ V(III)⁴ y Sc(III).⁵ Sin embargo, en este apartado sólo se hará referencia a la isoestructura basada en Fe(III).

De acuerdo con la estructura descrita en bibliografía, el material poroso **MIL-100(Fe)** cristaliza en el grupo espacial *Fd-3m* del sistema cúbico, ($a = 73.340 \text{ \AA}$, $V = 394.481 \text{ \AA}^3$, $Z = 1$, $\delta = 0.98 \text{ g cm}^{-3}$). Su estructura cristalina está basada en trímeros de Fe(III) octaédricos unidos por ligandos carboxílicos, dando lugar a la formación de supertetraedros delimitados por dos tipos de poros (Figura 2.28). Los ligandos orgánicos están localizados en las cuatro caras de los supertetraedros, mientras que los vértices están ocupados por trímeros de hierro. Los huecos mesoporosos de la estructura tienen un tamaño de 25 y 29 \AA , y son accesibles a través de ventanas pentagonales y hexagonales con un diámetro aproximado de 5.5 y 8.6 \AA , respectivamente (Figura 2.29). Hay que destacar que a los centros metálicos de Fe(III) se coordinan 2 moléculas de H_2O y un grupo F/OH.⁶ Mediante un tratamiento térmico es posible eliminar las moléculas de H_2O y los iones F/OH terminales dando lugar a la formación de centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas. Debe destacarse que la eliminación de F/OH conlleva la reducción parcial de Fe(III) a Fe(II). Asimismo, mediante tratamiento térmico a vacío es posible eliminar las moléculas de agua retenidas en los poros, sin que el material pierda cristalinidad.

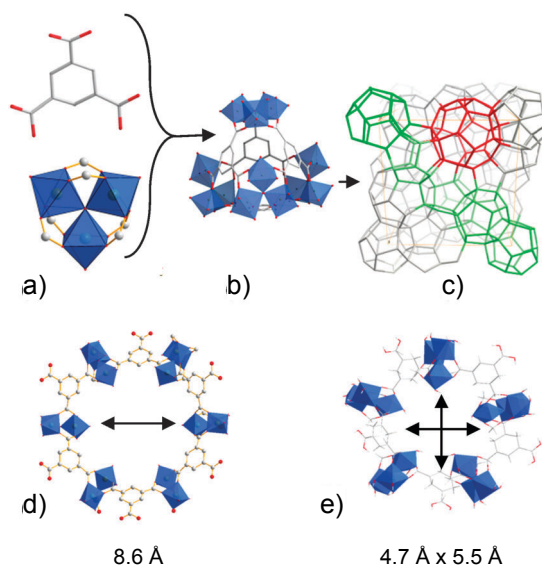


Figura 2.28. Estructura cristalina del MOF **MIL-100(Fe)**. (a) Trímeros de hierro octaédrico que comparten un átomo de oxígeno ($\mu_3\text{-O}$). (b) A su vez, los trímeros de hierro están conectados a través de los grupos carboxilato de los ligandos orgánicos. Los espaciadores aromáticos se disponen ocupando las caras de los supertetraedros. (c) Representación esquemática de la celda unidad del **MIL-100(Fe)** resultado del ensamblaje de los supertetraedros. Se pueden observar cavidades de tamaño mediano (verde) y grande (rojo), accesibles a través de ventanas hexagonales (d) y pentagonales (e). Hierro. Oxígeno. Carbono.

Por tanto, se ha demostrado que la red porosa **MIL-100(Fe)** posee porosidad permanente, una elevada área superficial -con valores de superficie de BET de $2100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (superficie de Langmuir de $3100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y volúmenes de poro de 8200 y 12700 \AA^3 - y es muy estable térmicamente ($T_d = 600 \text{ K}$). Como consecuencia de estas características, se ha estudiado la aplicación del MOF **MIL-100(Fe)** en la adsorción de diferentes especies (gases, polioxometalatos (POMs), especies contaminantes o moléculas bioactivas).

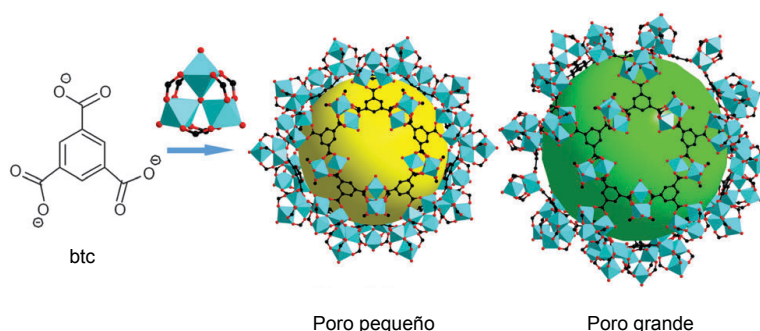


Figura 2.29. Representación del ensamblaje de ligandos *btc* y *clusters* de Fe(III) para la formación de la estructura mesoporosa **MIL-100(Fe)**. Hierro. Oxígeno. Carbono.

A pesar de que el MOF **MIL-100(Fe)** tiene aplicación en campos muy diversos tales como separación de gases, bioremediación y catálisis,^{7,8,9,10} hay que destacar su uso en el campo de la biomedicina, que es el principal objetivo de esta Tesis. En este sentido, debe destacarse que la red porosa **MIL-100(Fe)** presenta una serie de ventajas inherentes a su composición y estructura que lo hacen un candidato ideal para su aplicación como sistema portador y liberador de moléculas activas (Figura 2.30):

i) Está constituido por iones metálicos Fe(III) biológicamente compatibles y ligandos H₃btc que presentan una baja toxicidad (valor de dosis letal (LD) de 6.4 g Kg⁻¹).¹¹

ii) Puede sintetizarse fácilmente en forma de nanopartículas, con un tamaño promedio entre 60 y 150 nm, abriendo la posibilidad de desarrollar tratamientos inyectables.

iii) Estudios recientes demuestran la elevada estabilidad química y coloidal del **MIL-100(Fe)** en diferentes medios fisiológicos (PBS, condiciones intravenosas, condiciones orales, etc.) (Figura 2.31).¹²

iv) Se ha demostrado la baja toxicidad de las nanopartículas de **MIL-100(Fe)**, con valores de concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 0.70 mg mL⁻¹ en macrófagos murinos (J774) y 1.1 mg mL⁻¹ en células de tipo HeLa.¹³

v) Ensayos *in vivo* de toxicidad subcutánea en ratas con altas dosis de **MIL-100(Fe)**, confirman que se trata de un materia inocuo.^{12c}

vi) Es posible la funcionalización de su superficie, ya sea para dirigirlo de forma más efectiva hasta la diana deseada, para aumentar su tiempo de circulación o para evitar su agregación en fluidos biológicos.

vii) Se ha aplicado como agente de contraste en el diagnóstico de enfermedades por resonancia magnética nuclear (RMN). Su actividad está relacionada con su capacidad de modificar los tiempos de relajación de los

protones de las moléculas de agua que rodean a las nanopartículas de **MIL-100(Fe)** cuando se aplica un campo magnético. Los resultados muestran un tiempo de relajación r_2 de 73 y 92 $s^{-1} mM^{-1}$ para **MIL-100(Fe)** y **MIL-100(Fe)+PEG** (derivado funcionalizado con polietilenglicol), respectivamente.^{12b}

viii) Es capaz de adsorber moléculas de CO por interacción con sus centros metálicos insaturados (CUS), lo que permitiría desarrollar terapias combinadas parecidas a las expuestas en el apartado 2.2.¹⁴

ix) Su síntesis puede escalarse, produciendo más de 1700 Kg m^{-3} al día.¹⁵

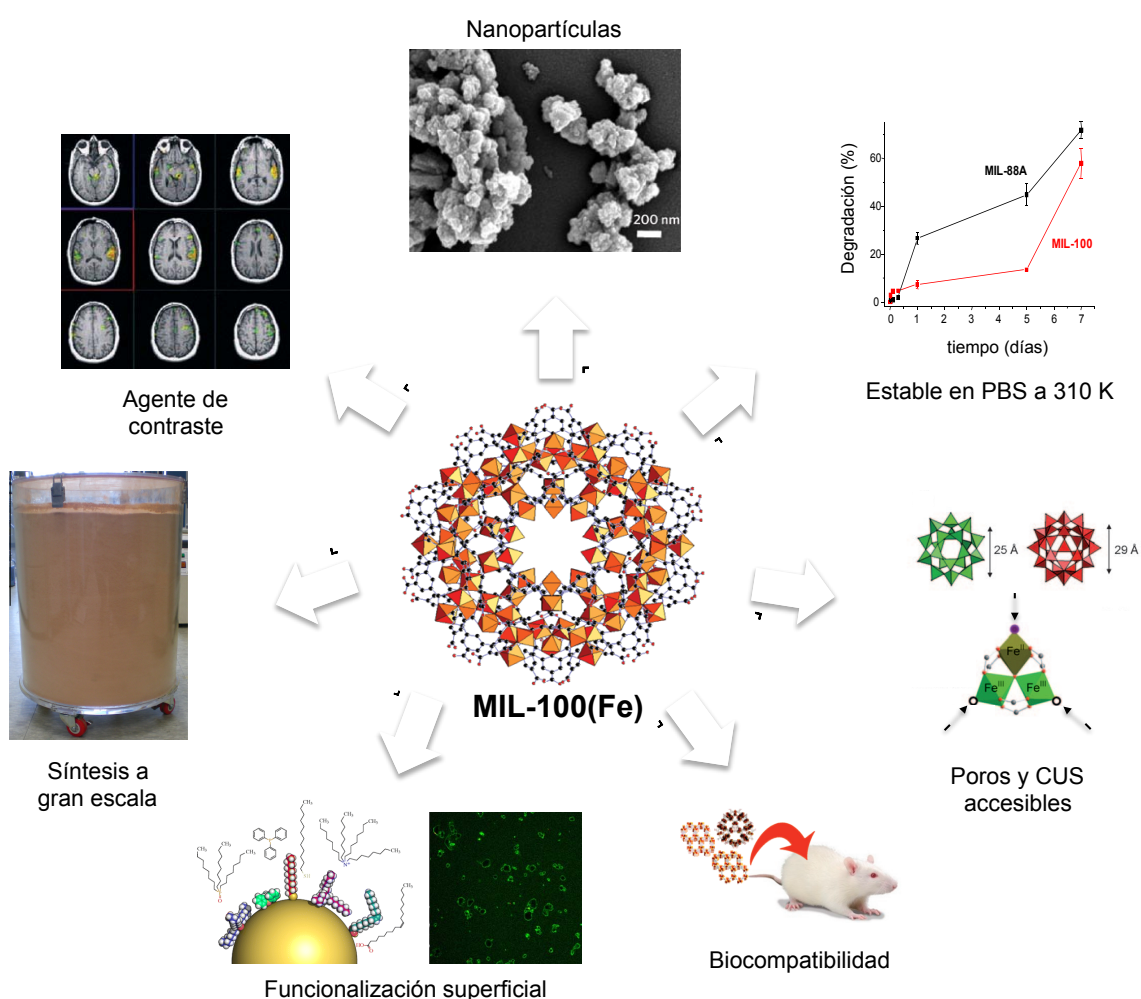


Figura 2.30. Resumen de las propiedades de la red porosa **MIL-100(Fe)** que lo hacen un candidato ideal para su aplicación como agente liberador de moléculas activas.

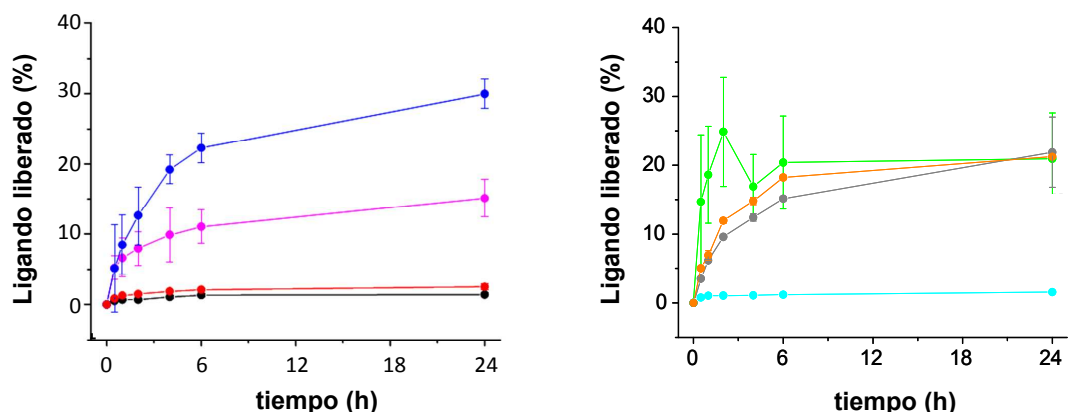


Figura 2.31. Cinética de degradación de **MIL-100(Fe)** a 310 K en función del tiempo en diferentes medios fisiológicos: agua, NaOH 0.3 mM a pH 7.4, PBS a pH 7.4, PBS+albúmina (5.4% p/v), HCl a pH 1.2, fluido intestinal simulado diluido (*lis-SIF*), *lis-SIF*+pancreatina (1% p/v) y *lis-SIF*+mucina (5% p/v). La degradación se ha representado en función del ligando liberado al medio (%).

Por todas estas características, el MOF **MIL-100(Fe)** está siendo ampliamente estudiado para la encapsulación/liberación de una gran variedad de fármacos. El primer trabajo publicado sobre su aplicación como sistema de liberación controlada, se basa en la encapsulación de cuatro fármacos antitumorales o retrovirales (busulfan (25.5%), timidina trifosfato (21.2%), doxorubicina (9.1%) y cidofovir (16.1%)) y cuatro moléculas utilizadas en cosmética (cafeína (24.2%), urea (69.2%), benzofenona 4 (15.2%) y benzofenona 3 (1.5%)). Para todas estas moléculas se consiguieron elevados porcentajes de carga (valores indicados entre paréntesis). Por otro lado, se ha demostrado que la liberación de timidina trifosfato, cidofovir y doxorubicina en tampón fosfato salino a 310 K, está controlada por la difusión de las moléculas bioactivas a través de los poros y/o por las interacciones entre la matriz y los fármacos, dando lugar a una liberación progresiva (Figura 2.32).^{12b} Posteriormente, el mismo grupo de investigación consiguió mejorar la cantidad de cafeína adsorbida en **MIL-100(Fe)**, con un porcentaje de carga de 49.5%.¹⁶

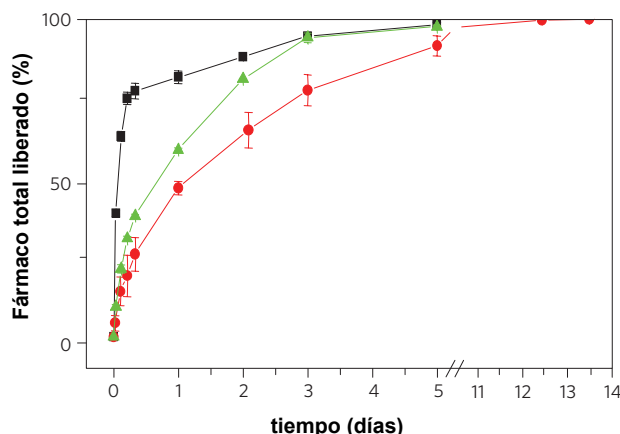


Figura 2.32. Cinética de liberación de **timidina trifosfato**, cidofovir y **doxorubicina** a partir de la matriz porosa cargada **MIL-100(Fe)** en condiciones fisiológicas (suero fosfato salino a 310 K).

Posteriormente, se estudió la citotoxicidad del MOF cargado con busulfan (**MIL-100(Fe)@busulfan**) y busulfan libre en tres líneas celulares: leucemia humana (CCRF-CEM), mieloma múltiple humano (RPMI-8226) y macrófagos murinos (J774). El estudio comparativo demostró que el compuesto activo encapsulado preserva su actividad, puesto que se obtuvieron resultados de citotoxicidad similares a los del fármaco libre. (Figura 2.33).¹⁷

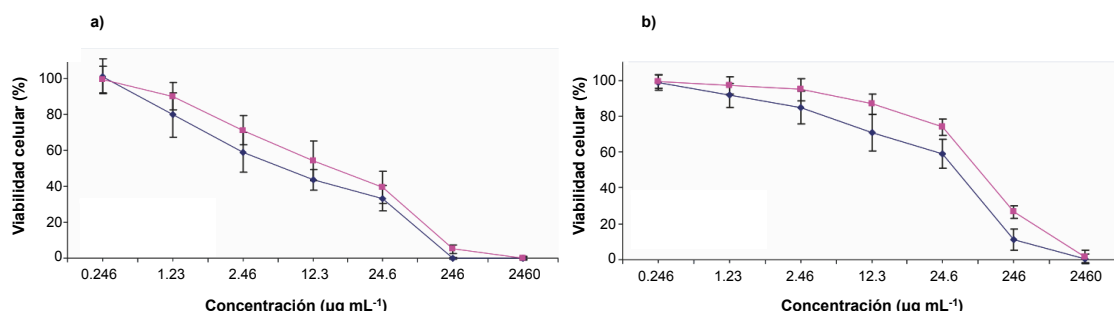


Figura 2.33. Actividad citotóxica de nanopartículas de **MIL-100(Fe)@busulfan** y **busulfan libre** en dos líneas celulares: (a) leucemia humana (CCRF-CEM) y (b) mieloma múltiple humano (RPMI-8226).

Otro estudio demuestra que ciertos fármacos incorporados en la matriz **MIL-100(Fe)** interaccionan a través de los centros metálicos de la estructura. Se ha demostrado que la capacidad de carga del **MIL-100(Fe)** frente a la azidotimidina (AZT), timidina monofosfato (AZT-MP) y timidina trifosfato (AZT-TP), así como las cinéticas de liberación, dependen del grado de fosforilación del fármaco. La interacción entre las moléculas adsorbidas y el nanoMOF está relacionada con la formación de enlaces iónico-covalentes fuertes entre los

grupos fosfato de los fármacos y los centros metálicos presentes en la estructura de las nanopartículas.¹⁸

Por último, debe destacarse que, recientemente, se ha sintetizado un análogo del MOF **MIL-100(Fe)** sustituyendo el ligando benceno-1,3,5-tricarboxilato por un ligando de mayor longitud: el benceno-1,3,5-tris(4-carboxifenil), dando lugar a la estructura **MIL-100(Fe)_BTB** con tamaños de poro mayores (55 y 68 Å) y una superficie accesible teórica de 4500 m² g⁻¹. Esta nueva estructura resulta interesante para la captura de fármacos voluminosos o para aumentar la capacidad de carga de los compuestos adsorbidos en **MIL-100(Fe)**.¹⁹

Teniendo en cuenta las ventajas que presenta la matriz porosa **MIL-100(Fe)** en aplicaciones biológicas, en esta Tesis Doctoral, se ha considerado la posible aplicación del **MIL-100(Fe)** para la liberación controlada de dos metalodrogas antitumorales no convencionales de rutenio(II) de tipo “*semi-sandwich*”: el conocido [Ru(*p*-cimeno)Cl₂(pta)], RAPTA-C (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano), y el [(η⁶-*p*-cimeno)₂Ru₂mitoxantronato]Cl₂ (**Ru_mito**), un nuevo metalofármaco sintetizado por nuestro grupo de investigación. En primer lugar, se expondrán los resultados obtenidos para la encapsulación/liberación del metalofármaco RAPTA-C en el **MIL-100(Fe)** mediante impregnación de la matriz porosa activada en una disolución saturada de RAPTA-C. Posteriormente, se describirá la síntesis de la nueva metalodroga **Ru_mito**, así como su actividad redox, su capacidad de interactuar con diferentes dianas biológicas (ADN, aminoácidos, catepsinas B y D) y su citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares tumorales. Por último, se describirá la encapsulación de **Ru_mito** en la red porosa **MIL-100(Fe)** mediante la estrategia del “barco en la botella”, así como la posterior liberación de dicha metalodroga no convencional en fluido corporal simulado.

Discusión y resultados

La red metalorgánica **MIL-100(Fe)** ha sido preparada siguiendo el método descrito en bibliografía.¹⁵ En la síntesis típica para la obtención de **MIL-**

100(Fe) se utilizó una mezcla basada en hierro metálico (1.0), ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (ácido trimésico) (H_3btc) (0.67) y HF (2.0), en HNO_3 (0.6) y H_2O (277) (proporción estequiométrica expresada entre paréntesis). Esta mezcla se hizo reaccionar en condiciones hidrotermales a 433 K durante 8 horas. Trascurrido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró y se obtuvo un sólido cristalino de color naranja **MIL-100(Fe)**. Con el fin de eliminar el posible ligando orgánico excedente de la reacción, el compuesto sintetizado se purificó mediante un proceso de extracción en dos pasos, utilizando agua y etanol. Para ello, en primer lugar el **MIL-100(Fe)** se suspendió con agitación en agua destilada a 343 K durante 3 horas y, posteriormente, se agitó en etanol a 338 K durante 3 horas. Mediante estas extracciones se consigue eliminar el ligando libre presente en los poros, por lo que se obtiene un producto más puro y con una porosidad mayor. El análisis posterior del material obtenido mediante difracción de rayos X en polvo y análisis elemental, demostró que se trataba de la fase pura **MIL-100(Fe)** $[Fe_3F(H_2O)_2O(C_6H_3(CO_2)_3)]_2 \cdot nH_2O$ ($n \sim 14.5$) publicada por Horcajada y sus colaboradores (para más detalles experimentales véase el Anexo A).

Posteriormente, se procedió a activar la matriz porosa eliminando las moléculas de disolvente ocluidas en los poros de la matriz y coordinadas a los centros metálicos. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento térmico calentando a 473 K en vacío dinámico (10^{-6} bar) durante 7 h. Como se mencionó anteriormente, dicho proceso de activación no provoca la destrucción de la conectividad de la red y, gracias a él, se consiguen grandes cavidades, de 2.5 y 2.9 nm de diámetro, accesibles para la adsorción de **RAPTA-C** o **Ru_mito**.

2.3.1 Incorporación de RAPTA-C

Con el objetivo de evaluar la aplicación de **MIL-100(Fe)** en la encapsulación y liberación de RAPTA-C, se realizaron estudios de adsorción/desorción del metalofármaco en la red porosa a temperatura controlada. Para ello, la matriz porosa activada se suspendió con agitación en una disolución de RAPTA-C (0.086 M) en etanol absoluto, hasta alcanzar el equilibrio de adsorción (4 horas). Finalmente, la suspensión se filtró y se obtuvo

la matriz porosa cargada **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**. Los resultados obtenidos mediante UV-vis, análisis elemental y reflectancia total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR) demuestran que mediante este método se consigue una carga de 0.8 mmol de RAPTA-C por mmol de **MIL-100(Fe)** (0.42 gramos de RAPTA-C por gramo de **MIL-100(Fe)**).

La incorporación de RAPTA-C en las cavidades de **MIL-100(Fe)** se pone de manifiesto por: *i)* la drástica disminución de su capacidad de adsorción de N₂ a 77 K, efectivamente la superficie de BET disminuye desde 1657 m² g⁻¹ para el material original hasta 497 m² g⁻¹ tras la carga con RAPTA-C (Figura 2.34a); *ii)* la presencia de algunos picos característicos de RAPTA-C en el IR del MOF cargado **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** (Figura 2.34b); y *iii)* la mayor estabilidad térmica de la matriz porosa cargada en comparación con el MOF original (Figura 2.34c). Además, debe destacarse que la integridad estructural de la red se mantiene después de la incorporación de RAPTA-C, tal y como se aprecia en el difractograma de rayos X en polvo medido después de la incorporación del metalofármaco. Es de destacar que existe una porosidad remanente, ya que el sólido **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** todavía puede adsorber cierta cantidad de N₂. Sin embargo, diversas pruebas realizadas para aumentar la cantidad de RAPTA-C adsorbida en el **MIL-100(Fe)** no han conducido a una mejora en la capacidad de carga del metalofármaco.

Por otro lado, el tamaño nanométrico de las partículas de **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**, así como la presencia de RAPTA-C en sus cavidades también se confirmó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución (*High Resolution Transmission Electron Microscopy*, HR-TEM) y el análisis químico puntual por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (*Energy-dispersive X-ray Spectroscopy*, EDX), respectivamente. En primer lugar, el recuento manual de 200 partículas y el posterior tratamiento estadístico permitió conocer el tamaño promedio de partícula de 134 ± 70 nm, coincidiendo con resultados previamente publicados.¹⁷ Por otra parte, el análisis EDX confirmó la presencia de rutenio y fósforo en **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**, elementos que se encuentran en el metalofármaco (Figura 2.35).

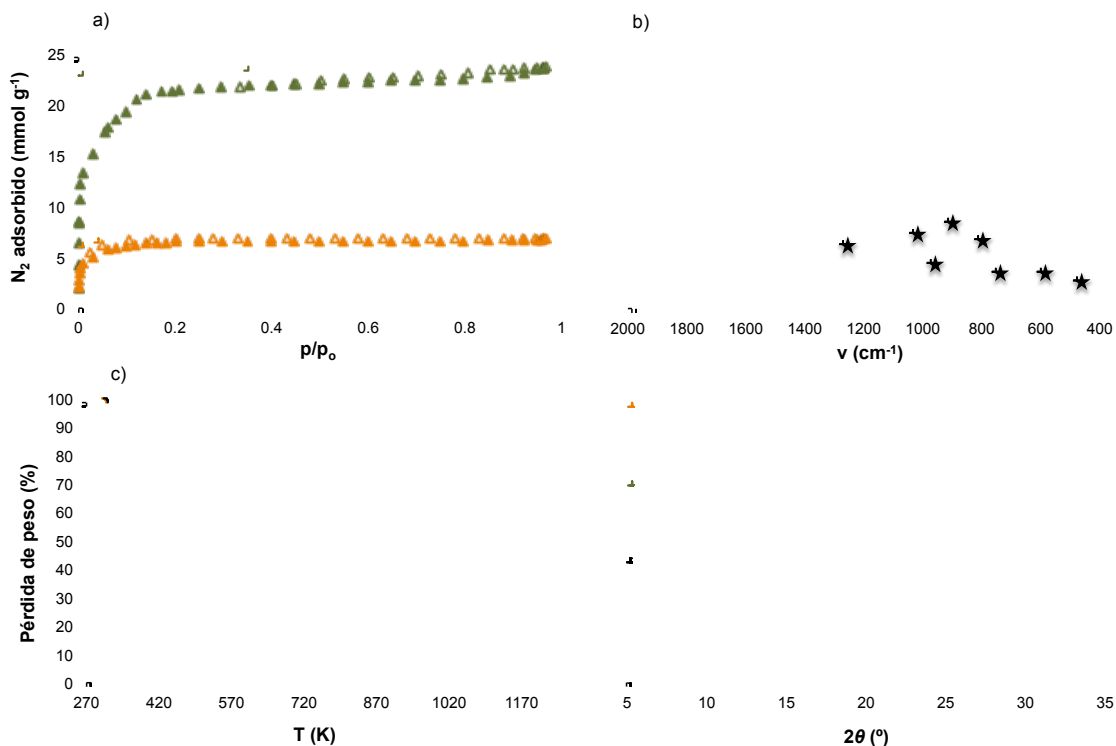


Figura 2.34. (a) Isothermas de adsorción de N₂ a 77 K; (b) espectros IR; (c) curvas de análisis termogravimétrico y (d) difractogramas de RX en polvo para los compuestos MIL-100(Fe), MIL-100(Fe)@RAPTA-C y RAPTA-C. La desorción se denota con símbolos vacíos.

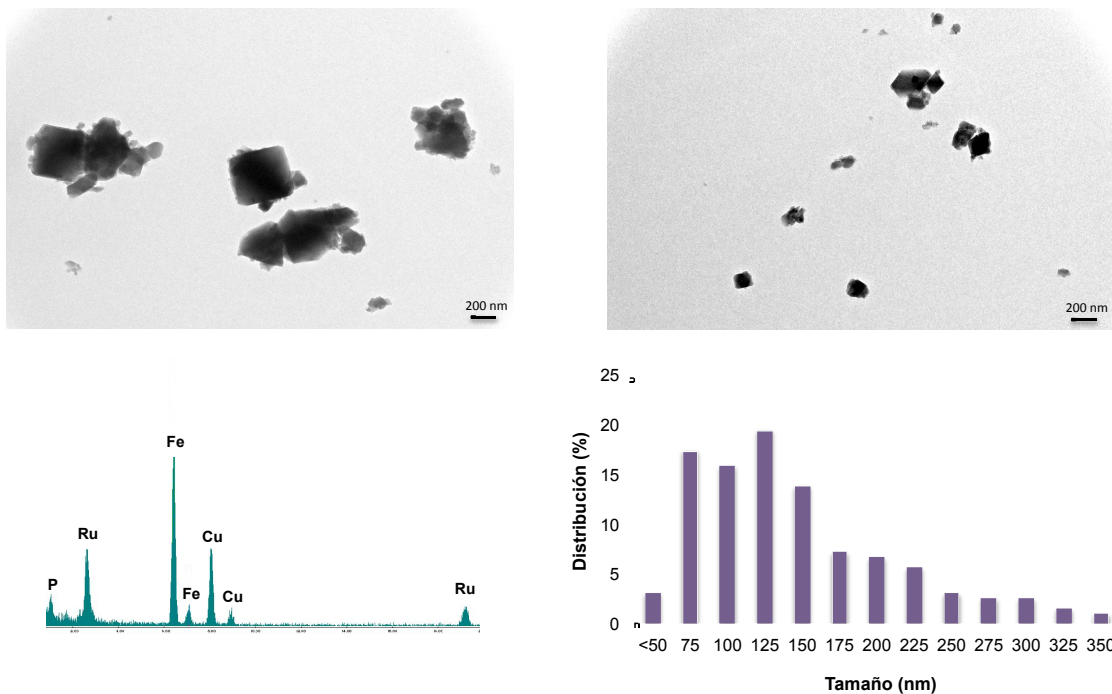


Figura 2.35. Arriba: Imágenes de HR-TEM para la muestra MIL-100(Fe)@RAPTA-C. Abajo: Resultado de los análisis cualitativos EDX e histograma de distribución de tamaño. Los análisis cualitativos EDX llevados a cabo en diferentes zonas de la muestra, confirman la presencia de rutenio y fósforo en la matriz MIL-100(Fe)@RAPTA-C.

Una vez que se logró la incorporación del metalofármaco RAPTA-C en la estructura porosa **MIL-100(Fe)**, se estudió la capacidad de la especie cargada **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** para liberar RAPTA-C en fluido corporal simulado (FCS) a 310 K con el propósito de considerar su posible aplicación como agente para la liberación controlada de este metalofármaco. Concretamente, se determinó la cinética de liberación de RAPTA-C midiendo la cantidad de metalofármaco liberado a la disolución sobrenadante de FCS a diferentes tiempos mediante UV-vis. Los resultados obtenidos a volumen constante (40 mL) de FCS muestran que la liberación de RAPTA-C se produce de forma escalonada en dos etapas (Figura 2.36). En este sentido, una posible explicación podría estar relacionada con la localización de las moléculas de RAPTA-C en las cavidades de la matriz, dando lugar a diferentes tipos de interacción entre el adsorbato y la matriz porosa. Dependiendo del tamaño de los poros, el fármaco puede situarse cercano a las paredes de las cavidades. En esta situación, se producirían interacciones adsorbato-adsorbente controladas por el apilamiento del anillo aromático del grupo cimeno (RAPTA-C) y el ligando orgánico presente en la estructura del **MIL-100(Fe)**. Una vez que las paredes del poro se encuentran saturadas, las moléculas adicionales de RAPTA-C ocupan el espacio libre de las cavidades. Por lo tanto, la liberación inicial de RAPTA-C puede estar relacionada con moléculas débilmente adsorbidas (primer escalón), mientras que las moléculas de metalofármaco cercanas a las paredes de los poros más fuertemente retenidas se liberarían más lentamente (segundo escalón). Estos resultados coinciden con los publicados para la liberación de ibuprofeno por parte de la matriz porosa **MIL-100(Cr)**.² Los datos de desorción en la primera hora se pueden ajustar a una cinética de primer orden, de acuerdo con la ecuación [2.2]. Este ajuste da como resultado un valor de k de 0.35 h^{-1} , que corresponde con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de liberación del metalofármaco de 2 horas. Desafortunadamente, aunque los datos indican la liberación paulatina del metalofármaco durante el segundo proceso de desorción, la baja calidad de los datos (debido a la turbidez de la suspensión resultante) no permite estimar un valor de la cinética de liberación.

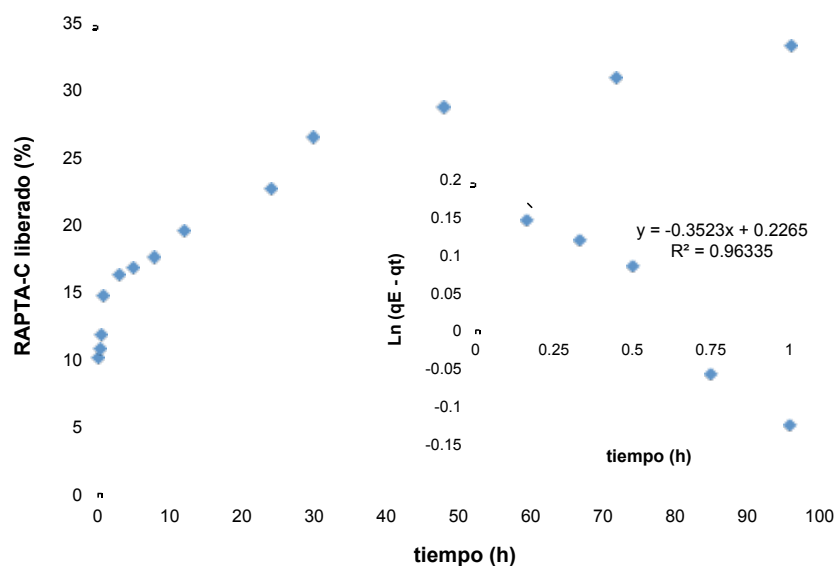


Figura 2.36. Proceso de desorción de RAPTA-C a partir de 20 mg de **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** en 40 mL de fluido corporal simulado a 310 K. En la gráfica insertada, se representa el ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

2.3.2 “El barco en la botella” para la incorporación de $[(\eta^6\text{-p-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$

Como ya se ha explicado en la introducción, los compuestos “*semi-sandwich*” de rutenio tienen un mecanismo de acción frente a células cancerígenas diferente del *cisplatin*. Esto se debe a que los compuestos de rutenio son capaces de inhibir enzimas sobreexpresadas en tumores (ej. catepsinas)²⁰ o interferir en procesos biológicos redox.²¹ Por otro lado, las terapias contra el cáncer actuales no se basan en el uso de un único compuesto activo, sino que normalmente utilizan una mezcla de fármacos con el fin de conseguir la máxima efectividad. Por ejemplo, las moléculas puramente orgánicas, como las antraciclinas, naturales o sintéticas, normalmente se utilizan combinadas con fármacos de platino.²² La actividad citotóxica de las antraciclinas se basa en su capacidad para interaccionar de forma no covalente con el ADN, mediante intercalación entre las bases de la doble hélice, induciendo cambios conformacionales importantes.²³ Dentro de la familia de las antraciclinas, debe destacarse el derivado de la antraquinona, mitoxantrona. Este compuesto antineoplásico presenta una menor cardiotoxicidad que sus análogos daunomicina y adriamicina,²⁴ y es activo

frente a cáncer de mama avanzado, cáncer de pulmón de células grandes y linfoma no Hodgkin.²⁵

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, en esta Tesis Doctoral, se decidió combinar la actividad de los sistemas “*semi-sandwich*” de Ru(II) con la citotoxicidad de la antraquinona mitoxantrona para conseguir un compuesto con una función dual, es decir, que tenga capacidad de intercalarse en el ADN e inhibir la actividad de las proteasas. Con este fin, se aisló el nuevo metalofármaco $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). A continuación, se estudió la encapsulación de dicho metalofármaco en la matriz porosa **MIL-100(Fe)** como prueba de concepto del potencial uso de los MOFs en la liberación de metalofármacos no convencionales contra el cáncer.

En primer lugar, para la obtención del compuesto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**) se disolvieron el fármaco comercial clorhidrato de mitoxantrona ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{HCl}$) con un equivalente de $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ en EtOH a 298 K y se agitó durante 2 horas. La mezcla se dejó evaporar hasta sequedad, y se obtuvo un precipitado verde. El sólido se extrajo con CH_2Cl_2 , y mediante la adición de n-hexano se consiguió precipitar el producto final $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**) de color verde oscuro (para más detalles experimentales véase Anexo A). Mediante el estudio de los datos de difracción de rayos X en monocristal se pudo determinar la formación del complejo dinuclear **Ru_mito**, que cristaliza en el grupo espacial $P2_1/c$ del sistema monoclinico ($a = 20.953$, $b = 15.440$, $c = 29.153$ Å, $V = 9370$ Å³, $Z = 8$, $\delta = 1.476$ g cm⁻³). Una perspectiva de la estructura se muestra en la Figura 2.37. En dicha figura, se observa que el anión mitoxantronato está coordinado a dos unidades de Ru(cimeno) actuando como puente *N,N,O,N',N',O'-exo*-hexadentado. Hay que destacar que las dos unidades Ru(cimeno) se encuentran situadas por encima del plano formado por el sistema aromático policíclico.

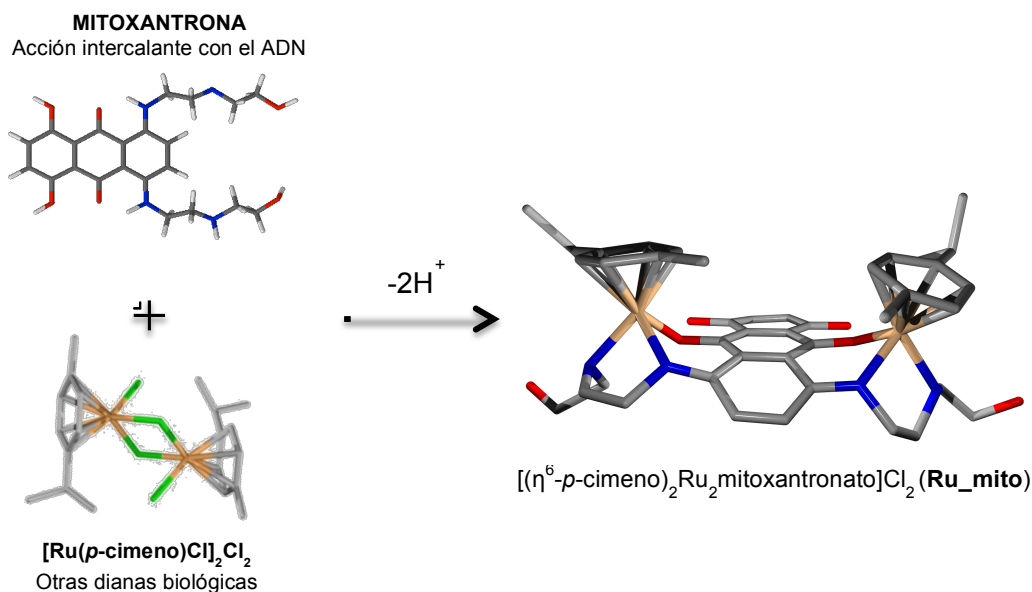


Figura 2.37. Representación esquemática de la reacción entre la mitoxantrona y el compuesto de rutenio de tipo areno [Ru(*p*-cimeno)Cl]₂Cl₂ para la obtención de [(η^6 -*p*-cimeno)₂Ru₂mitoxantronato]Cl₂ (**Ru_mito**). La estructura de **Ru_mito** ha sido resuelta a partir de los datos de difracción de rayos X en monocristal. Carbono. Nitrógeno. Oxígeno. Rutenio. Cloro.

El **Ru_mito** también se caracterizó mediante espectroscopía ¹H RMN. El espectro ¹H RMN en MeOD muestra la presencia de una única especie en disolución, con una simetría molecular análoga a la observada en estado sólido. Asimismo, el estudio comparativo entre el espectro de resonancia magnética nuclear (¹H RMN) del **Ru_mito** y de la mitoxantrona libre, muestra un desdoblamiento de las señales correspondientes a los protones CH₂ de la cadena lateral de la mitoxantrona al unirse a los grupos Ru(cimeno) (Figura 2.38). Esto pone de manifiesto la pérdida de simetría de las cadenas laterales de la mitoxantrona, confirmando su coordinación con los átomos de rutenio. La asignación exacta de las señales de RMN para **Ru_mito** se ha realizado mediante espectroscopía COSY heteronuclear (denominada frecuentemente HETCOR, *Heteronuclear Correlation*). La integración de las señales de ¹H correspondientes al sistema mitoxantronato y al grupo cimeno está de acuerdo con la naturaleza dinuclear de **Ru_mito**. Por otro lado, el espectro de masas obtenido mediante ionización por electroespray (Electrospray ionization, ESI-MI) confirma la formación de **Ru_mito**. La señal situada en un valor máximo de

m/z de 948.1844 (100%) corresponde con la especie catiónica $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}^+$ (Figura 2.39).

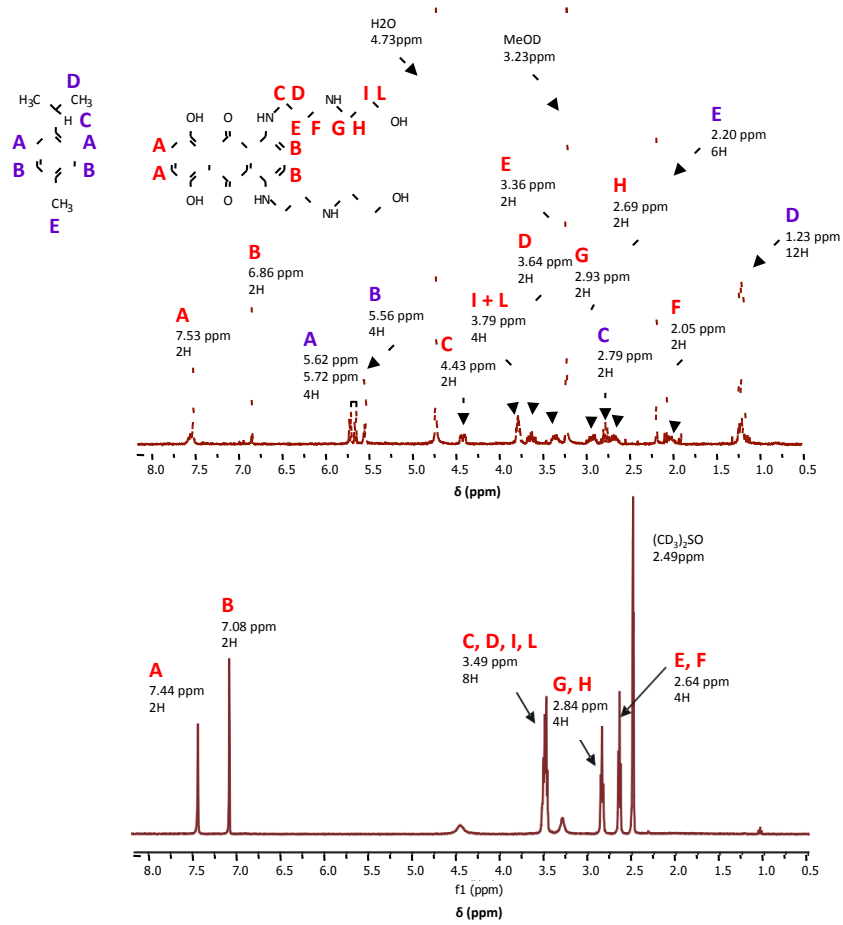


Figura 2.38. Espectro de ^1H RMN de Ru_mito (arriba) (MeOD , 400 MHz) y de la mitoxantrona libre (abajo) (DMSO-d_6 , 400 MHz).

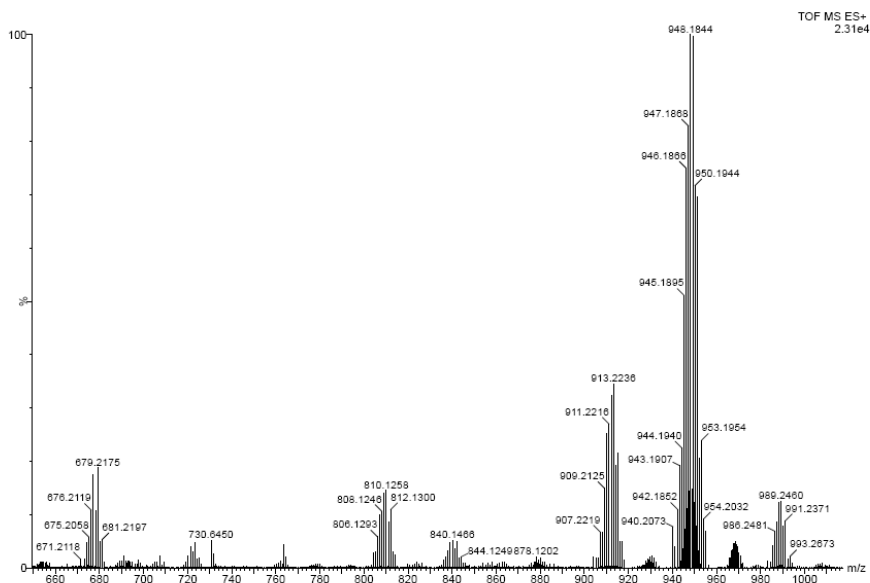


Figura 2.39. El espectro ESI-MS del Ru_mito muestra un pico intenso a $m/z = 948.1844$ que corresponde con la especie catiónica $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}^+$.

Por otro lado, se ha estudiado la solubilidad del **Ru_mito** en diferentes disolventes. Los resultados muestran que el compuesto **Ru_mito** es soluble tanto en disolventes polares (H_2O , MeOH, EtOH, CH_3CN , $(CH_3)_2O$ y DMF) como en disolventes apolares o poco polares (CH_2Cl_2 y $CHCl_3$). El carácter dual de **Ru_mito** se debe a la presencia de grupos polares (O, OH y NH) y residuos apolares (cimeno) en el sistema. Estos resultados son interesantes puesto que ponen de manifiesto que la especie **Ru_mito** puede disolverse fácilmente en fluidos corporales, y así penetrar fácilmente en las células tumorales.

En base a estos resultados, se estudió la posible interacción de **Ru_mito** con biomoléculas importantes en procesos cancerígenos (catepsinas), así como su actividad redox y su actividad citotóxica.

En primer lugar, teniendo en cuenta la capacidad de la mitoxantrona para intercalarse en la doble hélice del ADN, se ha estudiado el posible efecto de la presencia de los grupos Ru(cimeno) coordinados, en su capacidad para interaccionar con la estructura de ADN. Estos estudios se han realizado utilizando diferentes métodos biofísicos, como dicroísmo circular (CD) y ensayos de interacción competitiva con bromuro de etidio. Estos ensayos se realizaron tanto para el metalofármaco **Ru_mito** como para la mitoxantrona libre. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de grupos Ru(cimeno) coordinados al ligando mitoxantronato en el **Ru_mito**, no afecta significativamente a la capacidad de intercalación del fragmento de mitoxantronato en el ADN. De hecho, los ensayos de competición con bromuro de etidio intercalado en el ADN muestran que la constante de unión al ADN disminuye ligeramente desde $2.85 \cdot 10^7 M^{-1}$ para la mitoxantrona libre, hasta $2.18 \cdot 10^6 M^{-1}$ para el metalofármaco **Ru_mito** (Figura 2.40a). Asimismo, las medidas de dicroísmo circular confirman que el metalofármaco **Ru_mito** interacciona con el ADN por intercalación, tal y como se puede apreciar en la disminución de la elipticidad de las curvas, tanto para la mitoxantrona como para el metalofármaco **Ru_mito** (Figura 2.40b).

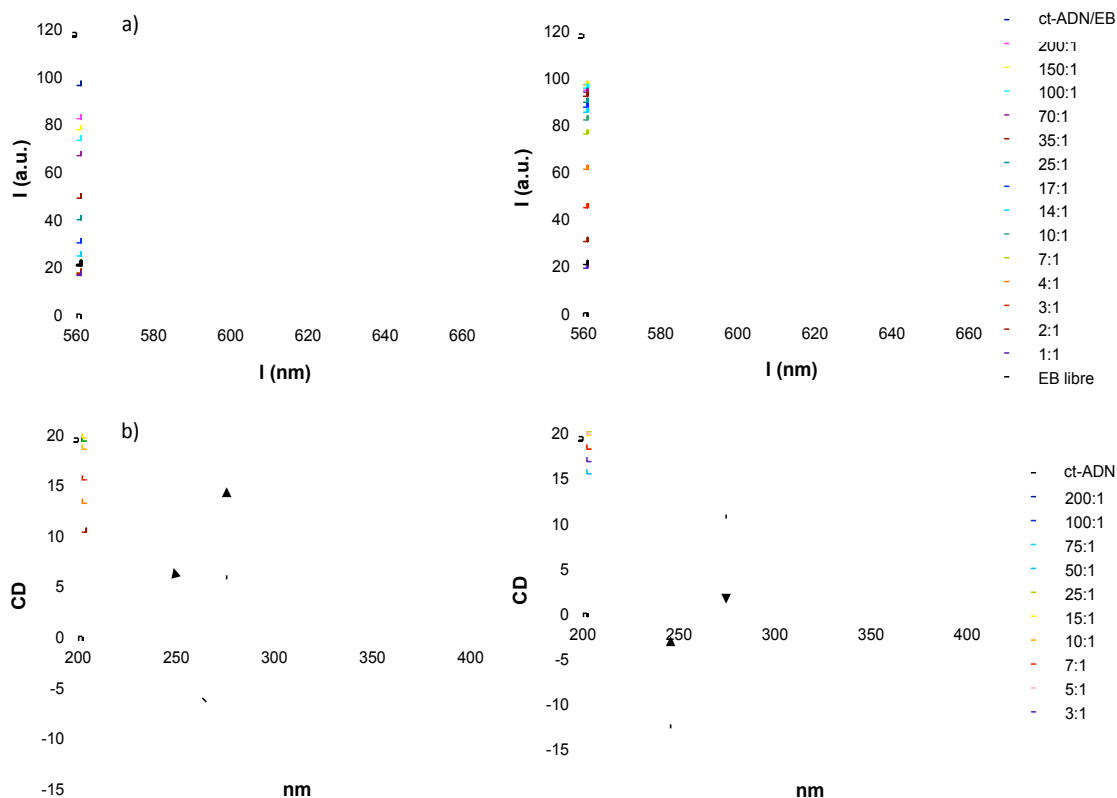


Figura 2.40. (a) Espectros de fluorescencia para bromuro de etidio ($5 \mu\text{M}$) y *ct*-ADN ($4 \mu\text{M}$) en presencia de cantidades crecientes de mitoxantrona (derecha) y **Ru_mito** (izquierda) en un tampón de cacodilato de sodio y NaCl 20 mM. (b) Espectro de dicroísmo circular para *ct*-ADN libre ($170 \mu\text{M}$) y en presencia de cantidades crecientes de mitoxantrona (derecha) y **Ru_mito** (izquierda). Relaciones *ct*-ADN:fármaco indicadas en la figura.

A continuación, se estudió la posible interacción entre el **Ru_mito** y otras dianas biológicas importantes diferentes al ADN, como aminoácidos y proteasas. En primer lugar, se estudió la evolución de las reacciones entre el metalofármaco **Ru_mito** y algunos aminoácidos durante 24 horas mediante técnicas espectroscópicas de ^1H RMN. Los estudios de ^1H RMN en diferentes medios (MeOD, 310 K; DMSO- d_6 , 310 K) ponen de manifiesto la interacción entre el **Ru_mito** y aminoácidos S dadores (cisteína y glutatión) y N dadores (histidina). De hecho, los espectros de ^1H RMN muestran que la interacción entre el complejo **Ru_mito** y el correspondiente aminoácido ocurre rápidamente (< 4 horas), con la inherente liberación de mitoxantrona (Figura 2.41). Estos resultados coinciden con los obtenidos para otros sistemas de rutenio de tipo “*semi-sandwich*” para los que se ha demostrado su capacidad de coordinación con aminoácidos.²⁶

Capítulo: 2

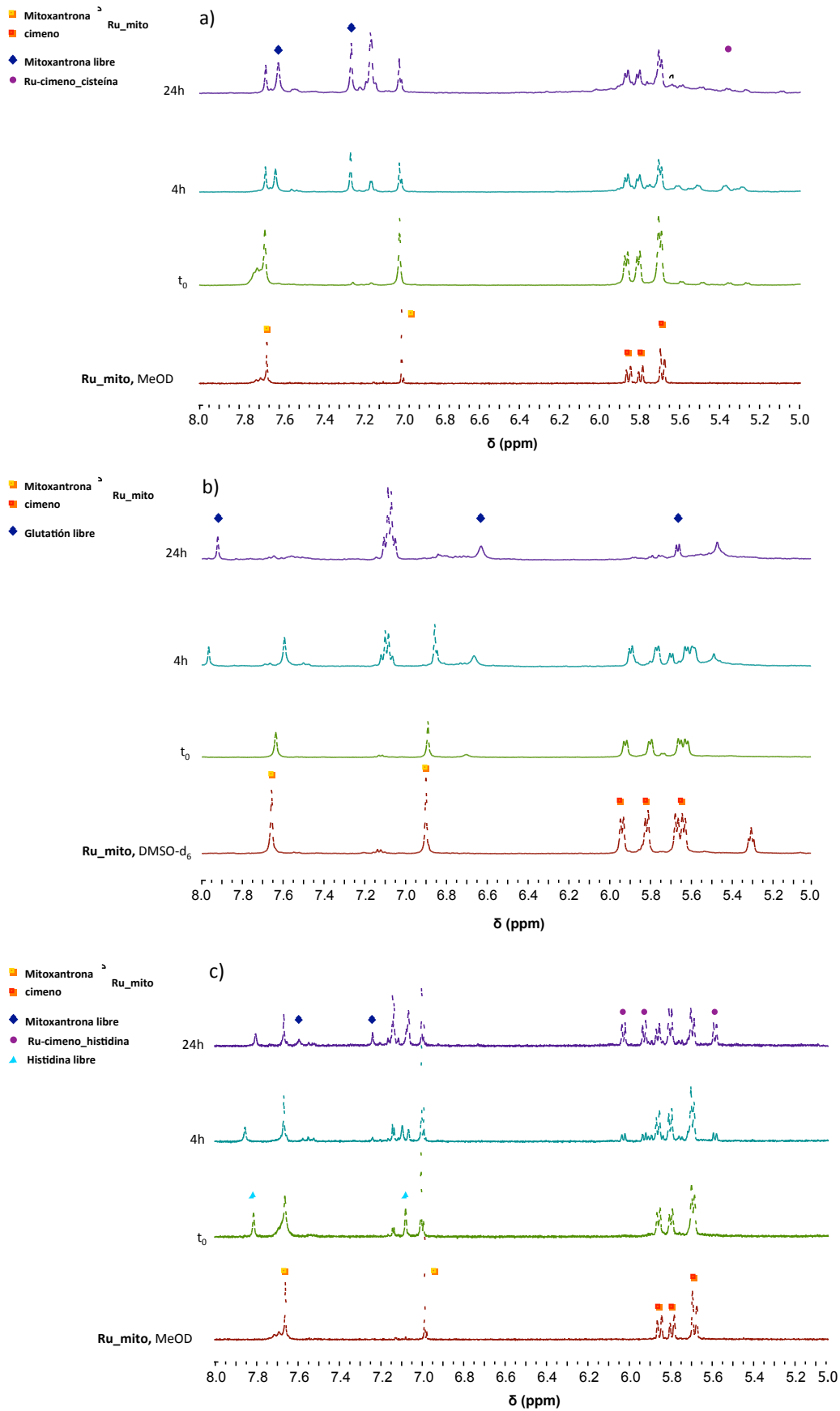


Figura 2.41. Espectros de ^1H RMN, durante 24 horas, de la interacción de Ru_mito con los aminoácidos N y S dadores cisteína (a), glutatión (b) e histidina (c).

Asimismo, el **Ru_mito** ha demostrado una alta capacidad de interacción con proteasas (catepsina B y D), inhibiendo su actividad enzimática. Estudios de espectroscopía de UV-vis han demostrado que una disolución de **Ru_mito** (20 μM) es capaz de inhibir completamente la actividad de la catepsina D (Figura 2.42). Por otro lado, también se ha demostrado que **Ru_mito** puede inhibir la actividad de la catepsina B con un valor de IC_{50} de 1.5 μM (Figura 2.42), que es inferior al publicado para el metalofármaco RAPTAC ($\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$) y para otros tipos de metalofármacos basados en rutenio.²⁷ Debe destacarse que la mitoxantrona libre (200 μM) no es capaz de inhibir la actividad de las catepsinas B y D, lo que indica que la actividad inhibitoria de **Ru_mito** está relacionada con la capacidad del rutenio para unirse a los aminoácidos que conforman la estructura de las catepsinas. Estos resultados resultan interesantes ya que estas enzimas, junto a otras cisteína-proteasas, se encuentran sobreexpresadas en diversas líneas celulares cancerígenas.²⁰

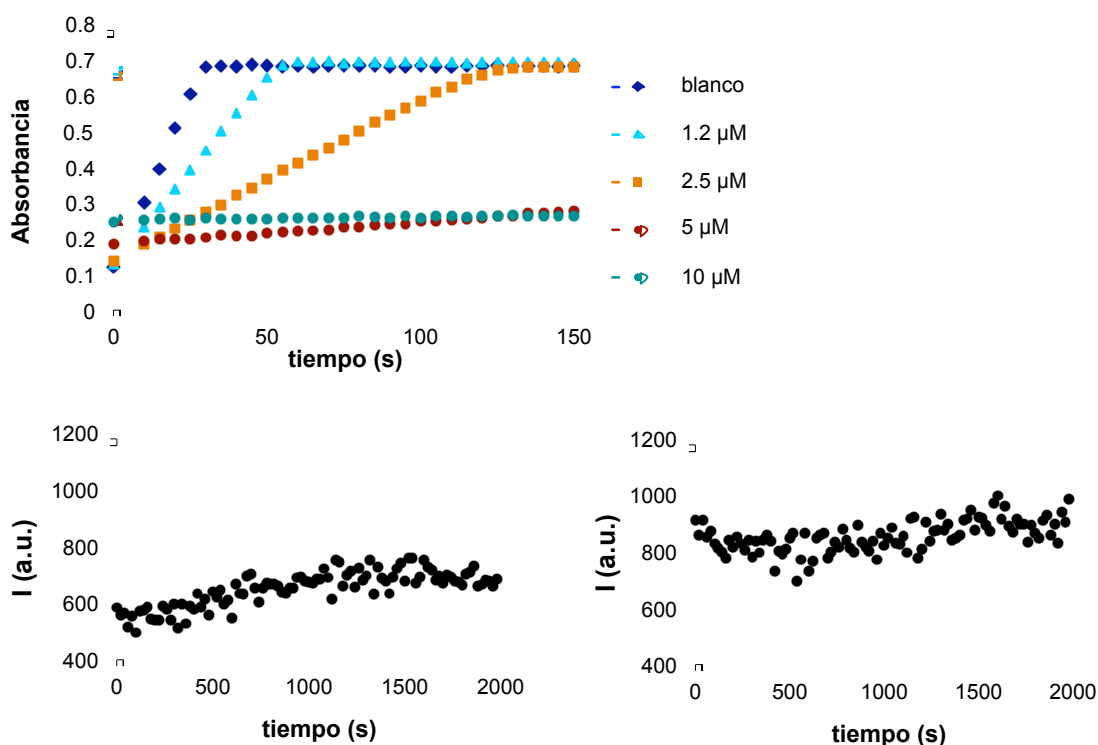


Figura 2.42. Arriba: ensayo de inhibición de la actividad de la catepsina B en función de la concentración de **Ru_mito**. Abajo: ensayo enzimático para la catepsina D con mitoxantrona (200 μM) (izquierda) y **Ru_mito** (20 μM) (derecha).

Como ya se ha comentado, la actividad biológica de los metalofármacos de rutenio también está relacionada con su participación en procesos

biológicos redox.²⁷ En este contexto, con el objetivo de estudiar las propiedades electroquímicas del nuevo metalofármaco se realizaron estudios de voltametría cíclica del **Ru_mito**, así como de los precursores mitoxantrona y $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ (Figura 2.43). La voltametría cíclica para el nuevo metalofármaco **Ru_mito** muestra un cambio en la curva de oxidación de la mitoxantrona hacia potenciales mayores ($\Delta E = +0.12$ V). Estos resultados demuestran que el sistema mitoxantronato de **Ru_mito** se oxida con mayor dificultad, lo que está de acuerdo con la naturaleza electrón aceptora de los centros metálicos de rutenio a los que está unido. El primer pico anódico corresponde a la transferencia parcial reversible de $1e^-$ (en comparación con el proceso oxidativo ferroceno/ferrocinio $1e^-$ (Fc/Fc^+)) al grupo OH situado en la posición 1 del fragmento antraceno. El segundo pico corresponde a una transferencia irreversible, y se atribuye a la oxidación del segundo grupo OH del grupo mitoxantronato. En cuanto al proceso de reducción del **Ru_mito**, en primer lugar, se observa un pico irreversible que puede atribuirse a la reducción del sistema mitoxantronato. El segundo pico, también irreversible, muestra el proceso correspondiente a la reducción simultánea de los dos átomos de rutenio ($\text{Ru}^{2+} \rightarrow \text{Ru}^+$). El último proceso de reducción sucede a potenciales más negativos ($E = -1.50$ V) que para el complejo precursor $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ ($E = -1.12$ V). En este caso, el sistema mitoxantronato ya ha acomodado un electrón y, consecuentemente, el posterior proceso de reducción es menos favorable. Como conclusión, debe destacarse que la actividad redox biológicamente relevante de **Ru_mito** está centrada en el fragmento antraceno, ya que es en este sistema donde tienen lugar los procesos de oxidación-reducción más accesibles.

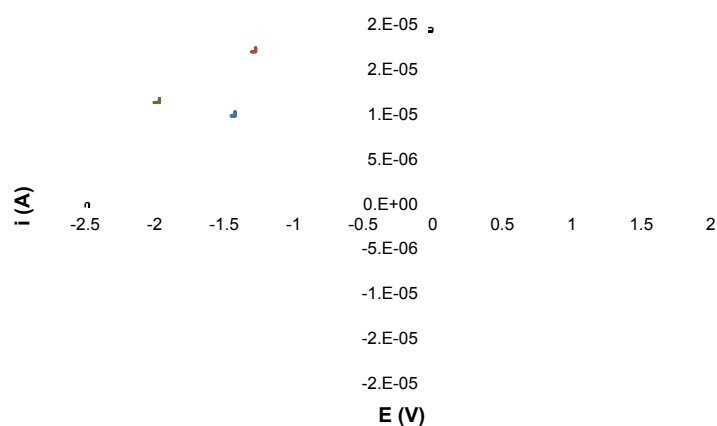


Figura 2.43. Voltametría cíclica de **Ru_mito**, mitoxantrona y $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$.

Finalmente, la capacidad del **Ru_mito** para intercalarse en la doble hélice de ADN y para inhibir la actividad enzimática de ciertas proteasas hacen pensar en una potencial actividad antitumoral de dicha metalodroga. Por ello, se decidió estudiar la actividad citotóxica *in vitro* del **Ru_mito** frente a diversas líneas celulares. Para este estudio se utilizaron cuatro líneas celulares cancerígenas humanas estrógeno dependientes que sobreexpresan diversos tipos de catepsinas (tumor ovárico (A2780) y tumor ovárico resistente al cisplatino (A2780*cis*),²⁸ cáncer de mama (MCF-7)²⁹ y leucemia promielocítica (HL-60)).³⁰ Además, se estudió la toxicidad del **Ru_mito** en la línea celular de riñón sano (LLC-PK1) con el fin de evaluar la nefrotoxicidad y selectividad de este compuesto frente a células cancerígenas. Los resultados se resumen en la tabla 2.1, donde se puede apreciar que tras 24 horas de cultivo, el metalofármaco **Ru_mito** presenta una importante actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares tumorales ensayadas, incluso frente a la línea celular resistente al cisplatino. El compuesto **Ru_mito** presenta valores de IC₅₀ (concentración media inhibitoria) por debajo de los obtenidos para cisplatino en tres de las cuatro líneas celulares ensayadas, así como un factor de resistencia menor (RF: valor de IC₅₀ para la línea celular resistente al cisplatino/valor de IC₅₀ para la línea celular sensible al cisplatino). Estos resultados ponen de manifiesto la gran efectividad de **Ru_mito** frente a estos tipos de células tumorales. Sin embargo, el nuevo metalofármaco **Ru_mito** presenta una actividad citotóxica *in vitro* ligeramente más baja que la mitoxantrona libre en todas las líneas celulares estudiadas, aunque presenta un factor de resistencia más bajo. Es importante destacar que el **Ru_mito** muestra una menor citotoxicidad que la mitoxantrona libre frente a células sanas de riñón, lo que se considera un factor favorable puesto que conllevaría una mayor efectividad del tratamiento y menos efectos secundarios. Podemos concluir que las diferencias observadas en la actividad *in vitro* de **Ru_mito** en comparación con la mitoxantrona libre están relacionadas con la disminución de su capacidad intercalante con el ADN, posiblemente por la presencia de grupos Ru(cimeno) y/o debido a la liberación lenta de mitoxantrona como consecuencia de la degradación del **Ru_mito** en medio fisiológico. Asimismo, debe destacarse que la capacidad del **Ru_mito** para inhibir la actividad enzimática de las catepsinas B y D, su actividad redox y la liberación lenta de la mitoxantrona pueden dar

lugar a un mecanismo de acción con múltiples dianas (terapia combinada), diferente a la mitoxantrona aislada, lo que supondría un aumento de la selectividad de los tratamientos contra el cáncer.

	Mitoxantrona	Ru_mito	Cisplatino (control)
MCF-7	0.011(1) μ M	28 (\pm 4) ^a %	15(1) μ M
A2780	0.043(1) μ M	0.58(1) μ M	0.91(5) μ M
A2780cis	0.032(2) μ M	0.25(1) μ M	7.37(53) μ M
RF	0.74	0.43	8.10
HL-60	0.16(1) μ M	1.94(2) μ M	8.18(19) μ M
LLC-PK1	21 (\pm 5) ^a %	15 (\pm 4) ^a %	12(1) ^a μ M

Tabla 2.1. Valores de IC₅₀ (concentración media inhibitoria, en μ M) para las líneas celulares cancerígenas de tumor de ovario (A2780), tumor de ovario resistente al cisplatino (A2780cis), cáncer de mama (MCF-7) y leucemia promielocítica (HL-60), y para la línea celular de riñón sano (LLC-PK1). Factor de resistencia (RF = valor de IC₅₀ para la línea celular resistente al cisplatino/valor de IC₅₀ para la línea celular sensible al cisplatino).

^a Valores de inhibición de crecimiento (%) utilizando una concentración de fármaco de 100 μ M.

Teniendo en cuenta la interesante actividad antitumoral de **Ru_mito**, nos propusimos estudiar su posible incorporación en la red mesoporosa **MIL-100(Fe)**. En primer lugar, se probó la encapsulación del metalofármaco suspendiendo la red porosa activada en disoluciones saturadas de **Ru_mito** utilizando diferentes disolventes orgánicos (acetona, etanol, etc.). Sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados, probablemente debido al pequeño tamaño de las ventanas de las cavidades (0.86 nm x 0.86 nm) que no permiten la incorporación de dicha metalodroga voluminosa a la matriz porosa por difusión. Con el fin de superar esta dificultad, se ha seguido la estrategia del “barco en la botella”, sintetizando directamente el compuesto **Ru_mito** en el interior de las cavidades de **MIL-100(Fe)** (Figura 2.44). Así, se llevó a cabo una encapsulación en tres pasos: *i*) en primer lugar, la matriz porosa activada **MIL-100(Fe)** se molturó en una disolución saturada de [Ru(H₂O)₃Cl₃] en acetona, lo que condujo a su rápida incorporación; *ii*) posteriormente, la matriz cargada con [Ru(H₂O)₃Cl₃] se hizo reaccionar con α -terpineno en EtOH a reflujo durante 24 horas, para formar el complejo dinuclear [Ru(*p*-cimeno)Cl]₂Cl₂; y *iii*) en tercer

lugar, este complejo dinuclear de rutenio se dejó reaccionar con clorhidrato de mitoxantrona en EtOH a 313 K durante 24 horas, para conseguir la especie final cargada **MIL-100(Fe)@Ru_mito** (para más detalles experimentales véase el Anexo A). Los resultados obtenidos mediante análisis elemental y UV-vis demostraron un valor de carga de 0.4 mmol de **Ru_mito** por mmol de **MIL-100(Fe)**.

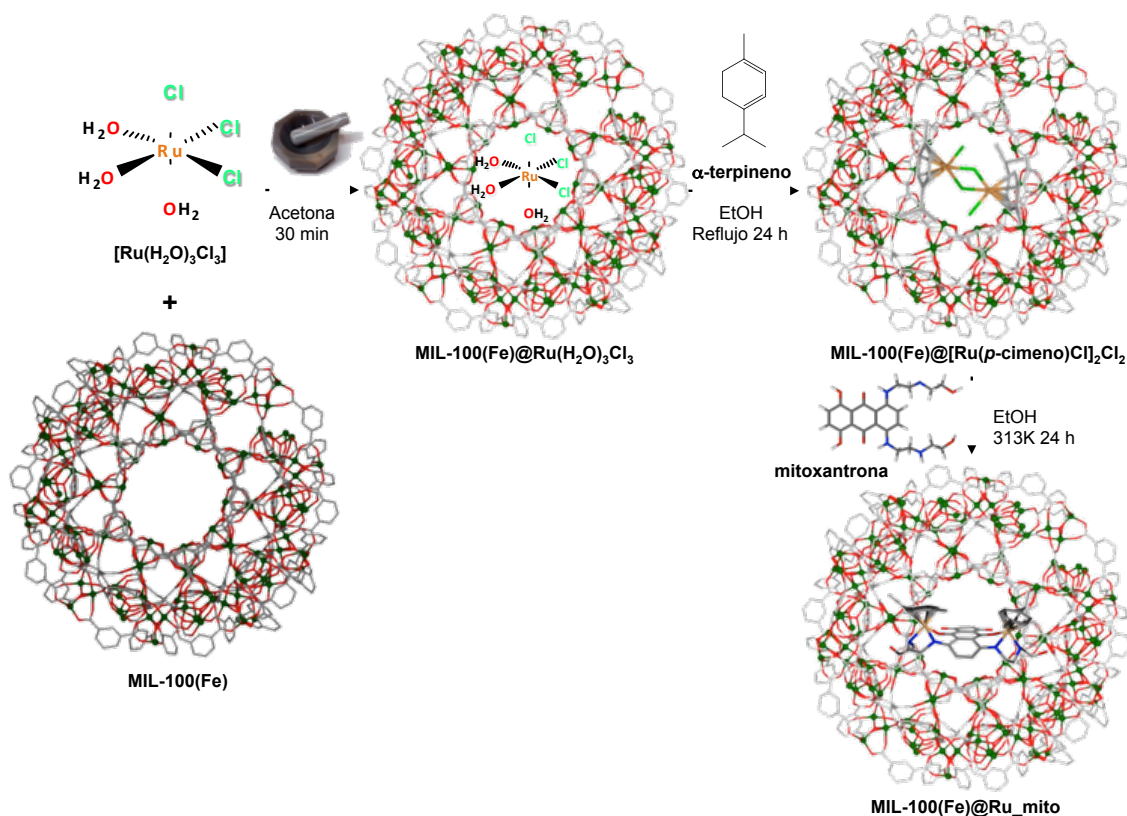


Figura 2.44. Estrategia del “barco en la botella” utilizada para la encapsulación de la metalodroga no convencional **Ru_mito** en la matriz porosa **MIL-100(Fe)**.

Asimismo, la formación del complejo **Ru_mito** en los poros de la red **MIL-100(Fe)** ha sido confirmada por: *i*) la dramática disminución en la capacidad de adsorción del MOF, pasando de una superficie de BET de 1570 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ para el material original, a 20 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ tras la carga de **Ru_mito** (Figura 2.45a); *ii*) la presencia de algunos picos característicos del metalofármaco puro en el IR del MOF cargado **MIL-100(Fe)@Ru_mito** (Figura 2.45b); *iii*) la presencia de bandas características de **Ru_mito** en el espectro de reflectancia difusa de **MIL-100(Fe)@Ru_mito** (Figura 2.45c); y *iv*) la presencia de rutenio en el MOF cargado confirmado mediante el análisis químico puntual por

espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) (Figura 2.45d). Por otra parte, de acuerdo con los datos de difracción de rayos X en polvo, la integridad estructural de la red se mantiene después de la incorporación de **Ru_mito**.

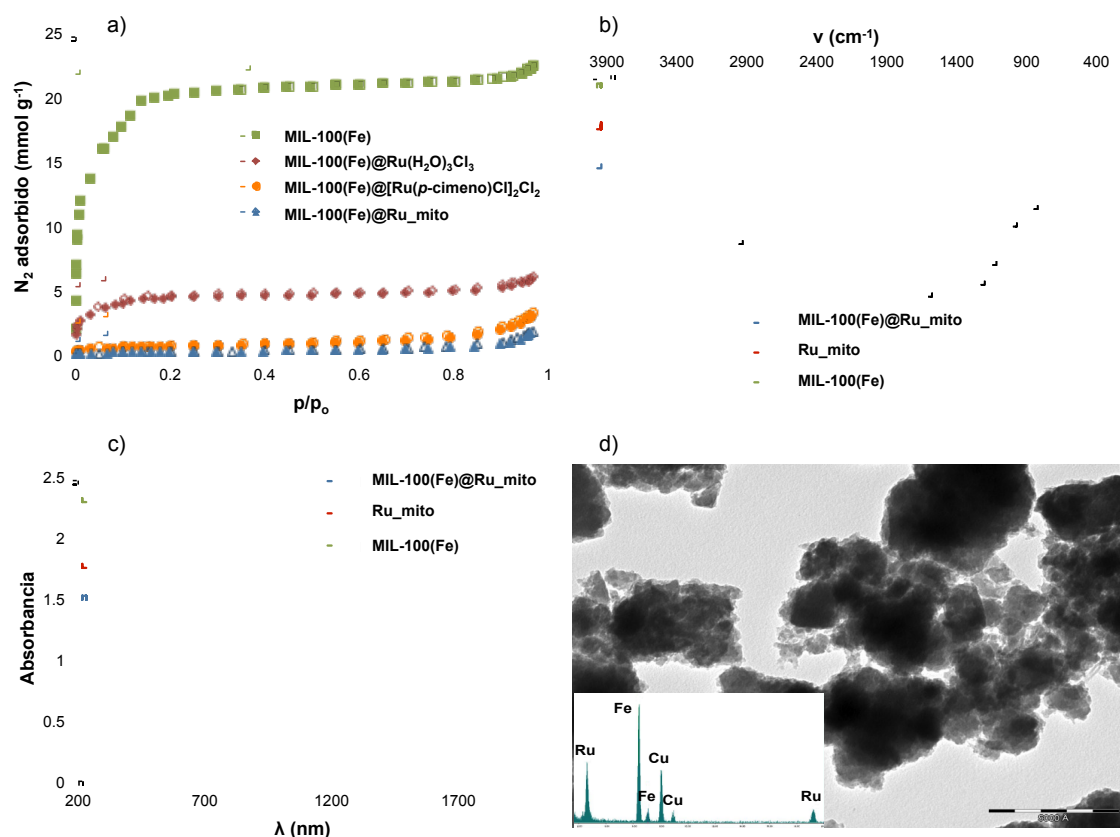


Figura 2.45. (a) Isothermas de adsorción de N_2 a 77 K de las especies **MIL-100(Fe)**, **MIL-100(Fe)@[Ru(H₂O)₃Cl₃]**, **MIL-100(Fe)@[Ru(p-cimeno)Cl]₂Cl₂** y **MIL-100(Fe)@Ru_mito**. La desorción se denota con símbolos vacíos. (b) Espectros IR y (c) espectros de reflectancia difusa de las especies **MIL-100(Fe)**, **Ru_mito** y **MIL-100(Fe)@Ru_mito**. (d) Imagen HR-TEM para la muestra **MIL-100(Fe)@Ru_mito**. Los análisis cualitativos EDX llevados a cabo en diferentes zonas de la muestra, confirman la presencia de rutenio en la matriz porosa.

Finalmente, se intentó estudiar la liberación de **Ru_mito** o de mitoxantrona de la matriz porosa **MIL-100(Fe)@Ru_mito**. Hay que indicar que los estudios preliminares mediante UV-vis revelaron que la liberación de **Ru_mito** en SBF, presenta un comportamiento complejo, debido a la superposición de las bandas debidas a la degradación del **Ru_mito** y de las nanopartículas del MOF. Este hecho dificulta la comprensión del proceso de liberación. No obstante, hay que destacar que la estrategia de encapsulación elegida supone un beneficio en comparación con la encapsulación de la mitoxantrona libre, gracias a la liberación lenta y simultánea de fragmentos

organometálicos de Ru(II) junto con mitoxantrona. Actualmente, nuestro grupo de investigación sigue trabajando para aclarar la posible actividad biológica de los sistemas híbridos nanoMOF@metalofármaco. Este último resultado debe tomarse como una prueba de concepto sobre el potencial uso de las redes metalorgánicas como portadores de fármacos anticancerígenos no convencionales.

Conclusiones

El MOF **MIL-100(Fe)** presenta ventajas inherentes a su composición y estructura que lo convierten en un candidato ideal para aplicaciones biológicas. Este MOF mesoporoso presenta una alta estabilidad química, porosidad permanente y una elevada área superficial. Además, el **MIL-100(Fe)** es biocompatible y se puede obtener fácilmente en forma de nanopartículas. Estas características lo hacen un buen candidato para su aplicación en la incorporación y liberación de metalofármacos no convencionales como el $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$, (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano) (RAPTA-C) y el $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**).

En este apartado, se ha demostrado que es posible encapsular el metalofármaco RAPTA-C mediante la impregnación de la matriz porosa **MIL-100(Fe)** alcanzándose una carga de 0.8 mmol de RAPTA-C por mmol de **MIL-100(Fe)**. Por otra parte, debe destacarse que la liberación del metalofármaco en FCS se produce en dos etapas, poniendo de manifiesto los diferentes tipos de interacción entre las moléculas de RAPTA-C y la matriz porosa.

Por otro lado, se ha sintetizado un novedoso metalofármaco no convencional basado en Ru(II) y el ligando mitoxantronato $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). Este nuevo metalofármaco reúne las propiedades anticancerígenas de la antraciclina mitoxantrona y de los compuestos “*semi-sandwich*” de rutenio. Se ha demostrado que **Ru_mito** presenta actividad redox, capacidad de interaccionar con diferentes dianas biológicas (como la biomolécula de ADN, aminoácidos N y S dadores y las catepsinas B y D), así como actividad anticancerígena frente a varias líneas celulares, incluso frente a líneas celulares resistentes al cisplatino.

Por último, se ha demostrado que es posible llevar a cabo la incorporación de **Ru_mito** en el MOF **MIL-100(Fe)** (0.4 mmol de **Ru_mito** por mmol de **MIL-100(Fe)**) utilizando la estrategia del “barco en la botella”. Los resultados obtenidos son una prueba de concepto más sobre el potencial uso

MOFs: agentes portadores y liberadores de moléculas bioactivas

de las redes metalorgánicas como portadores de fármacos anticancerígenos no convencionales.

Referencias bibliográficas

- ¹ Férey G., Serre C., Devic T., Maurin G., Jobic H., Llewellyn P. L., Weireld G. D., Vimont A., Daturi M., Chang J. -S., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 550-562.
- ² Horcajada P., Serre C., Vallet-Regí M., Sebban M., Taulelle F., Férey G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5974-5978.
- ³ Volkringer C., Popov D., Loiseau T., Férey G., Burghammer M., Riekel C., Haouas M., Taulelle F., *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 5695-5697.
- ⁴ Lieb A., Leclerc H., Devic T., Serre C., Margiolaki I., Mahjoubi F., Lee J. S., Vimont A., Daturi M., Chang J. S., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2012**, *157*, 18-23.
- ⁵ Mitchell L., González-Santiago B., Mowat J. P. S., Gunn M. E., Williamson P., Acerbi N., Clarke M. L., Wright P. A., *Catal. Sci. Technol.*, **2013**, *3*, 606.
- ⁶ (a) Férey G., Serre C., Mellot-Draznieks C., Millange F., Surblé S., Dutour J., Margiolaki I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6296-6301; (b) Férey G., Mellot-Draznieks C., Serre C., Millange F., Dutour J., Surblé S., Margiolaki I., *Science*, **2005**, *309*, 2040.
- ⁷ (a) Petit C., Bandoz T. J., *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, *21*, 2108-2117; (b) Petit C., Bandoz T., *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 4027.
- ⁸ Horcajada P., Surblé S., Serre C., Hong D. -Y., Seo Y. -K., Chang J. -S., Grenèche J. -M., Margiolaki I., Férey G., *Chem. Commun.*, **2007**, 2820-2822.
- ⁹ (a) Chen X., Ding N., Zang H., Yeung H., Zhao R. -S., Cheng C., Liu J., Chan T. -W. D., *J. Chromatogr. A*, **2013**, *1304*, 241-245; (b) Ke F., Qiu L. -G., Zhu J., *Nanoscale*, **2014**, *6*, 1596; (c) Dhakshinamoorthy A., Álvaro M., García H., *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, *352*, 711-717.
- ¹⁰ Huo S. -H., Yan X. -P., *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 7449.
- ¹¹ (a) <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/100-21-0.pdf>, **2008**; (b) <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/TRIMESIC%20ACID.htm> **2008**.
- ¹² (a) McKinlay A. C., Morris R. E., Horcajada P., Férey G., Gref R., Couvreur P., Serre C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 6260-6266; (b) Horcajada P., Chalati T., Serre C., Gillet B., Sebrie C., Baati T., Eubank J. F., Heurtaux D., Clayette P., Kreuz C., Chang J., Hwang Y. K., Marsaud V., Bories P., Cynober L., Gil S., Férey G., Couvreur P., Gref R., *Nature Materials*, **2010**, *9*, 172; (c) Horcajada P., Gref R., Baati T., Allan P. K., Maurin G., Couvreur P., Férey G., Morris R. E., Serre C., *Chem Rev.*, **2012**, *112*, 1232-1268; (d) Bellido E., Guillevic M., Hidalgo T., Santander-Ortega M. J., Serre C., Horcajada P., *Langmuir*, **2014**, *30*, 5911-5920.
- ¹³ Tamames-Tabar C., Cunha D., Imbuluzqueta E., Ragon F., Serre C., Blanco-Prieto M. J., Horcajada P., *J. Mat. Chem. B*, **2014**, *2*, 262.
- ¹⁴ Leclerc H., Vimont A., Lavalley J. -C., Daturi M., Wiersum A. D., Llewellyn P. L., Horcajada P., Férey G., Serre C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 11748-11756.
- ¹⁵ Seo Y. -K., Yoon J. W., Lee J. S., Lee U. -H., Hwang Y. K., Jun C. -H., Horcajada P., Serre C., Chang J. -S., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2012**, *157*, 137-145.
- ¹⁶ Cunha D., Yahia M. B., Hall S., Miller S. R., Chevreau H., Elkaïm E., Maurin G., Horcajada P., Serre C., *Chem. Mater.*, **2013**, *25*, 2767-2776.
- ¹⁷ Chalati T., Horcajada P., Couvreur P., Serre C., Maurin G., Gref R., *Nanomedicine*, **2011**, *6*, 1683-1695.
- ¹⁸ Agostoni V., Anand R., Monti S., Hall S., Maurin G., Horcajada P., Serre C., Bouchemal K., Gref R., *J. Mater. Chem. B*, **2013**, *1*, 4231.
- ¹⁹ Horcajada P., Chevreau H., Heurtaux D., Benyettou F., Salles F., Devic T., García-Márquez A., Yu C., Lavrard H., Dutson C. L., Magnier E., Maurin G., Elkaïm E., Serre C., *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 6872.

- ²⁰ (a) Casini A., Edafe F., Erlandsson M., Gonsalvi L., Ciancetta A., Re N., Ienco A., Messori L., Peruzzini M., Dyson P. J., *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 5556-5563; (b) Casini A., Hartinger C. G., Nazarov A. A., Dyson P. J., *Medicinal Organometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry)*, **2010**, 32, 57-80.
- ²¹ (a) Klunj J., Bratsos I., Alessio E., Psomas G., Repnik U., Butinar M., Turk B., Turel I., *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 9039-9052; (b) Linares F., Quartapelle E., Galindo M. A., Romero M. A., Navarro J. A. R., Barea E., *Cryst. Eng. Comm.*, **2010**, 12, 2343-2346.
- ²² Dana B., Dahlberg S., Schnitzer B., Kjeldsberg C. R., Jones S. E., Carden J., Mundis R., Trantum B., *Investigational New Drugs*, **1989**, 7, 247-250.
- ²³ (a) Xia C., Guoli S., Jianhui J., Roquin Y., *Anal. Lett.*, **1999**, 32, 717-727; (b) Dreyfuss A. I., Clark J. R., Fallon B. G., Posner M. R., Norris C. M., Miller D., *Cancer*, **1987**, 60, 2871.
- ²⁴ Myers C. E., Mimnaugh E. G., Yeh G. C., Sinha B. K., *Anthracycline and Anthracenedione-Based Anticancer Agents*, Lown J. W. (Ed.), **1988**, 527, Elsevier.
- ²⁵ (a) Chen K. X., Gresh N., Pullman B., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 3799-3812; (b) Cornbleet M. A., Stuart-Harris R. C., Smith I. E., Coleman R. E., Rubens R. D., McDonald M., Mouridsen H. T., Rainer H., Van Oosteram A. T., Smyth J. F., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1984**, 20, 1141-1146; (c) Feofanov A., Sharonov S., Fleury F., Kudelina I., Nabiev I., *Biophys. J.*, **1997**, 73, 3328-3336.
- ²⁶ Paul L. E. H., Therrien B., Furrer J., *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 1057-1067.
- ²⁷ Kljun J., Bratsos I., Alessio E., Psomas G., Repnik U., Butinar M., Turk B., Turel I., *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 9039-9052.
- ²⁸ (a) Löscher A., Schindl M., Kohlberger P., Lohodny J., Breitenacker G., Horvat R., Birner P., *Gynecologic Oncology*, **2004**, 92, 545-552; (b) Mohamed M. M., Sloane B. F., *Nature Reviews. Cancer*, **2006**, 6, 764.
- ²⁹ Rochefort H., Capony F., García M., *Cancer and Metastasis Reviews*, **1990**, 9, 321-331.
- ³⁰ (a) Nicotra G., Manfroi F., Follo C., Castino R., Fusco N., Peregichio C., Kerim S., Valente G., Isidoro C., *Disease Markers*, **2010**, 28, 167-183; (b) Zhang M., Sukhumalchandra P., Enyenihi A., St. John L. S., Hunsucker S. A., Mittendorf E. A., Sergeeva A., Ruisaard K., Al-Atrache A., Ropp P. A., Jakher H., Rodriguez-Cruz T., Lizee G., Clise-Dwyer K., Lu S., Mollidrem J. J., Glish G. L., Armistead P. M., Alatrash G., *Clin. Cancer. Res.*, **2012**, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2753.

2.4 Nanopartículas de ZnBDP_X

El diseño y estudio de nuevos materiales de talla nanométrica es, actualmente, una de las áreas de investigación que más interés suscita en la comunidad científica. Numerosos tipos de nanopartículas se han estudiado para su aplicación como agentes para la liberación controlada de fármacos y/o como agentes de contraste.¹ Entre todos ellos, una nueva clase de nanopartículas emergentes son las redes metalorgánicas a escala nanométrica (nanoMOFs), que gracias a la gran variabilidad de estructuras que pueden formar, permite abordar la demanda de este tipo de materiales en aplicaciones biológicas. En este sentido, los nanoMOFs presentan las mismas ventajas que los MOFs a escala macrométrica: ofrecen una gran diversidad de estructuras y composiciones, tienen la capacidad de transportar agentes terapéuticos y de imagen, pueden presentar una aceptable toxicidad, biodegradación, etc. Sin embargo, sus propiedades fisicoquímicas (carga, química superficial y estabilidad química y coloidal) deben ser cuidadosamente analizadas antes de utilizarlas en condiciones prácticas, ya que éstas van a determinar la eficacia y biodistribución de las nanopartículas.² Por todo ello, la caracterización de las nanopartículas en suspensión es imprescindible para la evaluación de su potencial efecto biológico. Sin embargo, a pesar de que se han descrito varios sistemas de liberación controlada de fármacos a escala nanométrica, existen pocos datos sobre la respuesta del sistema inmune a un tratamiento con nanopartículas, así como su posible efecto tóxico o la estabilidad frente a la agregación o floculación en condiciones fisiológicas.^{3,4}

Aunque es difícil delimitar de forma precisa qué es una nanopartícula, la comunidad científica conviene en definir las como porciones de materia, diferenciadas del medio que las rodea, cuya longitud, en al menos una de sus dimensiones, oscila entre 1 y 100 nm (1 nm = 10^{-9} metros). Las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional.⁵ Las nanopartículas utilizadas en la

administración de fármacos, con fines terapéuticos o de diagnóstico, son sólidos coloidales con un tamaño entre 2 y 1000 nm.

Asimismo, las ventajas del uso de nanopartículas para la administración de fármacos se deben, principalmente, a su pequeño tamaño y al empleo de materiales biodegradables. Gracias a su tamaño, las nanopartículas pueden atravesar zonas de inflamación del endotelio, epitelio (por ejemplo, el tracto intestinal, el hígado, etc.), tumores o penetrar en microcapilares.⁶ Actualmente, la vía oral y la vía parenteral son las rutas más utilizadas para la administración de fármacos. Mediante la ruta parenteral se consigue un efecto farmacológico casi instantáneo, mientras que la administración oral es menos invasiva. En cuanto a la administración intravenosa, hay que destacar que el tamaño de las nanopartículas es mucho menor que el de los capilares de diámetro pequeño, lo que evita la formación de agregados y garantiza que las partículas no formen émbolos o trombos. En este sentido, se consideran nanopartículas óptimas para tratamientos intravenosos aquellas que tengan un tamaño menor que 200 nm.⁷

Por otro lado, la liberación del fármaco puede verse afectada por el tamaño de la partícula portadora. Por una parte, las partículas pequeñas tienen una mayor relación área superficie-volumen, lo que favorece la asociación del fármaco con las moléculas del órgano diana (al estar más expuesto), y por tanto, una liberación más rápida del fármaco. Por otra parte, las partículas de mayor tamaño son capaces de encapsular una mayor cantidad de fármaco, así como liberarlo de una forma más lenta como resultado del proceso de difusión.⁸

Aparte del tamaño, la polaridad de las nanopartículas determina qué componentes del medio (moléculas de disolvente, iones, proteínas, enzimas, etc.) se unen a su superficie. En este sentido, el potencial ζ se utiliza comúnmente para caracterizar la carga superficial de las nanopartículas en suspensión. El potencial ζ describe la intensidad del potencial eléctrico de las partículas y depende tanto de la composición de éstas como del medio en el que se encuentren (Figura 2.46).⁹ Según la teoría clásica Derjaguin-Landau-

Verwey-Overbeek (DLVO),¹⁰ el que se produzca o no la aglomeración de las nanopartículas está determinada por la suma de las fuerzas electrostáticas repulsivas (interacción de las capas eléctricas alrededor de las nanopartículas) y las fuerzas atractivas de van der Waals. Aumentando la carga superficial de la nanopartícula (potencial ζ) se puede aumentar la fuerza electrostática repulsiva, minimizando la agregación, y consecuentemente, reduciendo el tamaño hidrodinámico. En este sentido, las nanopartículas con un potencial ζ mayor de ± 30 mV han demostrado ser estables en suspensión.¹¹ Además, hay que destacar que las nanopartículas con una carga superficial negativa son más difíciles de detectar y eliminar por el sistema inmune que las nanopartículas cargadas positivamente. Asimismo, hay evidencias de que las nanopartículas catiónicas son más tóxicas e inducen reacciones inflamatorias.

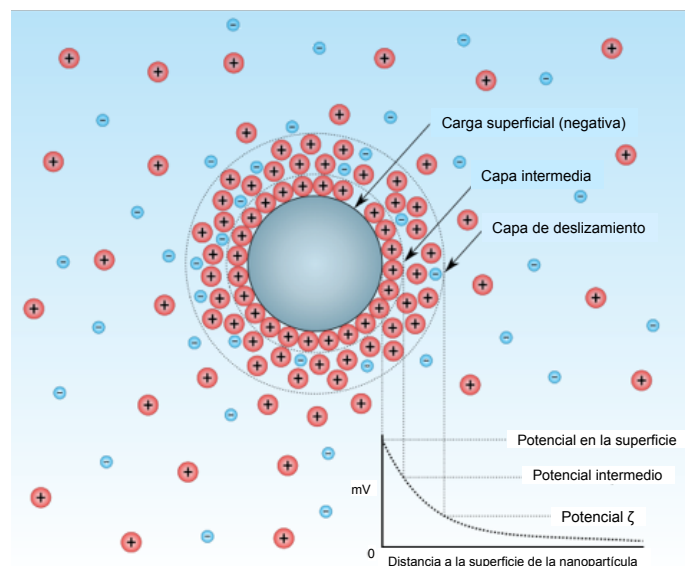


Figura 2.46. Representación esquemática de la distribución de cargas y del valor del potencial ζ alrededor de una nanopartícula.

Una vez administradas, las nanopartículas han de atravesar diversos medios biológicos hasta alcanzar la diana deseada. Estas barreras biológicas pueden modular la actividad y/o biodistribución de las nanopartículas. Asimismo, la opsonización es el proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito, y se considera una de las mayores barreras que presentan las nanopartículas en cuanto a estabilidad *in vivo*. Las opsinas más importantes presentes en el organismo son las

inmunoglobulinas, las proteínas complementarias, la albúmina, las apolipoproteínas y el fibrinógeno, y su actividad está determinada por su capacidad de unión a la superficie de las nanopartículas.¹² Además, se considera que el uso de nanopartículas para la liberación eficiente de fármacos a menudo se encuentra obstaculizada por la actividad de las enzimas y la barrera mucosa (gástrica, intestinal, etc.). Por lo tanto, las nanopartículas deben ser capaces de soportar la actividad enzimática y la barrera mucosa defensiva para evitar su rápida eliminación.¹³ En este sentido, en esta Tesis Doctoral, se ha estudiado la estabilidad coloidal de nanoMOFs de la serie isorreticular **ZnBDP_X** ($H_2BDP = 1,4\text{-bis}(1H\text{-pirazol-4-il})\text{benceno}$, $X = H, NO_2, NH_2$ y OH) en distintos fluidos biológicos simulados en presencia de diversas enzimas y proteínas.

Con este fin se prepararon los nanoMOFs con tamaños adecuados para aplicaciones biológicas (< 200 nm) de la serie **ZnBDP_X**, previamente descrita por nuestro grupo de investigación, basada en el ensamblaje del ión metálico $Zn(II)$ y el ligando bispirazolato previamente funcionalizado (Figura 2.47).¹⁴ Las razones que han motivado la elección de las redes porosas **ZnBDP_X** para la síntesis de nanoMOFs con aplicaciones biológicas son esencialmente dos. En primer lugar, esta serie está basada en el elemento esencial para la vida Zn , lo que evita problemas de toxicidad derivados de la lixiviación del metal al degradarse la matriz. En segundo lugar, la alta basicidad de los ligandos pirazolato en combinación con la naturaleza intermedia duro-blanda de los iones $Zn(II)$ da lugar a enlaces de coordinación $Zn-N$ robustos. Dicha robustez va a limitar el tamaño de los dominios cristalinos de los núcleos de cristalización por lo que el uso de ligandos pirazolato va a favorecer la formación de nanopartículas de MOFs.

De acuerdo con la estructura descrita en bibliografía, el material poroso **ZnBDP** cristaliza en el grupo espacial $P4_2/mmc$ del sistema tetragonal, ($a = 13.2657$ Å, $c = 7.2474$ Å, $V = 1275.4$ Å³, $Z = 2$, $\delta = 1.250$ g cm⁻³).¹⁵ Los iones metálicos están unidos entre sí por los ligandos orgánicos formando cadenas lineales paralelas. Estas cadenas a su vez están conectadas por los ligandos BDP formando una red porosa 3D con canales 1D cuadrados con una

apertura de poro de 1.1 nm. La activación térmica de este compuesto a 453 K en vacío dinámico (10^{-6} bar) durante 12 horas elimina las moléculas de disolvente atrapadas en los canales durante el proceso de síntesis, dando lugar a una estructura desolvatada con grandes cavidades con un volumen de poro accesible, calculado a partir de la estructura, que alcanza el 65% del volumen total del cristal. Asimismo, se ha demostrado que la funcionalización pre-sintética del ligando 4,4'-benceno-1,4-diilbis(1*H*-pirazol) (H_2BDP) introduciendo grupos $-NH_2$, $-NO_2$ y $-OH$ conduce a la formación de la serie isorreticular **ZnBDP_X** ($H_2BDP = 1,4$ -bis(1*H*-pirazol-4-il)benceno, $X = H, NO_2, NH_2$ y OH) en la que la introducción de grupos polares da lugar a un aumento significativo en la afinidad del sistema por la adsorción de gases polares.¹⁴ En esta Tesis Doctoral, se ha estudiado el efecto de la presencia de distintos grupos químicos en las paredes de las cavidades de la matriz porosa en la interacción metalofármaco-anfitrión.

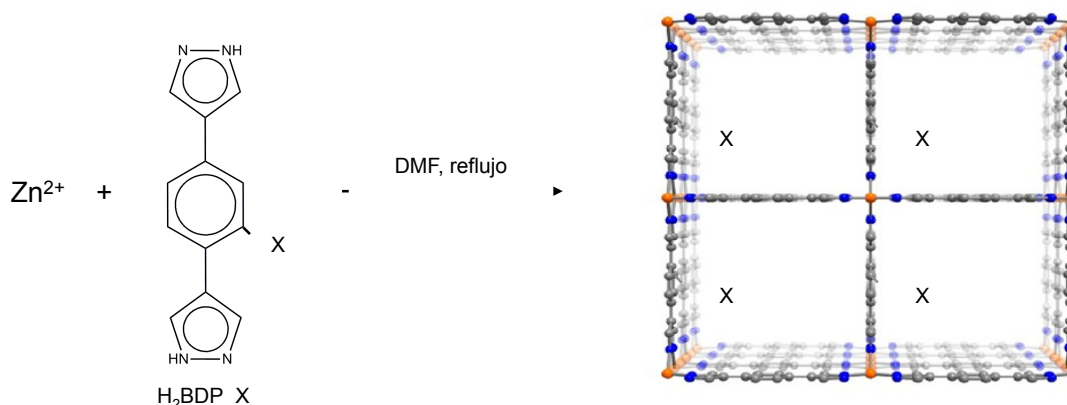


Figura 2.47. Representación esquemática de la reacción entre el ion metálico Zn(II) y los ligandos funcionalizados H_2BDP_X para la obtención de la serie isorreticular **ZnBDP_X** ($X = H, NO_2, NH_2$ y OH).

En este apartado, se describirá la síntesis y caracterización de nanopartículas a partir de la serie isorreticular **ZnBDP_X**, así como el estudio de su potencial aplicación como portadores de fármacos. En primer lugar, se investigará la síntesis y caracterización de los nanoMOFs **ZnBDP_X** ($X = H, NO_2, NH_2$ y OH) y se estudiará los tamaños de partícula siguiendo diferentes estrategias. A continuación, se evaluará la dispersión de nanopartículas de **ZnBDP_OH**, matriz utilizada como modelo de la serie, en diferentes condiciones biológicas simuladas en presencia de distintas proteínas y sales

características de medios intravenosos y orales. Con esta investigación, se pretende determinar si las nanopartículas se agregan bajo determinadas condiciones químicas (pH) o en presencia de determinadas moléculas presentes en los medios biológicos (proteínas). Debe destacarse que los fenómenos de agregación de estos nanovehículos pueden provocar cambios en su internalización en las células y en su citotoxicidad, lo que afectaría a la eficacia del tratamiento. Por otra parte, se investigará el efecto de la funcionalización de los ligandos en la capacidad de los nanoMOFs para la incorporación y liberación de la metalodroga antitumoral no convencional [Ru(*p*-cimeno)Cl₂(pta)], RAPTA-C (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano) y el fármaco anticancerígeno comercial clorhidrato de mitoxantrona (C₂₂H₂₈N₄O₆ · 2HCl). La presencia de distintos grupos químicos en las paredes de las cavidades de la matriz porosa puede afectar a la interacción metalofármaco-anfitrión y, por tanto, modificar la capacidad de carga así como las cinéticas de adsorción y liberación del metalofármaco.

Discusión y resultados

2.4.1 Caracterización de los nanomateriales

La red metalorgánica **ZnBDP_X** (H₂BDP = 1,4-bis(1H-pirazol-4-il)benceno, X = H, NO₂, NH₂ y OH) ha sido preparada siguiendo el método descrito previamente por nuestro grupo de investigación.¹⁴ En la síntesis típica para la obtención de **ZnBDP_X**, se utilizó una mezcla de acetato de zinc y el ligando orgánico correspondiente en una relación 1:1 en DMF a reflujo (para más detalles experimentales véase el Anexo A). En esta Tesis Doctoral, la síntesis de la serie **ZnBDP_X** a escala nanométrica ha sido optimizada. Se ha demostrado que tras una hora de reacción a reflujo se obtienen nanocristales de los MOFs, excepto para el derivado **ZnBDP_NH₂**, para el que son necesarias dos horas (Figura 2.48).

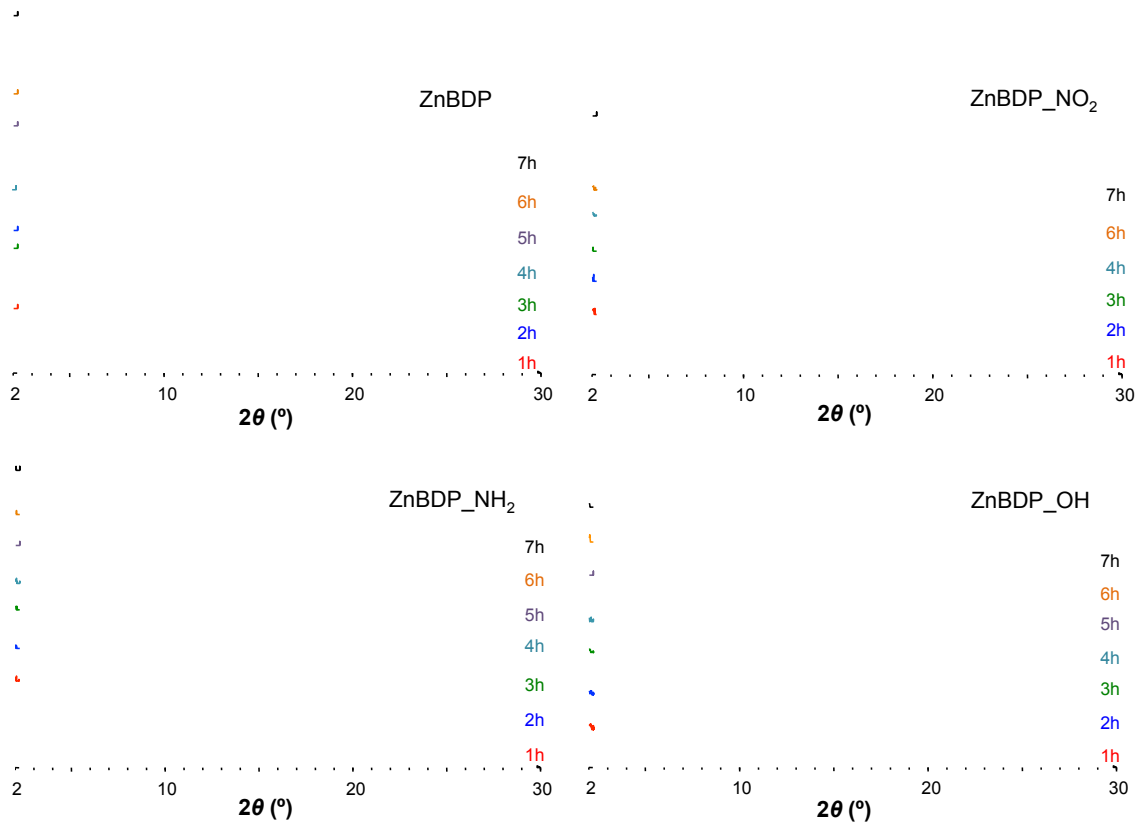


Figura 2.48. Difractogramas de RX en polvo para la serie **ZnBDP_X** medidos a diferentes tiempos de reacción.

La evolución del tamaño de partícula se estudió en función del tiempo de reacción (entre 1 y 7 horas) mediante diferentes estrategias: *i*) utilizando la ecuación de Scherrer a partir de los difractogramas de RX en polvo, *ii*) tomando imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), y *iii*) mediante estudios de dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) (Tabla 2.2). Mediante la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño medio de los dominios ordenados, que es menor o igual al tamaño del cristal, y se obtuvo un tamaño medio de partícula aproximado de 50 nm. Hay que destacar que el tamaño de los dominios cristalinos se mantiene a lo largo de toda la reacción (hasta las 7 horas).

Tiempo (horas)		1	2	3	4	5	6	7
ZnBDP	DLS	105 ± 15	150 ± 20	145 ± 15	155 ± 30	140 ± 20	170 ± 25	180 ± 25
	(PDI)	(0.4)	(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0.6)	(0.5)
	Scherrer	46	47	50	51	60	50	52
	SEM							
	Rendimiento (%)	53		53				57
ZnBDP_NH₂	DLS	190 ± 35	210 ± 30	193 ± 40	220 ± 35	210 ± 35	210 ± 35	275 ± 35
	(PDI)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.1)
	Scherrer	58		71	67	65	71	61
	SEM							
	Rendimiento (%)	45		46				58
ZnBDP_NO₂	DLS	125 ± 35	100 ± 30	120 ± 25	120 ± 30	115 ± 30	100 ± 30	120 ± 35
	(PDI)	(0.3)	(0.3)	(0.3)	(0.3)	(0.2)	(0.2)	(0.3)
	Scherrer	45	43	42	39	37		39
	SEM							
	Rendimiento (%)	48		58				62
ZnBDP_OH	DLS	145 ± 35	145 ± 35	160 ± 30	165 ± 35	165 ± 35	160 ± 35	155 ± 40
	(PDI)	(0.2)	(0.2)	(0.2)	(0.2)	(0.2)	(0.2)	(0.2)
	Scherrer	52	50	45	45	40	34	50
	SEM							
	Rendimiento (%)	35		47				63

Tabla 2.2. Evolución del tamaño de partícula para la serie **ZnBDP_X** en función del tiempo de reacción hasta las 7 horas usando la ecuación de Scherrer, imágenes de SEM y medidas de DLS (incluyendo los valores de polidispersión, *Polydispersity index*, PDI). También, se muestran los rendimientos de las reacciones a las 2, 4 y 7 horas.

Las imágenes de SEM de los compuestos **ZnBDP_X**, tras 7 horas de reacción, muestran la formación de partículas tetragonales con un tamaño medio aproximado de 60 nm para los compuestos **ZnBDP_X** (X = H, NO₂ y OH) y la formación de partículas más grandes y ligeramente alargadas con un tamaño medio de 120 x 45 nm para el compuesto **ZnBDP_NH₂** (Figura 2.49). Estos tamaños de partícula concuerdan con los resultados obtenidos utilizando la ecuación de Scherrer.

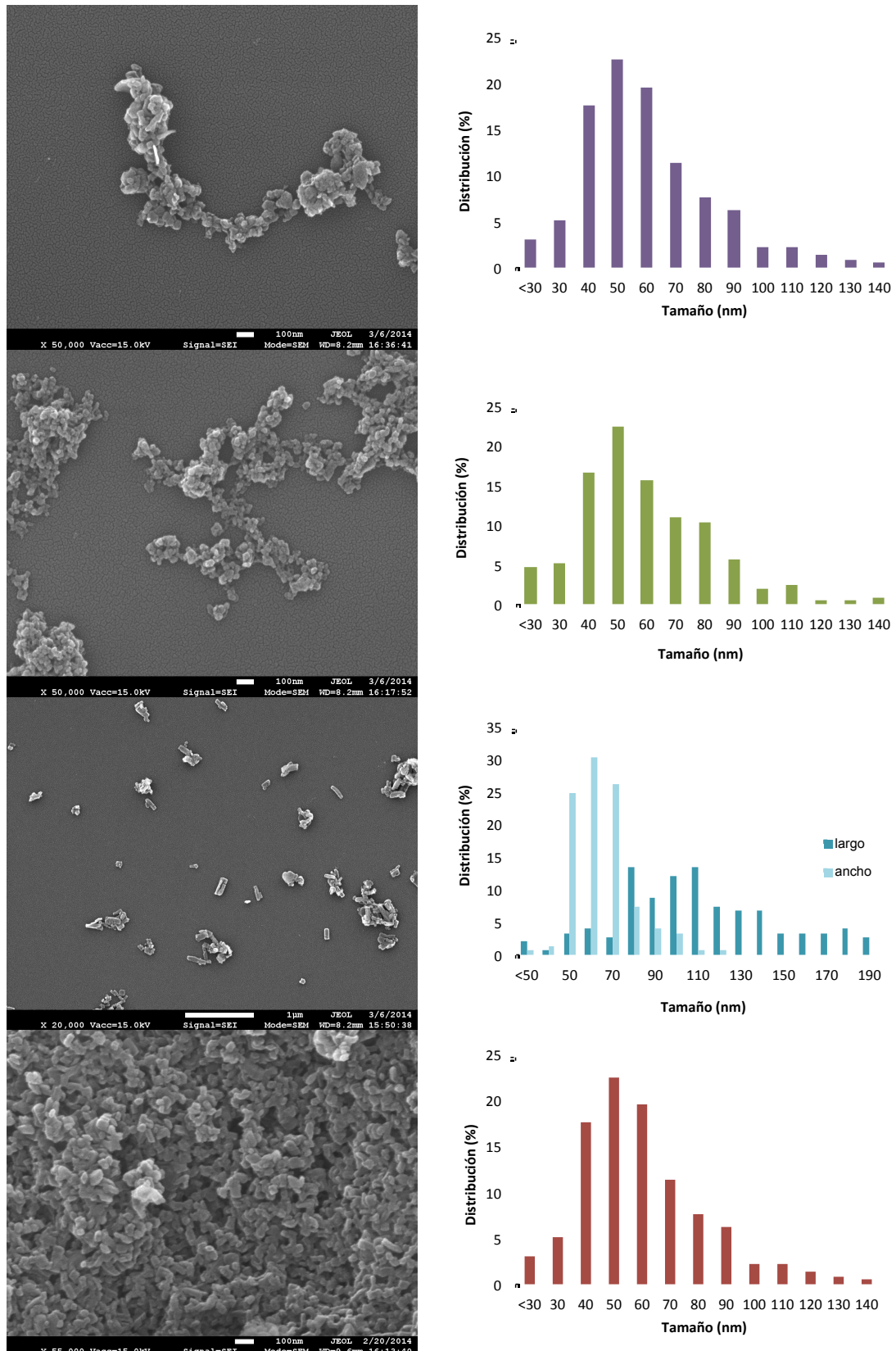


Figura 2.49. Imágenes de SEM de los materiales **ZnBDP**, **ZnBDP_NO₂**, **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_OH**, obtenidos mediante reacciones a reflujo a 423 K durante 7 horas. En todos los casos se han obtenido partículas tetragonales, excepto en el caso de **ZnBDP_NH₂**, donde las nanopartículas son ligeramente alargadas.

Por otro lado, las medidas de DLS a distintos tiempos de reacción muestran tamaños de partícula (100 - 200 nm) más grandes que los obtenidos en estado sólido, como consecuencia de su agregación en DMF. Sin embargo, hay que destacar el grado de monodispersión que presentan estos agregados (con valores de polidispersión, PDI, menores que 0.3) (Tabla 2.2). También debe indicarse que el tamaño de los agregados permanece constante durante toda la reacción (hasta las 7 horas) en todos los casos, menos para el **ZnBDP**, donde se observa un aumento progresivo del tamaño desde 100 hasta 180 nm y un mayor grado de polidispersión, cercano a 0.5 (Tabla 2.2). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que, de forma general, el mecanismo de nucleación de estas nanopartículas está relacionado con la aparición de nuevos núcleos en la fase homogénea. Esta hipótesis concuerda con el aumento de los rendimientos de reacción con el tiempo, sin que haya un aumento significativo en el tamaño de partícula (Tabla 2.2). De hecho, los rendimientos más altos se obtienen a las 7 horas, con valores cercanos al 60%, que pueden considerarse buenos para la síntesis de nanoMOFs.¹⁶

Por otra parte, se ha llevado a cabo una síntesis solvotermal asistida por microondas de nanopartículas de **ZnBDP_OH** utilizando disolventes más respetuosos con el medio ambiente. Mediante este método se evita el uso del disolvente tóxico DMF, y se reduce la temperatura y el tiempo de reacción. Para llevar a cabo esta síntesis, se utilizó isopropanol como disolvente y dos sales de Zn(II): $\text{Zn}(\text{AcO})_2$ y $\text{Zn}(\text{2,4-pentanodionato})_2$ (para más detalles experimentales véase Anexo A). Como se puede apreciar por los datos de difracción de RX, en ambos casos se obtuvo la fase cristalina **ZnBDP_OH** como producto final (Figura 2.50). Posteriormente, las imágenes tomadas mediante SEM de **ZnBDP_OH** (obtenido utilizando $\text{Zn}(\text{2,4-pentanodionato})_2$ como precursor) confirman la presencia de nanopartículas tetragonales con un tamaño cercano a 85 ± 25 nm (Figura 2.51), que son un poco más grandes que las obtenidas mediante la reacción a reflujo (60 ± 20 nm). Sin embargo, las medidas del tamaño de partícula realizadas mediante DLS tras una hora de reacción muestran agregados monodispersos de **ZnBDP_OH** en isopropanol de 775 ± 85 nm (PDI = 0.3) y agregados polidispersos de $290 \pm$

25 nm (PDI = 0.6) utilizando $\text{Zn}(\text{AcO})_2$ y $\text{Zn}(\text{2,4-pentanodionato})_2$ como precursores, respectivamente. Estos datos difieren de los obtenidos mediante la síntesis de **ZnBDP_OH** en DMF a reflujo, gracias a la que siempre se obtienen tamaños de partícula menores a 160 nm. Estos resultados indican la idoneidad y sencillez de la síntesis de nanomateriales de tipo **ZnBDP_X** en DMF a reflujo.

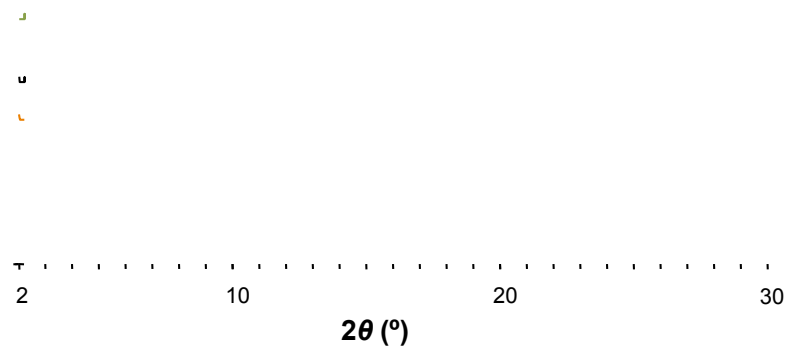


Figura 2.50. Diffractogramas de RX en polvo del material **ZnBDP_OH** obtenido mediante diferentes rutas sintéticas: *i*) síntesis asistida por microondas utilizando isopropanol como disolvente y el precursor $\text{Zn}(\text{AcO})_2$ (verde), *ii*) síntesis asistida por microondas utilizando isopropanol como disolvente y el precursor $\text{Zn}(\text{2,4-pentanodionato})_2$ (negro), y *iii*) síntesis a reflujo utilizando DMF como disolvente y el precursor $\text{Zn}(\text{AcO})_2$ (naranja).

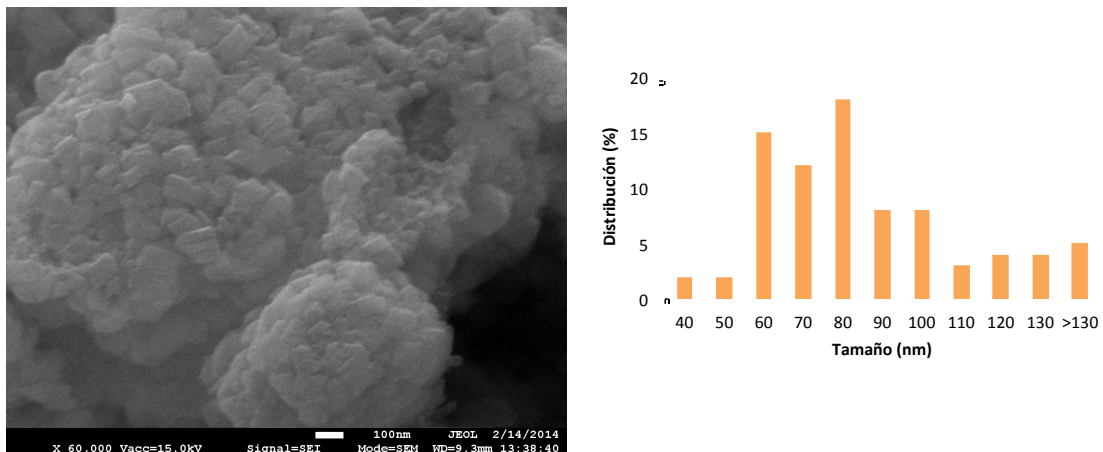


Figure 2.51. Imagen tomada mediante SEM del material **ZnBDP_OH** obtenido mediante la síntesis asistida por microondas utilizando $\text{Zn}(\text{2,4-pentanodionato})_2$ como precursor a 373 K durante 1 hora a 600 W. El tamaño medio de las nanopartículas es de 85 ± 25 nm.

Por otro lado, la aglomeración y/o variación de la carga superficial de las nanopartículas, puede causar daños en la internalización o adhesión celular e inducir procesos citotóxicos.¹ En este contexto, resulta imprescindible el estudio de la estabilidad coloidal de estos nanoMOFs en diferentes medios

con el fin de utilizarlos en futuras aplicaciones biomédicas. Debe destacarse que los componentes inorgánicos u orgánicos presentes en la superficie externa de las nanopartículas, cuyo ratio depende de la naturaleza del medio (disolvente, pH, presencia de electrolitos o macromoléculas, etc.) con el que pueden interactuar directamente, controlan la dispersión y estabilidad de las mismas. En este apartado, como ejemplo, se ha estudiado la estabilidad coloidal de las nanopartículas desolvatadas del material **ZnBDP_OH** en diferentes disolventes y en presencia de electrolitos específicos y/o macromoléculas característicos de fluidos fisiológicos con el fin de comprender la naturaleza de las interacciones entre las nanopartículas y los medios en las que se encuentran, así como las propiedades de su superficie externa. Con ese propósito, en primer lugar se suspendieron nanopartículas de **ZnBDP_OH** en diferentes medios: agua MilliQ, una disolución de NaCl (1 mM), etanol y DMF. Posteriormente, las suspensiones se sonicaron en diferentes condiciones (amplitud y tiempo de sonicación) y mediante medidas de DLS se monitorizó el tamaño de partícula y se midió su carga superficial (potencial ζ) (Tabla 2.3). Los resultados muestran que las nanopartículas de **ZnBDP_OH** pueden dispersarse fácilmente en todos los medios probados, obteniéndose tamaños de partícula menores (≈ 100 nm) o similares (≈ 140 nm) a los tamaños obtenidos durante la reacción de síntesis en DMF a reflujo. En agua MilliQ, NaCl (1 mM) y DMF se obtuvieron agregados con tamaños cercanos a 100 nm y valores de polidispersión entre 0.3 (NaCl (1 mM)) y 0.5 (DMF), utilizando un 10% de amplitud en la sonicación durante 1 minuto (en agua MilliQ y NaCl (1 mM)) ó 0.5 minutos (en DMF). Tiempos de sonicación cortos (0.5 minutos) en agua MilliQ y NaCl (1 mM) dan lugar a tamaños de partícula similares pero con valores de polidispersión mayores (> 0.5). Sin embargo, tiempos de sonicación largos (1 minuto) en DMF dan lugar a agregados más grandes (170 nm) así como a valores de polidispersión mayores (0.7). En EtOH, se obtuvieron agregados con tamaños cercanos a 140 nm y valores de polidispersión mayores (0.7), utilizando un 20% de amplitud en la sonicación durante 1 minuto. En este caso, amplitudes y/o tiempos menores dieron lugar a partículas mayores monodispersas, con tamaños entre 210 nm (10%, 0.5 minutos) y 760 nm (20%, 0.5 minutos). Hay que destacar que, en todos los casos, las nanopartículas de **ZnBDP_OH**

presentan una carga superficial negativa (potencial ζ), con valores entre - 22 y - 18 mV. Estos resultados ponen de manifiesto que la superficie externa de las nanopartículas debe estar formada por grupos hidroxilo y residuos fenolato desprotonados. Finalmente, tras la caracterización coloidal de estas suspensiones, las muestras de **ZnBDP_OH** se recuperaron por filtración y se comprobó su cristalinidad mediante difracción de RX en polvo. Los datos obtenidos demuestran que la cristalinidad del compuesto **ZnBDP_OH** no se ve afectada tras el tratamiento en agua MilliQ, EtOH y DMF a tiempos cortos y utilizando una amplitud de sonicación baja. Sin embargo, la exposición de **ZnBDP_OH** a la solución acuosa de NaCl (1mM), conlleva la pérdida parcial de la cristalinidad de la estructura, tal como puede apreciarse en la menor intensidad de los picos en el difractograma de RX (Figura 2.52).

Amplitud (%)	Tiempo (min)	Disolvente	Tamaño (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
10	0.5	MilliQ	125 ± 20	0.5	- 22 ± 2
10	1	MilliQ	110 ± 25	0.4	- 22 ± 2
10	0.5	NaCl (1mM)	77 ± 8	0.6	- 21 ± 3
10	1	NaCl (1mM)	105 ± 10	0.3	- 21 ± 3
10	0.5	EtOH	210 ± 25	0.5	- 18 ± 2
10	1	EtOH	670 ± 80	0.2	- 18 ± 2
20	0.5	EtOH	760 ± 80	0.4	- 18 ± 2
20	1	EtOH	140 ± 30	0.7	- 18 ± 2
10	0.5	DMF	104 ± 8	0.5	^a
10	1	DMF	170 ± 15	0.7	^a

^a El valor de potencial ζ no se indica puesto que la cubeta de poliestireno no puede utilizarse con disolventes orgánicos.

Tabla 2.3. Tamaño de partícula (nm), valor de polidispersión (PDI) y potencial ζ (mV) de las nanopartículas desolvatadas de **ZnBDP_OH** dispersadas mediante sonicación en diferentes disolventes y condiciones.

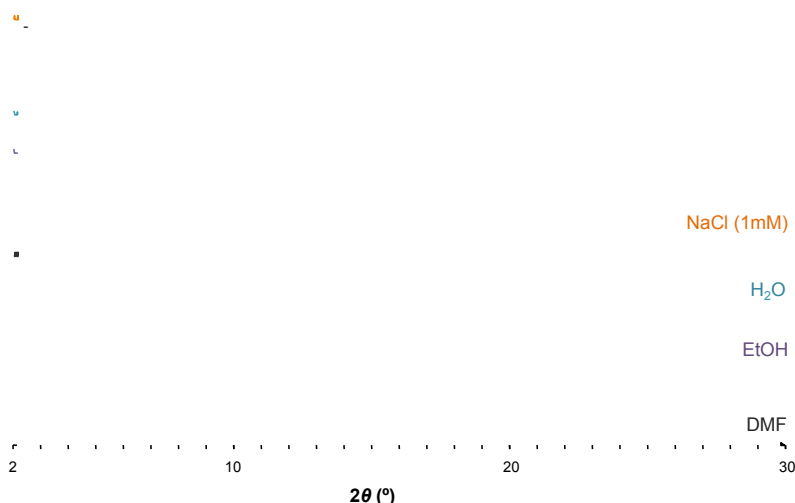


Figura 2.52. Difractogramas de RX en polvo de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** tras los estudios de estabilidad en diferentes medios.

Con el fin de investigar en profundidad la estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** dispersadas en agua MilliQ (10% de amplitud, 1 minuto), la evolución del tamaño de las mismas se estudió durante 24 horas. Debe destacarse que durante todo el estudio no se aprecian cambios en el tamaño de las nanopartículas, ni en los valores de polidispersión. De hecho, tras 24 horas, se obtienen tamaños de partícula de 110 ± 20 nm (PDI = 0.5) (Figura 2.53). Un comportamiento similar se observa para el potencial ζ , que permanece estable en estas condiciones, con un valor promedio de -20 ± 1 mV. Estos resultados contrastan con los obtenidos para las nanopartículas de **MIL-100(Fe)**, que tienden a agregarse cuando se dispersan en agua MilliQ, alcanzando un tamaño de partícula de $1 \mu\text{m}$ tras 24 horas.¹⁷ Sin embargo, los datos de difracción de RX del material **ZnBDP_OH** suspendido indican una disminución significativa de su cristalinidad tras 6 horas, y una completa amorfización tras 24 horas, así como una pérdida de masa del 38.2% como consecuencia de la degradación de la matriz porosa (Figura 2.54).

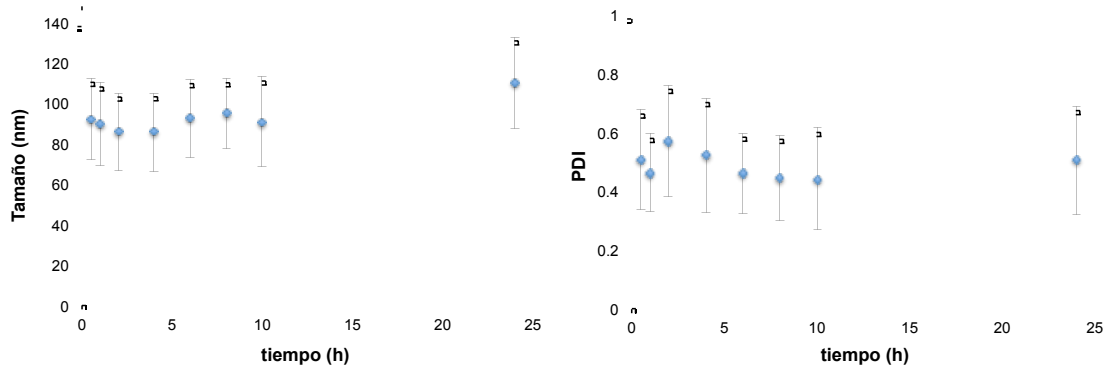


Figura 2.53. Estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en agua MilliQ en función del tiempo. Tanto el tamaño de partícula (izquierda) como los valores de polidispersión (PDI, derecha) permanecen constantes durante 24 horas.

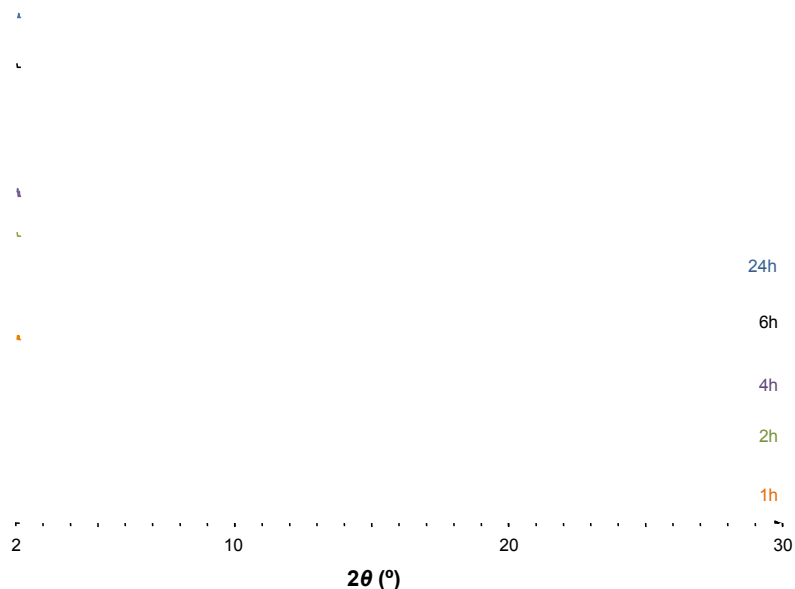


Figura 2.54. Difractogramas de RX en polvo de **ZnBDP_OH** tras el tratamiento con agua MilliQ durante 24 horas.

Por otro lado, se ha demostrado que el pH puede afectar a la carga superficial (potencial ζ) y, por lo tanto, al tamaño hidrodinámico de las nanopartículas que es un factor fundamental para su aplicación como sistemas liberadores de fármacos.¹⁸ En este contexto, se ha estudiado el efecto del pH en el valor de potencial ζ y en el tamaño de partícula de la serie **ZnBDP_X** (Figura 2.55). Debe destacarse que dependiendo de la funcionalización del ligando orgánico, cada nanoMOF presenta un comportamiento diferente a lo largo de la escala de pH. Los resultados muestran que los puntos isoeléctricos (donde el valor de potencial ζ es igual a

cero) de la serie **ZnBDP_X** se encuentran a valores de pH bajos, como por ejemplo 2.67 y 2.14 para **ZnBDP_NO₂** y **ZnBDP_OH**, respectivamente (Figura 2.55). Por lo tanto, a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, las nanopartículas de **ZnBDP_X** tienen cargas superficiales positivas, con valores de potencial ζ entre + 8 mV (**ZnBDP_NH₂**) y + 25 mV (**ZnBDP_OH**), que se relacionan con la presencia de cationes zinc hidratados en la superficie de las nanopartículas. Por el contrario, a valores de pH por encima del punto isoeléctrico las nanopartículas presentan cargas superficiales negativas, alcanzando valores de potencial ζ de - 40 mV a pH = 12. Este hecho, puede relacionarse con la posible formación de residuos hidroxozincato en la superficie de las nanopartículas. Para los materiales **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_NO₂**, se forman agregados mayores a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico, con tamaños máximos a pH = 3 de 422 ± 100 y 673 ± 135 nm, respectivamente. Este hecho se debe al bajo valor neto de potencial ζ en este rango de pH, lo que sugiere que las repulsiones electrostáticas no son suficientes para impedir la agregación de las nanopartículas. A valores de pH por encima de 4, se obtienen valores netos de potencial ζ mayores y, por lo tanto, las repulsiones electrostáticas aumentan y dominan sobre las fuerzas de van der Waals. Así, la agregación de las nanopartículas de **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_NO₂** se suprime y el tamaño de las partículas disminuye a valores cercanos a 100 nm (Figura 2.55). Debe destacarse que los mejores resultados se obtienen para el derivado **ZnBDP_OH**, ya que no se observa agregación en todo el rango de pH y el tamaño de partícula (< 120 nm) se mantiene constante. Estos resultados pueden estar relacionados con la naturaleza polar del residuo fenol, que permite que se produzcan reacciones de protonación/desprotonación, que den lugar a valores netos de potencial ζ altos en todo el rango de pH. Por tanto, cuanto mayores sean los valores netos de potencial ζ , mayores serán las fuerzas electrostáticas entre partículas lo que conllevará un aumento en la estabilidad de las nanopartículas de **ZnBDP_OH**. Finalmente, se observan grandes agregados de **ZnBDP** en el rango de pH entre 1 y 9, con tamaños de partícula de 285 nm (pH = 1) a 485 nm (pH = 9). El mayor tamaño para los agregados de **ZnBDP** se encuentra a pH = 6 con un valor de 860 nm (Figura 2.55). Una vez más, la baja estabilidad coloidal de este sistema está

relacionada con el bajo valor neto de potencial ζ (desde - 10 a + 10 mV) en este rango de pH. Este fenómeno puede deberse a la falta de residuos polares en los ligandos BDP. Hay que destacar que a valores de pH mayores (de 10 a 12), aumentan los valores netos de potencial ζ , y como consecuencia, disminuye el tamaño de las nanopartículas (por debajo de 150 nm). De nuevo, estos resultados están de acuerdo con la formación de residuos hidroxozincato en la superficie de las nanopartículas.

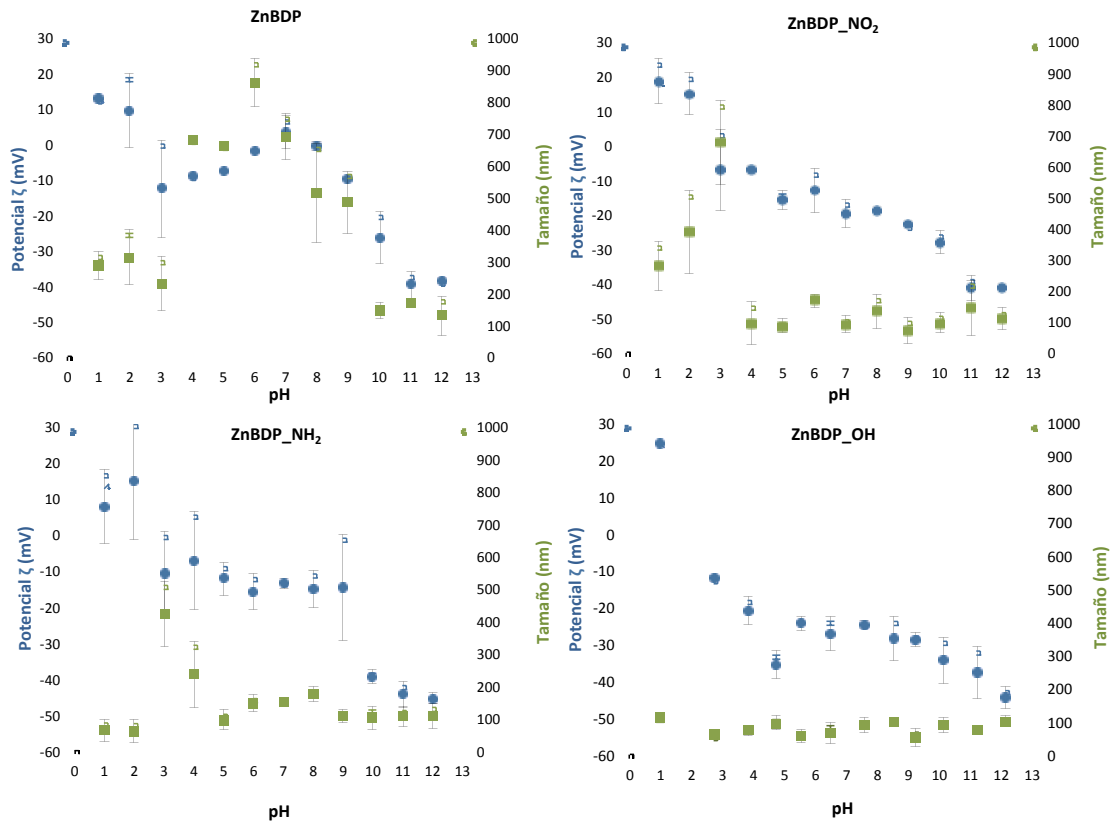


Figura 2.55. Tamaño de partícula (verde, derecha) y valores de potencial ζ (azul, izquierda) de la serie **ZnBDP_X** en función del pH.

Por otra parte, se estudió mediante difracción de rayos X en polvo la estabilidad de las nanopartículas de **ZnBDP_X** a diferentes pHs (Figura 2.56). Los resultados demuestran que la degradación de la matriz porosa se produce en condiciones muy ácidas (pH 1.2, condiciones gástricas) o condiciones básicas (pH > 10) (Figura 2.56). De acuerdo con el diagrama de Pourbaix,¹⁹ podemos concluir que a pH < 7.5 se forman especies solubles de Zn(II), mientras que a pH > 8 se forman hidroxio especies.

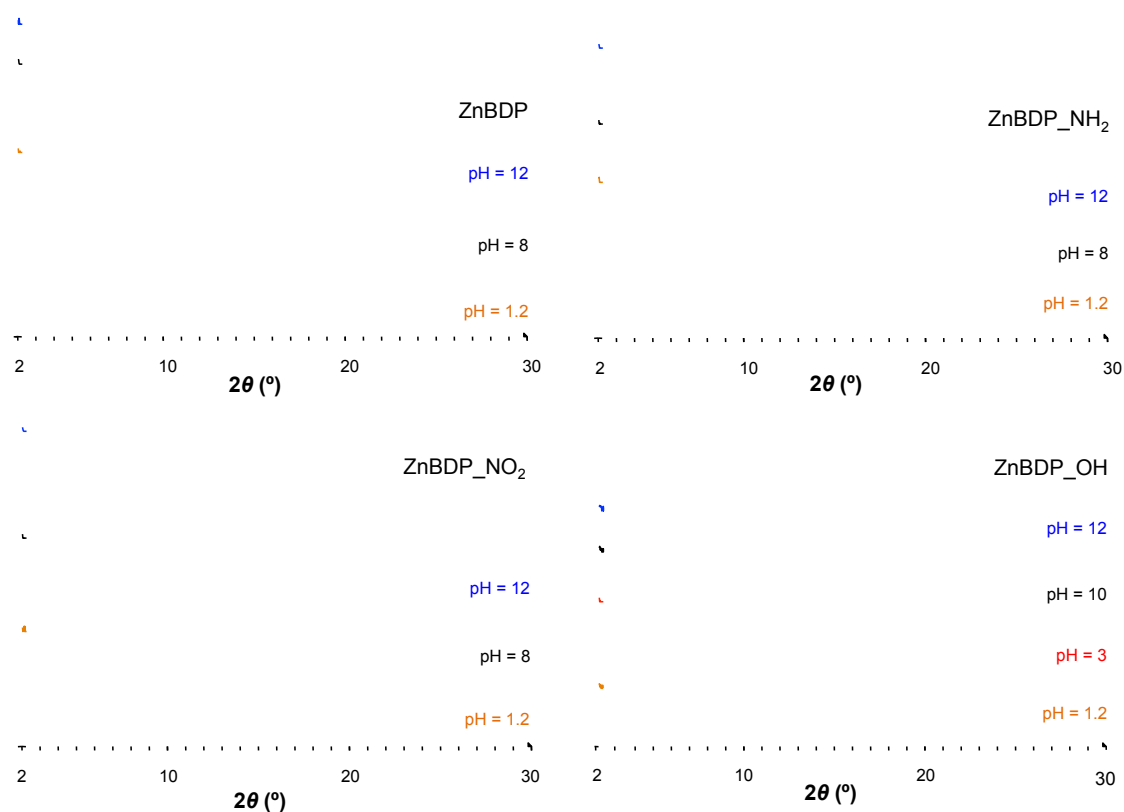


Figura 2.56. Difractogramas de RX en polvo de la serie **ZnBDP_X** tras su tratamiento en agua MilliQ a diferentes pHs.

Para completar el estudio, se investigó el efecto de medios fisiológicos más complejos con especies potencialmente desestabilizantes (como por ejemplo iones, proteínas, etc.) en la estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH**. Asimismo, se analizó el papel de electrolitos en concentraciones altas, como por ejemplo NaCl (que presenta una concentración de 138 mM en el suero fisiológico), y de otros electrolitos minoritarios, como el PO_4^{3-} , que, a concentraciones bajas, son capaces de coordinarse a los centros metálicos que actúan como ácidos de Lewis, e incluso pueden desplazar a los ligandos coordinados al metal dando lugar a la degradación de las nanopartículas. Otros componentes mayoritarios del suero fisiológico son las proteínas, que juegan un papel fundamental en la estabilidad coloidal de estos sistemas en condiciones intravenosas.^{20, 21} Teniendo en cuenta todo lo anterior, se llevó a cabo el estudio del efecto de los iones fosfato, así como de la albúmina (la proteína plasmática más abundante en mamíferos) en la estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en condiciones intravenosas. En primer lugar, se estudió la

estabilidad de las nanopartículas en tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) (138 mM NaCl, 2.74 mM KCl y 10.0 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH = 7.4), en presencia o ausencia de albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (0.54% y 5.4% p/v de BSA) a 310 K durante 10 minutos y 24 horas. Hay que destacar que, con el fin de evaluar el impacto de la albúmina en la estabilidad coloidal, uno de los medios se preparó con una concentración de albúmina más alta que la concentración fisiológica normal en humanos (que está entre 3.5 – 5% p/v). Los resultados muestran que el tamaño de las nanopartículas se mantiene constante a tiempos cortos (10 minutos, Figura 2.57), evolucionando desde 120 nm en PBS+BSA a 200 nm en PBS. El mayor tamaño de partícula obtenido en PBS en comparación con el tamaño en agua MilliQ (110 nm, Tabla 2.4) está relacionado con el grado de agregación de las nanopartículas, como consecuencia de la disminución del valor neto del potencial ζ desde - 22 mV (en agua MilliQ) hasta - 8 mV en PBS. Según la teoría clásica de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), este comportamiento se debe a la cancelación del potencial electrostático repulsivo entre partículas cercanas como consecuencia de la presencia de electrolitos en el medio.²² Por otra parte, el menor tamaño de las nanopartículas en PBS+BSA en comparación con PBS podría explicarse teniendo en cuenta la deposición de la proteína en la superficie externa de las nanopartículas de **ZnBDP_OH**. De hecho, el potencial ζ negativo puede atribuirse a la formación de la corona proteica alrededor de las partículas ya que la albúmina presenta carga negativa a pH 7.4 (punto isoeléctrico = 4.7).²³ Sin embargo, tanto en PBS como en PBS+BSA, los valores del potencial ζ para las nanopartículas de **ZnBDP_OH** son similares (\approx - 9 mV, Tabla 2.4) lo que no explica a simple vista las diferencias en la estabilidad coloidal de este sistema en ambos medios fisiológicos. Finalmente, debe destacarse que la albúmina es demasiado voluminosa para ser adsorbida en las cavidades del MOF, ya que presenta una forma elipsoidal de dimensiones 4 x 14 nm (semieje menor y mayor, respectivamente).²⁴ Por tanto, si comparamos el tamaño de las nanopartículas en PBS+BSA y en agua MilliQ (110 nm), se observa un incremento de tamaño de aproximadamente 10 - 20 nm en las primeras, lo

que de nuevo confirmaría la deposición de la albúmina sobre la superficie de las nanopartículas.

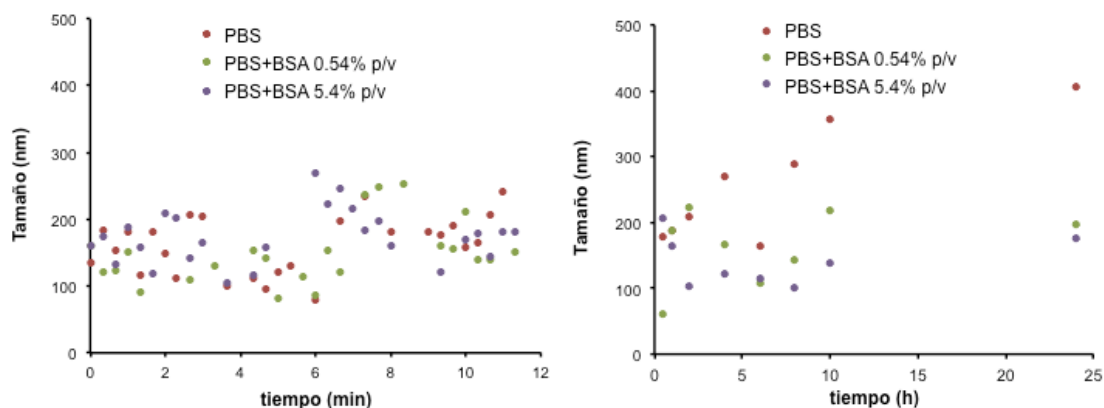


Figura 2.57. Cinética de agregación de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** a corto plazo (10 min) (izquierda) y durante un período largo (24 h) (derecha) a 310 K en **PBS**, **PBS+BSA 0.54% p/v** y **PBS+BSA 5.4% p/v**. Con el fin de facilitar su comprensión, se han omitido las barras de error que presenta cada punto. Se pueden encontrar las gráficas completas en el Anexo A.

Medio	Tamaño*	Potencial ζ *	Tamaño [#]	Potencial ζ [#]
Agua MilliQ	110 ± 25	- 22 ± 2	110 ± 25	- 18 ± 1
NaCl (1mM)	105 ± 10	- 21 ± 3	-	-
PBS	200 ± 25	- 8 ± 2	400 ± 130	- 14 ± 3
PBS+BSA 0.54 %	120 ± 40	- 10 ± 2	195 ± 60	- 13 ± 3
PBS+BSA 5.4 %	130 ± 30	- 9 ± 3	175 ± 70	- 12 ± 1
SIF	90 ± 15	- 15 ± 3	130 ± 50	- 14 ± 3
//s-SIF	115 ± 1	- 18 ± 2	105 ± 10	- 31 ± 2
//s-SIF+pancreatina 0.1 %	160 ± 5	- 13 ± 3	350 ± 70	- 15 ± 3
//s-SIF+pancreatina 1 %	510 ± 30	- 9 ± 2	>>1000	- 11 ± 1
//s-SIF+mucina 0.05 %	410 ± 70	- 16 ± 3	80 ± 40	- 10 ± 1

* Valores correspondientes a las medidas a los 30 segundos tras la adición del medio doblemente concentrado a la suspensión de nanopartículas en agua MilliQ previamente dispersadas (para más detalles véase el Anexo A).

[#] Valores tras 24 horas.

Tabla 2.4. Tamaño de partícula (nm) y potencial ζ (mV) de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en diferentes medios biológicos simulados a 310 K.

Para poder realizar experimentos *in vivo* adecuados se requiere la evaluación de la estabilidad estructural y coloidal de las nanopartículas durante tiempos más largos. Por este motivo, también se estudió la estabilidad coloidal del **ZnBDP_OH** en PBS y PBS+BSA durante 24 horas (Figura 2.57) y se comparó con el mismo estudio en agua MilliQ. Hay que destacar que aunque hay una clara agregación de las nanopartículas en PBS, con un tamaño final de 400 ± 130 nm, la adición de albúmina (PBS+BSA 0.54% p/v y 5.4% p/v) da lugar a la estabilización de las nanopartículas durante períodos más largos, observándose partículas de 195 ± 60 nm (PBS+BSA 0.54% p/v) y 175 ± 70 nm (PBS+BSA 5.4% p/v) tras 24 horas (Tabla 2.4). La menor estabilidad coloidal que presenta el **ZnBDP_OH** en PBS en comparación con agua MilliQ podría estar relacionada con la evolución del potencial ζ tras 24 horas, ya que el valor neto de potencial ζ es menor en PBS (-14 ± 3 mV) que en agua MilliQ (-18 ± 1 mV) (Tabla 2.4, Figura 2.58). Sin embargo, debe destacarse que a pesar de la clara reducción en el valor neto del potencial ζ (hasta ≈ -13 mV) cuando se incuban las nanopartículas en PBS+BSA (Tabla 2.4), estos sistemas poseen una buena estabilidad coloidal en este último medio (Figura 2.57). Tal y como demostraron Horcajada y sus colaboradores,¹⁷ la formación de la corona de proteínas alrededor de la superficie de las nanopartículas del MOF mejora la estabilidad coloidal de la suspensión, impidiendo la atracción entre las partículas mediante la introducción de un impedimento estérico. Teniendo en cuenta que la albúmina es la proteína más importante presente en el plasma y, consecuentemente, sería el mayor componente de la corona proteica justo después de la administración intravenosa de nanopartículas,^{25, 26} estos resultados sugieren que la formación de la corona proteica tras la administración intravenosa del MOF aseguraría la estabilidad coloidal de las nanopartículas en el suero.

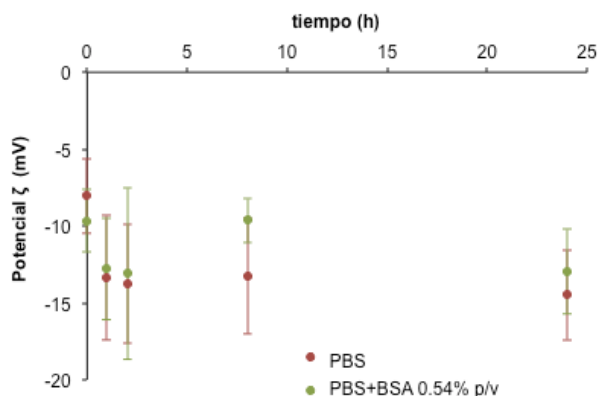


Figura 2.58. Evolución del potencial ζ de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** durante 24 h en **PBS** y **PBS+BSA 0.54% p/v**.

Por otro lado, se estudió mediante difracción de RX en polvo la cristalinidad del MOF tras el tratamiento en los anteriores medios (PBS, PBS+BSA 0.54% y 5.4% p/v) durante 24 horas (Figura 2.59). Los resultados indican que la estructura cristalina se mantiene en PBS+BSA aunque, tras 24h de incubación, la cristalinidad del **ZnBDP_OH** disminuye, debido a la degradación parcial de la estructura en las condiciones ensayadas. De hecho, aunque la cristalinidad del compuesto **ZnBDP_OH** permanezca prácticamente inalterada tras 6 horas de incubación en PBS, tiempos mayores dan lugar a una amorfización significativa del material, así como a una pérdida de masa del 14.5%, como consecuencia de la degradación de la matriz porosa. Por otro lado, después de la incubación del **ZnBDP_OH** en PBS+BSA 0.54% p/v se obtienen difractogramas con picos más intensos y estrechos en comparación con los obtenidos en PBS. Esto último sugiere que se produce una menor degradación de la matriz porosa en este medio fisiológico gracias a la formación de una corona proteica alrededor de las nanopartículas, previniendo su degradación frente a las sales presentes en el PBS. Este comportamiento también se ha observado cuando nanopartículas de **MIL-100(Fe)** se suspenden en PBS+BSA.¹⁷

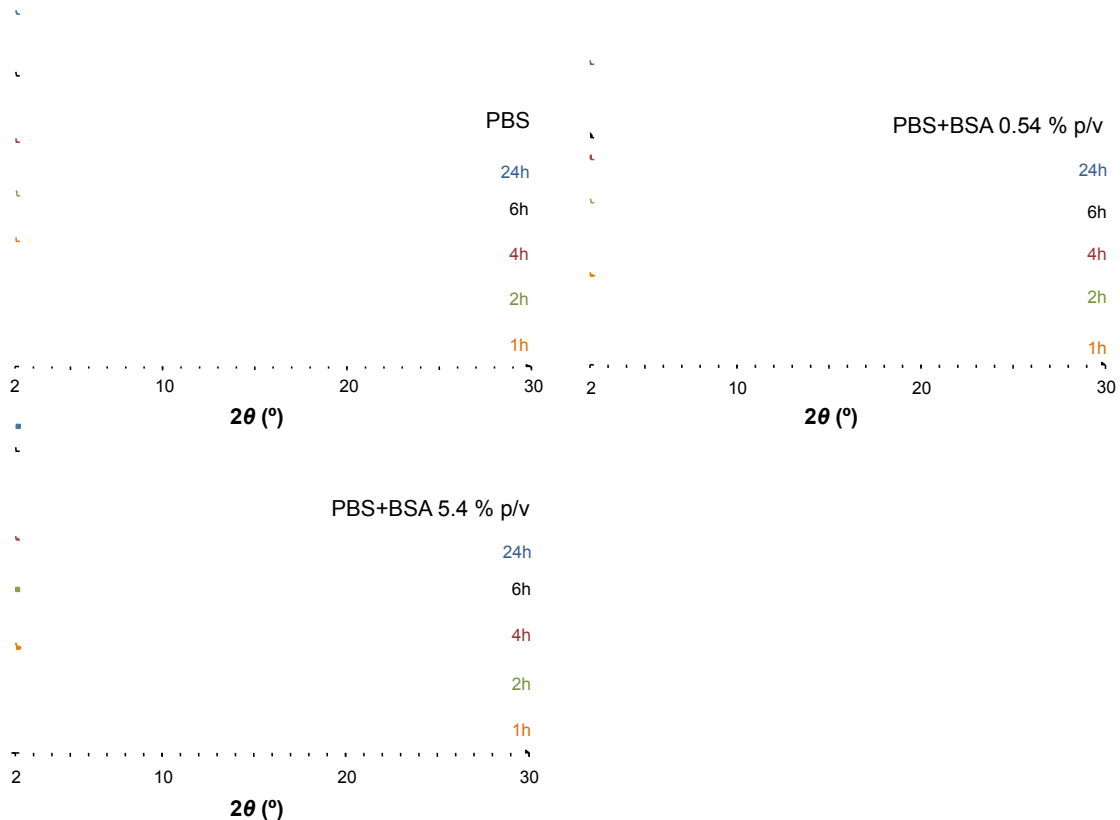


Figura 2.59. Evolución de los difractogramas de RX en polvo del **ZnBDP_OH** durante 24 horas en condiciones intravenosas.

Por otro lado, aunque la administración parenteral de medicamentos proporciona una acción inmediata, se prefiere la administración oral ya que es menos invasiva. En este contexto, se decidió estudiar la estabilidad coloidal de las suspensiones de **ZnBDP_OH** en condiciones que simulan a las del tracto digestivo. Para realizar este estudio, se llevaron a cabo experimentos a corto (10 minutos) y largo plazo (24 horas) en dos medios diferentes: *i*) medio intestinal simulado preparado a diferentes concentraciones (abreviado como SIF, *Simulated Intestinal Fluid*, 50.0 mM KH_2PO_4 y 15.4 mM NaOH a pH 6.8, 310 K), y *ii*) SIF de baja fuerza iónica (SIF diluido 1/25, abreviado como *lis*-SIF, *low-ionic-strength*) suplementado con pancreatina (0.1% p/v y 1% p/v). Mediante el uso de fluido intestinal diluido (*lis*-SIF) se pretende evitar la posible desestabilización del sistema causada por las sales presentes en el medio, ya que se trata de un medio con una concentración de electrolitos baja que permite diferenciar y estudiar el efecto de la pancreatina en la estabilidad coloidal de la suspensión. Finalmente, se analizó la potencial interacción del **ZnBDP_OH** con la mucosa intestinal en una suspensión de mucina (0.5% p/v)

en *lis*-SIF. Debe destacarse que la estabilidad coloidal de **ZnBDP_OH** en condiciones gástricas (pH = 1.2, 310 K) tras 24 horas no ha podido estudiarse ya que, de acuerdo con los datos de difracción de RX, este compuesto se degrada rápidamente en medio muy ácido. De hecho, tras 24 horas en HCl (pH = 1.2) se produce una pérdida de masa del 85.1% como consecuencia de la degradación de la matriz porosa. Sin embargo, para una hipotética administración biológica, la inestabilidad de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en condiciones ácidas puede superarse utilizando una cobertura protectora que previniera su degradación hasta que se alcanzara el tracto intestinal.

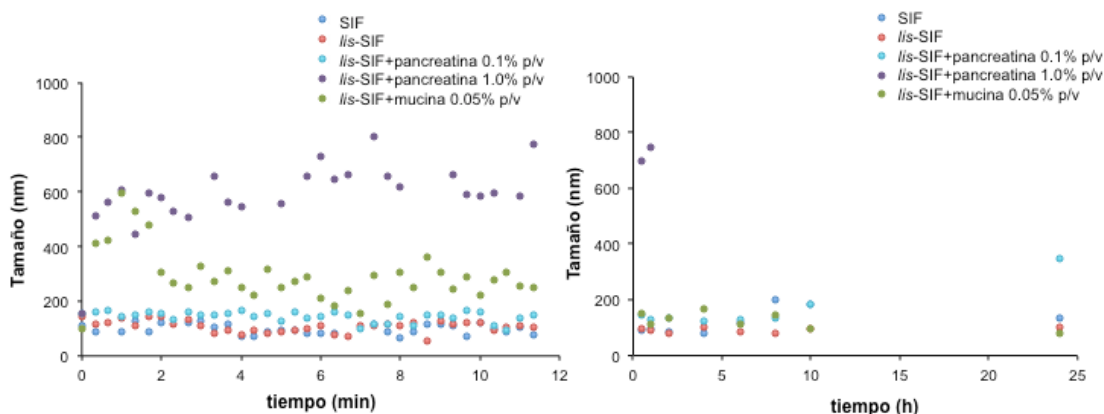


Figura 2.60. Cinética de agregación de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** a tiempos cortos (10 min, izquierda) y durante un período largo (24 h, derecha) a 310 K en **SIF** , ***lis*-SIF** (**SIF diluido 1/25**) , ***lis*-SIF+pancreatina 0.1% p/v**, ***lis*-SIF+pancreatina 1.0% p/v** y ***lis*-SIF+mucina 0.05% p/v**. Con el fin de facilitar su comprensión se han omitido las barras de error que presenta cada punto. Se puede encontrar la gráfica completa en el Anexo A.

Los datos de estabilidad coloidal muestran que en fluido intestinal simulado (tanto concentrado como diluido y sin enzimas o mucina), las nanopartículas de **ZnBDP_OH** presentan un comportamiento similar al observado en agua MilliQ (Figura 2.60). De hecho, se observan agregados polidispersos (PDI \approx 0.6) de \approx 100 nm que sufren ligeros cambios en el tamaño medio (\approx 20 nm) durante las 24 horas que dura el experimento. Este comportamiento contrasta con la baja estabilidad coloidal del **ZnBDP_OH** en PBS, donde se forman agregados mayores de 400 ± 130 nm tras 24 horas de incubación. La gran estabilidad del nanoMOF en SIF puede atribuirse a la menor concentración de sales que presenta el medio en comparación con PBS. En el caso de *lis*-SIF, la gran estabilidad coloidal puede también relacionarse con la evolución de la carga superficial neta que presentan las

nanopartículas. Tras 24 horas en *lis*-SIF, se obtiene un valor de potencial ζ de -31 ± 2 mV, mayor que el obtenido en PBS donde se observa una clara disminución del valor del potencial ζ (-14 ± 3 mV) (Tabla 2.4, Figura 2.61).

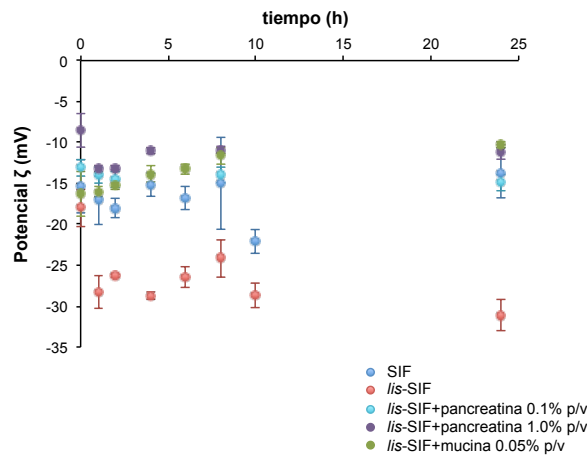


Figura 2.61. Evolución del valor del potencial ζ de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** durante 24 horas en diferentes medios fisiológicos: SIF, *lis*-SIF (SIF diluido 1/25), *lis*-SIF+pancreatina 0.1% p/v, *lis*-SIF+pancreatina 1.0% p/v y *lis*-SIF+mucina 0.05% p/v.

Con el fin de estudiar en profundidad la interacción de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** con las enzimas secretadas por el páncreas en el tracto intestinal, se ha estudiado la estabilidad coloidal del **ZnBDP_OH** en *lis*-SIF suplementado con pancreatina (0.1% p/v y 1% p/v) durante períodos cortos (10 minutos) y largos (24 horas) (Tabla 2.4 y Figura 2.60). En este caso, durante el experimento llevado a cabo hasta los 10 minutos, se observó un comportamiento diferente dependiendo de la concentración de la enzima. Mientras que en *lis*-SIF+pancreatina 0.1% p/v, no se observó una gran agregación de las nanopartículas (con un tamaño de 160 ± 5 nm), en *lis*-SIF+pancreatina 1% p/v, la agregación es significativa en los primeros 30 segundos (con un tamaño de 510 ± 30 nm), dando lugar a agregados mayores de 600 nm a los 10 minutos. Hay que destacar que la reducción de la carga superficial de las nanopartículas debido a la presencia de concentraciones bajas de pancreatina desde -18 ± 2 mV (en *lis*-SIF) a -13 ± 3 mV (en *lis*-SIF+pancreatina 0.1% p/v), así como el aumento del tamaño de partícula (≈ 50 nm), indican la formación inicial de una cobertura enzimática alrededor de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** (Tabla 2.4, Figura 2.61). Sin embargo, en las disoluciones de pancreatina al 1% en p/v se observa un comportamiento diferente que pueden atribuirse a la combinación de dos

efectos: *i*) la alta viscosidad de la solución de pancreatina al 1% en p/v, y *ii*) la reducción de las fuerzas inducidas por la corona proteica.²⁷ La baja estabilidad coloidal de las nanopartículas a tiempos cortos concuerda con la importante reducción del valor neto del potencial ζ desde -18 ± 2 mV (en *lis-SIF*) a -9 ± 2 mV (en *lis-SIF*+pancreatina 1% p/v). Además, independientemente de la concentración de pancreatina, se produce un incremento importante en el tamaño de partícula tras 24 horas. Hay que destacar que en el medio donde la pancreatina no se encuentra diluida (*lis-SIF*+pancreatina 1% p/v), el tamaño de partícula alcanza valores mayores a 800 nm en sólo 2 horas ($\gg 1 \mu\text{m}$ tras 24 horas), mientras que en medio diluido (*lis-SIF*+pancreatina 0.1% p/v) se alcanza un tamaño de partícula de ≈ 350 nm tras 24 horas (Tabla 2.4). Como en el caso de los estudios a corto plazo, medios con mayor concentración de pancreatina dan lugar a agregados mayores. Estos resultados están de acuerdo con la disminución observada del valor neto del potencial ζ tras 24 horas de suspensión, desde -31 ± 2 mV (*lis-SIF*) hasta -15 ± 3 mV (*lis-SIF*+pancreatina 0.1%) y -11 ± 1 mV (*lis-SIF*+pancreatina 1%) (Tabla 2.4, Figura 2.61).

Finalmente, se estudió la interacción entre el **ZnBDP_OH** y la mucosa intestinal mediante la suspensión de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en *lis-SIF* suplementado con mucina al 0.05% p/v (Tabla 2.4, Figura 2.60). En este caso, se produce una importante agregación del sistema a tiempos cortos (10 min), observándose partículas de 300 - 400 nm. Sin embargo, se consigue una estabilidad coloidal adecuada tras la incubación de las nanopartículas en este medio durante 24 horas, con un importante descenso del tamaño de partícula (80 ± 45 nm). De hecho, el tamaño de estas partículas puede considerarse similar al obtenido en *lis-SIF* (105 ± 10 nm). Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que la baja concentración de mucina en el medio impide la formación de una corona proteica alrededor de las nanopartículas. Sin embargo, al igual que ocurría en el medio suplementado con pancreatina, el valor neto del potencial ζ tras 24 horas de suspensión en *lis-SIF*+mucina disminuye desde -16 ± 3 mV hasta -10 ± 1 mV, por lo que se puede afirmar que existe una cierta interacción entre la mucina y las nanopartículas de **ZnBDP_OH** (Tabla 2.4, Figura 2.61).

Debe destacarse que, a excepción de algunas enfermedades (como por ejemplo el cáncer),²⁸ el contenido de mucina en la mucosa gastrointestinal se encuentra entre el 2 y el 5% en peso, a pesar de las diferencias significativas en la glicosilación. Sin embargo, en nuestros estudios se han utilizado concentraciones de mucina mucho menores. Esto se debe a que el empleo de concentraciones superiores de mucina provoca una considerable agregación de las nanopartículas de **ZnBDP_OH**. Por ejemplo, el uso de medios con una concentración de mucina del 0.5% p/v da lugar a un rápido incremento en el tamaño de partícula ($> 1 \mu\text{m}$, en menos de un minuto) (Figura 2.62). Este resultado demuestra que las nanopartículas de **ZnBDP_OH** son capaces de interactuar fuertemente con concentraciones de mucina mayores a 0.05% p/v, lo que sugiere un cierto grado de bioadhesión de las nanopartículas que puede promover su inserción en la mucosa intestinal tras la administración oral.

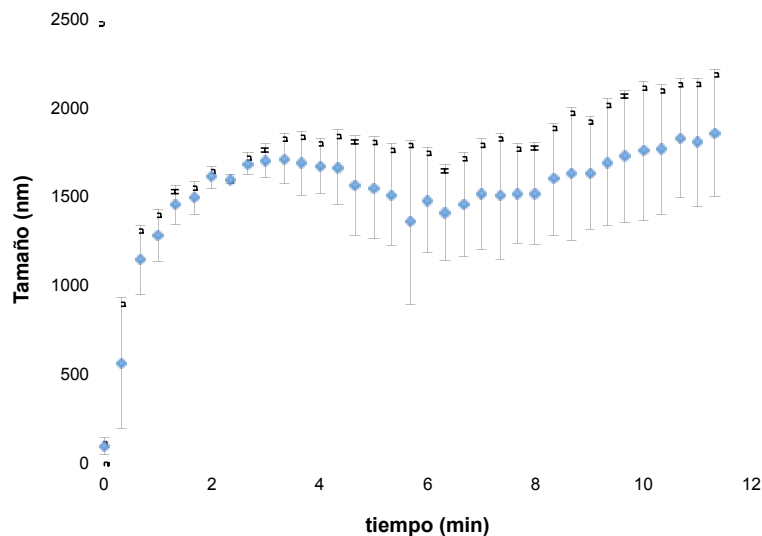


Figura 2.62. Evolución del tamaño (nm) de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** durante 12 minutos cuando se incuban en *lis*-SIF enriquecido con mucina al 0.5% p/v.

Por otro lado, mediante difracción de RX en polvo se estudió la cristalinidad del **ZnBDP_OH** tras someterlo a condiciones intestinales (*lis*-SIF, *lis*-SIF+pancreatina 1% p/v y *lis*-SIF+mucina 0.5% p/v) durante 24 horas (Figura 2.63). Aunque ésta no se ve afectada significativamente, los resultados muestran que el compuesto **ZnBDP_OH** sufre una pequeña pérdida de cristalinidad en todos los medios tras 24 horas de incubación. Este hecho puede atribuirse a la degradación parcial de la matriz porosa en estas

condiciones, puesto que tras suspender la matriz porosa activada en SIF durante 24 horas se produce una pérdida de masa del 29.4%. Hay que destacar que tras 24 horas de suspensión en *lis*-SIF, se produce una amorfización mayor que la observada en *lis*-SIF suplementado con pancreatina o mucina. Este hecho confirma la formación de una corona proteica en la superficie de las nanopartículas (en *lis*-SIF+pancreatina) o de cierta interacción entre las éstas y la proteína (en *lis*-SIF+mucina), de forma que las nanopartículas se estabilizan frente a la degradación en presencia de sales. Este hecho también se ha observado para las nanopartículas de **MIL-100(Fe)** bajo las mismas condiciones digestivas simuladas.¹⁷

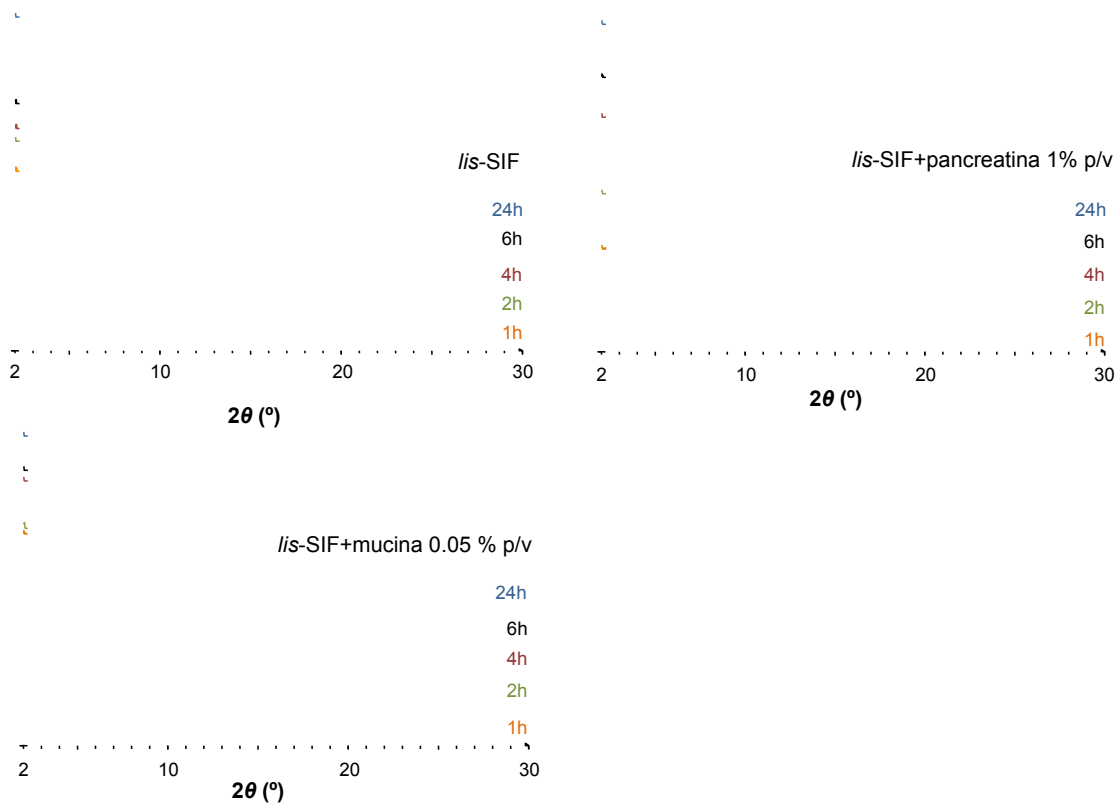


Figura 2.63. Evolución de los difractogramas de RX en polvo del **ZnBDP_OH** tras 24 horas en condiciones fisiológicas intestinales simuladas.

En definitiva, las nanopartículas de **ZnBDP_OH** presentan una peor estabilidad coloidal en condiciones fisiológicas intestinales simuladas que en condiciones intravenosas.

2.4.2 Aplicación en la incorporación de los fármacos RAPTA-C y mitoxantrona

Con el objetivo de evaluar la aplicación de la serie **ZnBDP_X** ($H_2BDP = 1,4\text{-bis}(1H\text{-pirazol-4-il})\text{benceno}$, $X = H, NO_2, NH_2$ y OH) en la encapsulación y liberación de RAPTA-C y mitoxantrona, en primer lugar se estudió la citotoxicidad del ligando H_2BDP_X en la línea celular de macrófagos murinos (J774) mediante un ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-(2,5-difenilterazolio) (para más detalles experimentales véase Anexo A). Las pruebas de citotoxicidad confirmaron que se trata de ligandos tóxicos, puesto que se obtuvieron valores de viabilidad celular bajos ($< 24\%$) al incubar a los macrófagos con una concentración de ligandos de 20 ug/mL durante 24 horas. Estos resultados contrastan con la baja citotoxicidad del ligando benceno-1,3,5-tricarboxilato del compuesto **MIL-100(Fe)** que presenta un valor de IC_{50} de 0.7 mg/mL . Sin embargo, la citotoxicidad del ligando depende de su tasa de liberación al medio, que está determinada por el grado de estabilidad de la red porosa **ZnBDP_X**. Por este motivo, sería interesante ampliar estos estudios con el fin de evaluar la citotoxicidad de las matrices porosas.

Posteriormente, se estudió la estabilidad química de la red porosa activada al suspenderla en MeOH con el fin de determinar si es posible usar dicho disolvente para la encapsulación de los fármacos por impregnación. Los datos de difracción de RX en polvo demuestran que la red permanece inalterada al suspenderse en MeOH durante 4 horas (Figura 2.64). Tras esta prueba inicial, se procedió al estudio de la encapsulación de los fármacos RAPTA-C y mitoxantrona en **ZnBDP_X** suspendiendo estos materiales, previamente activados, en disoluciones saturadas al 80% durante 4 horas (para más detalles experimentales véase Anexo A). Finalmente, las suspensiones se filtraron y los sólidos obtenidos se lavaron y analizaron para determinar la presencia o ausencia de los fármacos en los diferentes MOFs. Los resultados obtenidos mediante análisis elemental, UV-vis y reflectancia total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR) demuestran que el metalofármaco RAPTA-C se incorpora a todas las matrices porosas

ZnBDP_X (X = H, NO₂, NH₂ y OH) obteniéndose diferentes grados de carga (Tabla 2.5). Hay que destacar que la capacidad de adsorción de RAPTA-C en la serie **ZnBDP_X** sigue la misma tendencia que las superficies de BET de las matrices activadas: [ZnBDP]>[ZnBDP_NO₂]>[ZnBDP_NH₂]>[ZnBDP_OH]. Por lo que podemos afirmar que la capacidad de adsorción de RAPTA-C en **ZnBDP_X** depende en gran medida del área superficial de la matriz. Sin embargo, en el caso del fármaco comercial mitoxantrona, sólo se obtuvieron buenos resultados para los derivados **ZnBDP_X** (X = H y NH₂). En este sentido, una posible explicación podría estar relacionada con la presencia de grupos polares en los ligandos BDP_X (X = NO₂ y OH) que pueden dar lugar a procesos de repulsión, mientras que los ligandos BDP_X (X = H y NH₂) pueden formar puentes de hidrógeno con la mitoxantrona (Tabla 2.5).

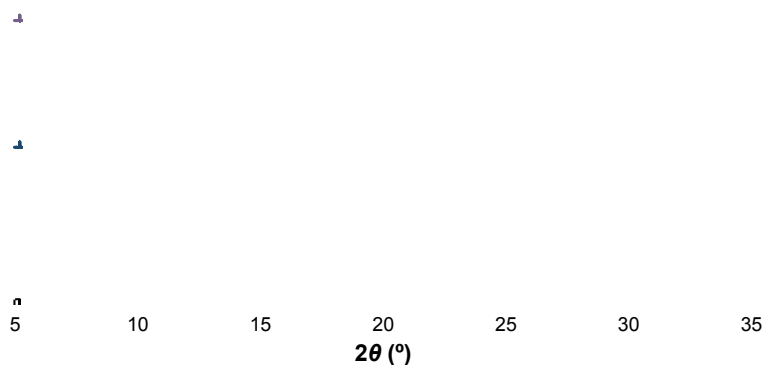


Figura 2.64. Difractogramas de RX en polvo que muestran la estabilidad de la matriz porosa **ZnBDP** (violeta) al suspenderla en MeOH (azul) durante 24 horas.

	ZnBDP	ZnBDP_NO₂	ZnBDP_NH₂	ZnBDP_OH
RAPTA-C	0.55	0.22	0.11	0.15
Mitoxantrona	0.50	-	0.20	-

Tabla 2.5. Resultados de la incorporación de los fármacos RAPTA-C y mitoxantrona en la serie **ZnBDP_X** (mmol fármaco/mmol **ZnBDP_X**).

La incorporación de los fármacos en las cavidades de la serie de nanoMOFs **ZnBDP_X** se pone de manifiesto por: *i*) la drástica disminución en la capacidad de adsorción de N₂ a 77 K, donde la superficie de BET disminuye desde 2450 m² g⁻¹ (**ZnBDP**) hasta 95 m² g⁻¹ (**ZnBDP@RAPTA-C**) y 40 m² g⁻¹ (**ZnBDP@Mitoxantrona**), desde 2278 m² g⁻¹ (**ZnBDP_NO₂**) hasta

28 m² g⁻¹ (ZnBDP_NO₂@RAPTA-C), desde 1418 m² g⁻¹ (ZnBDP_NH₂) hasta 143 m² g⁻¹ (ZnBDP_NH₂@RAPTA-C) y 60 m² g⁻¹ (ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona), y desde 1021 m² g⁻¹ (ZnBDP_OH) hasta 216 m² g⁻¹ (ZnBDP_OH@RAPTA-C) (Figura 2.65); *ii*) la presencia de algunos picos característicos del RAPTA-C o de la mitoxantrona en los espectros de IR de los nanoMOFs cargados (Figura 2.66); *iii*) la menor estabilidad térmica de las matrices porosas cargadas en comparación con los nanoMOFs originales (Figura 2.67).

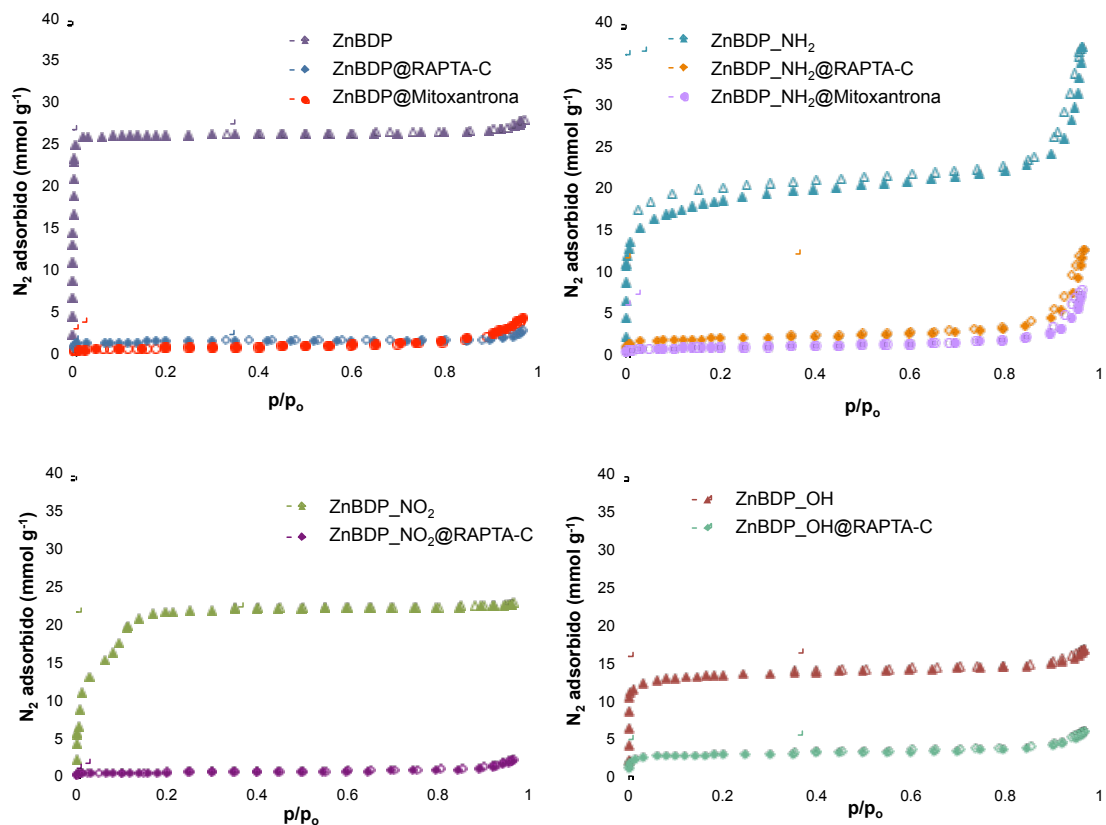


Figura 2.65. Isothermas de adsorción de N₂ a 77 K para los compuestos ZnBDP, ZnBDP@RAPTA-C, ZnBDP@Mitoxantrona, ZnBDP_NH₂, ZnBDP_NH₂@RAPTA-C, ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona, ZnBDP_NO₂, ZnBDP_NO₂@RAPTA-C, ZnBDP_OH y ZnBDP_OH@RAPTA-C. La desorción se denota con símbolos vacíos.

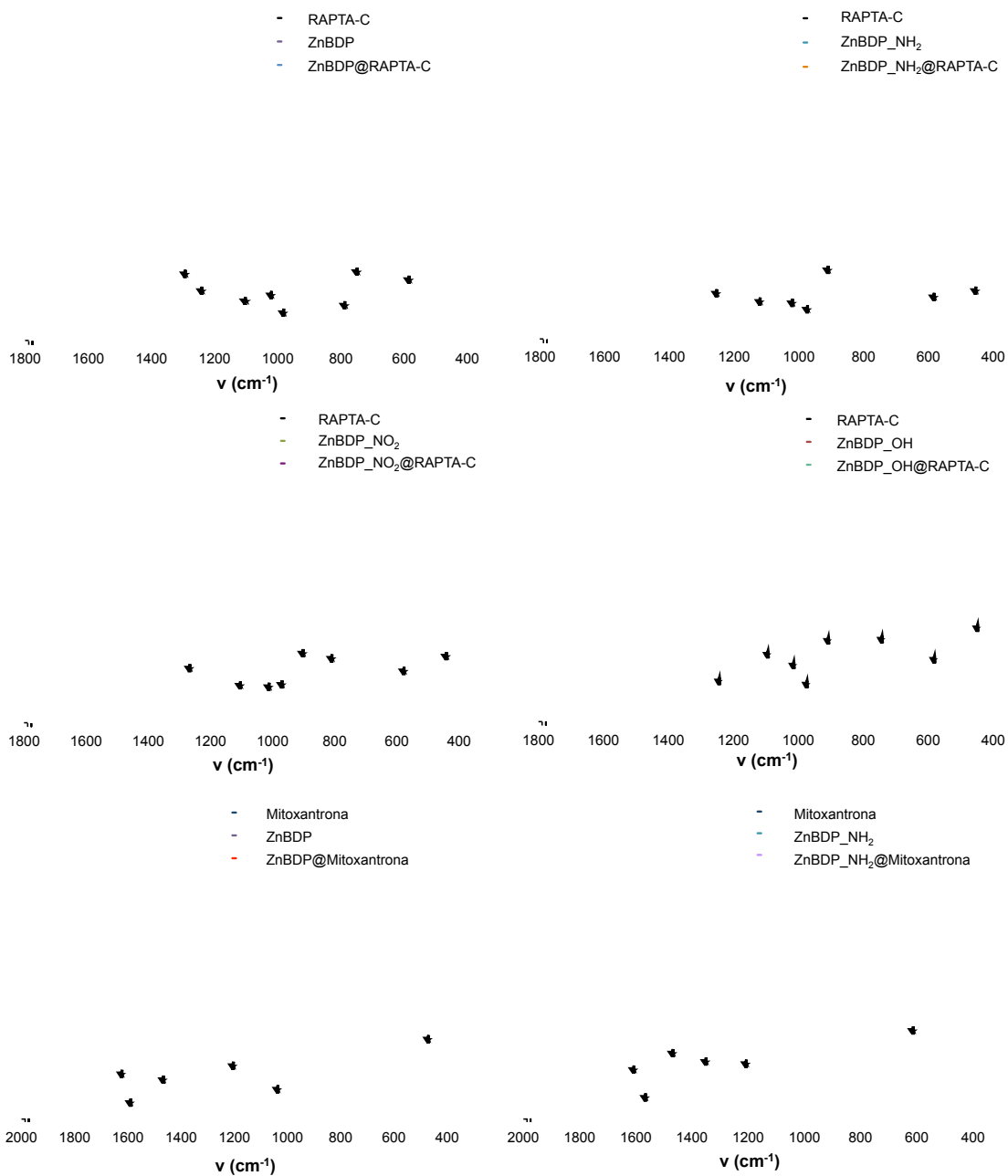


Figura 2.66. Espectros de IR de las especies **ZnBDP**, **ZnBDP@RAPTA-C**, **ZnBDP@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NH₂**, **ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NO₂**, **ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_OH**, **ZnBDP_OH@RAPTA-C**, mitoxantrona y RAPTA-C.

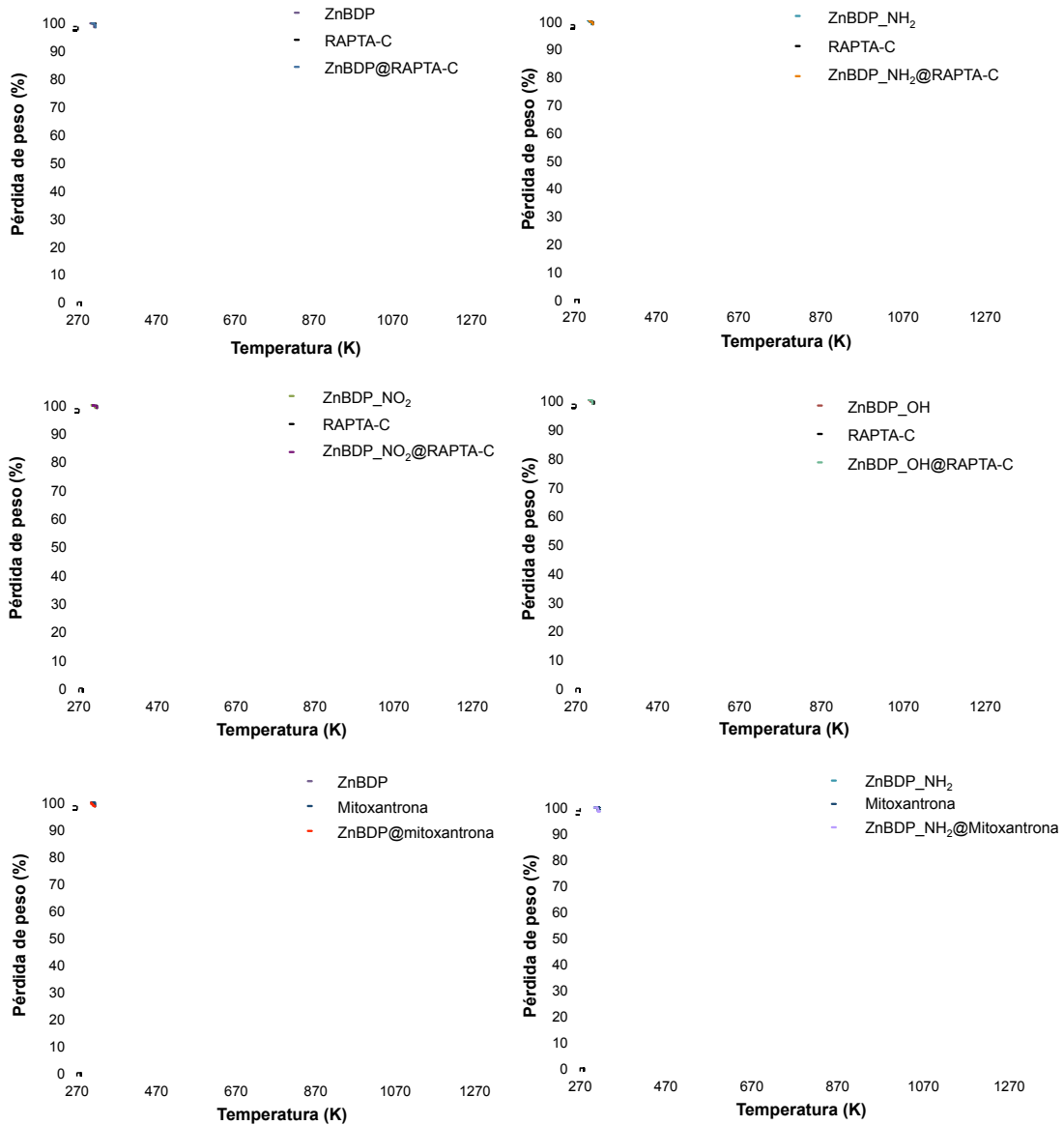


Figura 2.67. Curvas de análisis termogravimétrico de los compuestos **ZnBDP**, **ZnBDP@RAPTA-C**, **ZnBDP@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NH₂**, **ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NO₂**, **ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_OH**, **ZnBDP_OH@RAPTA-C**, mitoxantrona y RAPTA-C.

Por otro lado, también se estudió la integridad estructural de la serie **ZnBDP_X** tras la incorporación de los fármacos mediante difracción de RX en polvo. Los resultados demuestran que los patrones de difracción de los MOFs cargados varían sustancialmente en comparación con los difractogramas de los MOFs originales (Figura 2.68). Hay que destacar que la posición de algunos de los picos de los difractogramas de los MOFs cargados (**ZnBDP_X@RAPTA-C@Mitoxantrona**) coinciden con los picos de los MOFs

que contienen moléculas de DMF en sus poros **ZnBDP_X@DMF** (sin activar). Estos resultados confirman el comportamiento flexible de la red, que es capaz de expandir o contraer los poros, lo que conlleva modificaciones en los patrones de difracción.²⁹ Propiedades similares en cuanto a versatilidad y flexibilidad han sido descritas, recientemente, para la estructura **CoBDP** en procesos de incorporación y liberación de moléculas de disolvente,^{15,30} así como para la red porosa **MIL-53** en la adsorción y liberación de ibuprofeno.³¹

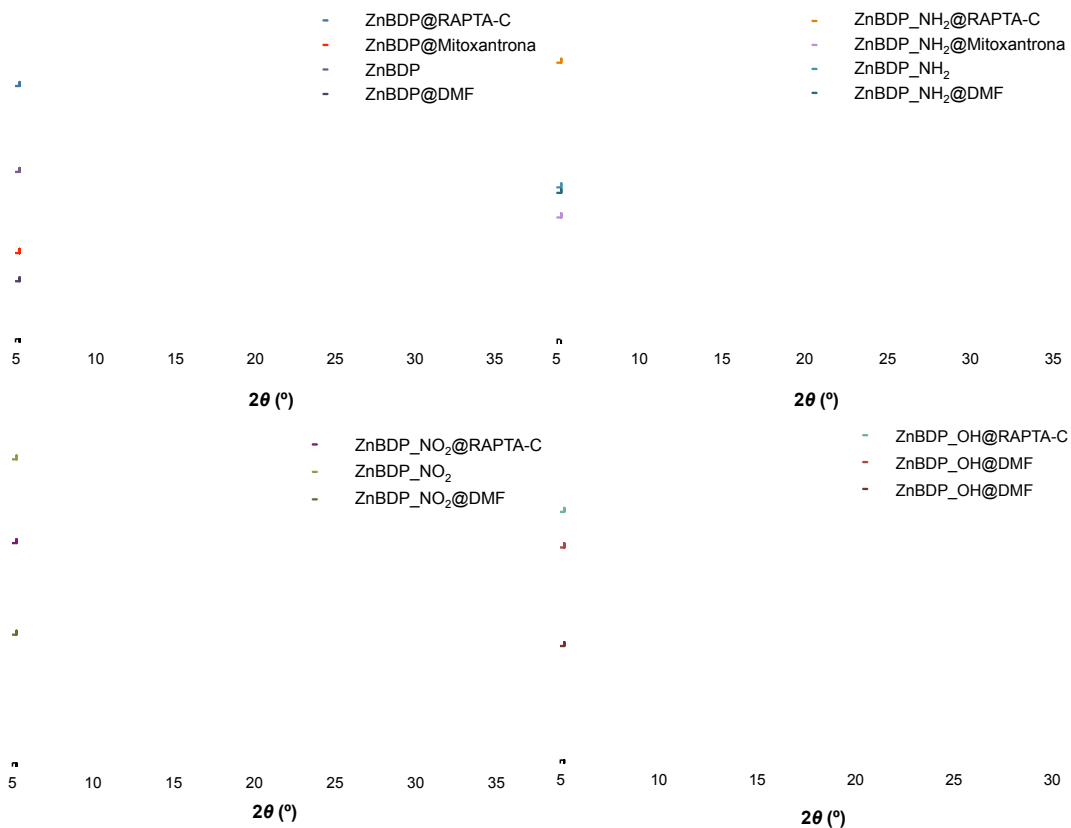


Figura 2.68. Difractogramas de RX en polvo para los compuestos **ZnBDP@DMF**, **ZnBDP**, **ZnBDP@RAPTA-C**, **ZnBDP@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NH₂@DMF**, **ZnBDP_NH₂**, **ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NO₂@DMF**, **ZnBDP_NO₂**, **ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_OH@DMF**, **ZnBDP_OH** y **ZnBDP_OH@RAPTA-C**.

Posteriormente, se estudió de forma detallada el proceso de adsorción sólido-líquido de RAPTA-C en **ZnBDP** a 298 K. Los resultados demostraron que el proceso de adsorción presenta una isoterma de tipo I (Figura 2.69), cuyos puntos se pueden ajustar a la forma lineal del modelo de Langmuir (ecuación [2.1]). Los resultados muestran un valor máximo de carga n_m de 2.07 mmol (0.959 g) de RAPTA-C por gramo de **ZnBDP**. Hay que destacar que esta gran capacidad de carga corresponde con 0.55 mmol de RAPTA-C

por mmol de **ZnBDP**, y confirma los resultados obtenidos por análisis elemental, UV-vis y reflectancia total atenuada.

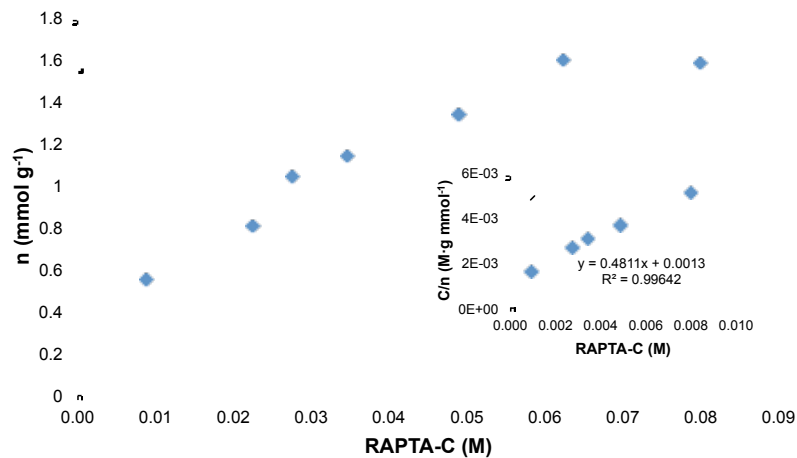


Figura 2.69. Isotherma de adsorción sólido-líquido del **ZnBDP** en una disolución acuosa de RAPTA-C a 298 K. Los datos obtenidos se ajustan al modelo lineal de Langmuir (gráfica insertada).

A continuación, se estudió la encapsulación del fármaco mitoxantrona en las matrices porosas **ZnBDP_X** ($X = H$ y NH_2). En primer lugar, se molturaron cantidades conocidas de MOF y mitoxantrona utilizando diferentes proporciones y, posteriormente, se analizaron los materiales resultantes mediante reflectancia difusa (*Diffuse Reflectance, DR*) (para más detalles experimentales véase Anexo A). En el espectro de la mitoxantrona, se observan bandas anchas de absorción que podrían estar relacionadas con una gran deslocalización de la carga debida al apilamiento de los anillos aromáticos del grupo antraceno (π - π stacking) como resultado de la agregación molecular en estado sólido (Figura 2.70). Sin embargo, los espectros de las muestras cargadas **ZnBDP_X@Mitoxantrona** ($X = H$ y NH_2) muestran un estrechamiento en la banda de absorción (a 400 nm), que indica la ausencia de interacciones de apilamiento del grupo antraceno, por lo que podemos concluir que las moléculas de mitoxantrona una vez adsorbidas en el MOF no se encuentran agregadas.³² Además, los resultados indican que molturando mezclas de **ZnBDP_X**:mitoxantrona en proporción 1:0.5 (para $X = H$) y 1:0.2 (para $X = NH_2$), obtenemos el mismo espectro que para las muestras cargadas por impregnación. Sin embargo, la molturación con cantidades superiores de mitoxantrona, dan lugar a espectros de DR donde

las interacciones por apilamiento son evidentes. Este hecho se debe a que se ha sobrepasado la capacidad de adsorción de la matriz porosa, por lo que habrá tanto mitoxantrona adsorbida como mitoxantrona excedente apilada fuera del MOF. Por tanto, se puede concluir que la saturación se alcanza con la incorporación de 0.50 mmol de mitoxantrona/mmol de **ZnBDP** y 0.20 mmol de mitoxantrona/mmol de **ZnBDP_NH₂**. Estos resultados confirman los resultados obtenidos mediante análisis elemental, UV-vis y reflectancia total atenuada. Hay que destacar que es posible encapsular el fármaco mitoxantrona en **ZnBDP_X** (X = H y NH₂) por simple molturación.

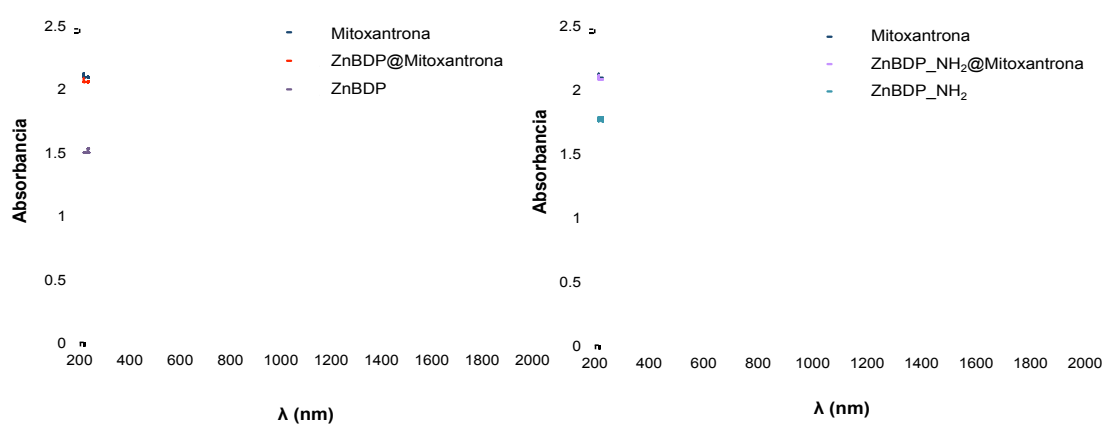


Figura 2.70. Espectros de reflectancia difusa para los compuestos **ZnBDP**, **ZnBDP@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NH₂**, **ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona** y mitoxantrona.

Finalmente, se estudió la capacidad de la serie **ZnBDP_X** para liberar RAPTA-C en fluido corporal simulado (FCS) a 310 K con el propósito de considerar su posible aplicación como agente para la liberación controlada de este metalofármaco. Para ello, en primer lugar, se determinó la cinética de liberación de RAPTA-C midiendo la cantidad de metalodroga liberada a la disolución sobrenadante de FCS a diferentes tiempos mediante UV-vis. Los resultados obtenidos a volumen constante (40 mL) de FCS muestran que la velocidad de liberación de RAPTA-C es diferente para cada una de las muestras (Figura 2.71). Además, se puede observar que la liberación de RAPTA-C se produce de forma escalonada en dos etapas (menos evidente en el caso de **ZnBDP@RAPTA-C**). En este sentido, una posible explicación podría estar relacionada con la flexibilidad y adaptabilidad de la red. Este comportamiento también se ha observado en la liberación de ibuprofeno de la

matriz porosa **MIL-53**.³¹ Por otro lado, los datos de desorción de toda la serie durante la primera hora se pueden ajustar a una cinética de primer orden, de acuerdo con la ecuación [2.2]. Los ajustes dan como resultado diferentes valores de K , que corresponden con diferentes tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de liberación del metalofármaco (Tabla 2.6). Finalmente, se determinó la cantidad máxima de metalodroga liberada. Así pues, se suspendieron las matrices porosas cargadas **ZnBDP_X@RAPTA-C** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) en volúmenes crecientes de FCS bajo agitación durante 1.5 horas a 310 K. De esta forma, se determinó que la cantidad de metalofármaco liberada aumenta hasta el 45%, 37%, 84% y 84% cuando el volumen de FCS en el que se suspenden las matrices **ZnBDP_X@RAPTA-C** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) aumenta hasta 150 mL, lo que corresponde con una disolución final de RAPTA-C con una concentración de 0.025 mM, 0.011 mM, 0.015 mM y 0.043 mM, respectivamente.

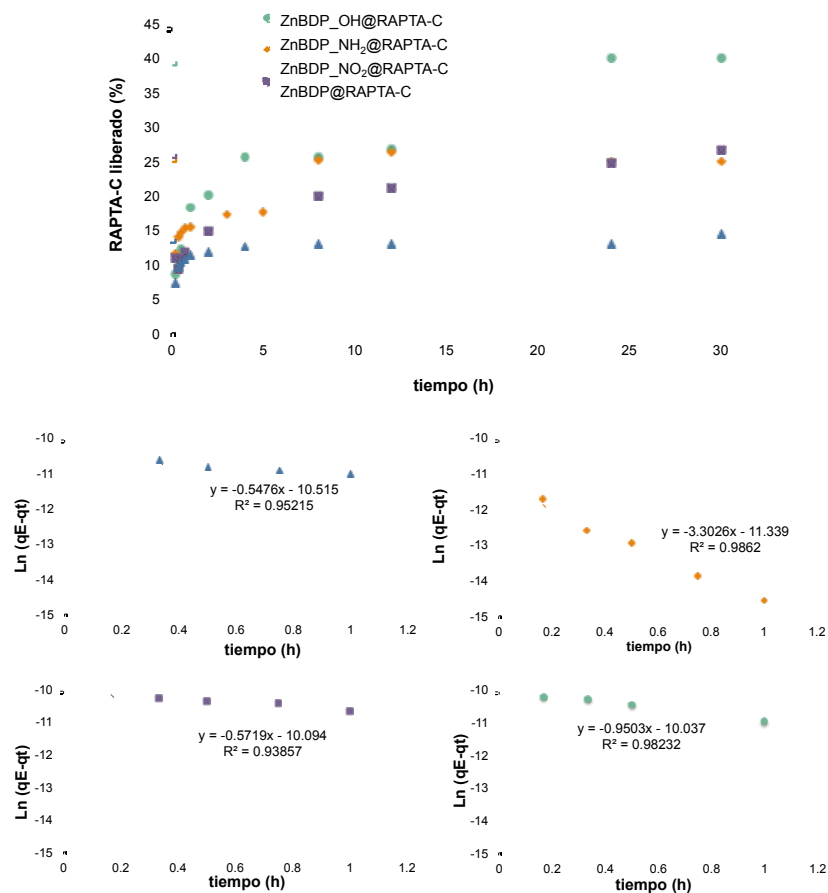


Figura 2.71. Arriba: proceso de desorción de RAPTA-C a partir de 30 mg de **ZnBDP_X@RAPTA-C** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) en 40 mL de fluido corporal simulado a 310 K. Abajo: representación del ajuste de los datos a cinéticas de primer orden. **ZnBDP@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NO₂@RAPTA-C** y **ZnBDP_OH@RAPTA-C**.

	ZnBDP	ZnBDP_NH ₂	ZnBDP_NO ₂	ZnBDP_OH
K (h ⁻¹)	0.548	3.303	0.572	0.950
$t_{1/2}$ (h)	1.27	0.20	1.21	0.73

Tabla 2.6. Valores de K (h⁻¹) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$, h) para el proceso de liberación de RAPTA-C de la serie **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂ y OH).

Conclusiones

En este apartado, se ha presentado la síntesis y caracterización de la serie isoestructural **ZnBDP_X** ($H_2BDP = 1,4\text{-bis}(1H\text{-pirazol-4-il})\text{benceno}$, $X = H, NO_2, NH_2$ y OH) a escala nanométrica. La evolución del tamaño de partícula se ha estudiado mediante diferentes estrategias: *i*) utilizando la ecuación de Scherrer, *ii*) tomando imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), y *iii*) mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Estos estudios han confirmado la formación de partículas tetragonales con un tamaño medio aproximado de 60 nm para los compuestos **ZnBDP_X** ($X = H, NO_2$ y OH) y la formación de partículas más grandes y ligeramente alargadas para el compuesto **ZnBDP_NH₂** (tamaño medio de 120 x 45 nm). Asimismo, se ha demostrado que es posible la síntesis asistida por microondas del nanoMOF **ZnBDP_OH** utilizando condiciones más respetuosas con el medio ambiente. Mediante este método se evita el uso del disolvente tóxico DMF, y se reduce la temperatura y el tiempo de reacción.

Por otra parte, se ha estudiado la estabilidad coloidal de la serie **ZnBDP_X** en diferentes condiciones biológicas simuladas en presencia de distintas proteínas y sales características de medios intravenosos y orales. En primer lugar, se estudió la estabilidad de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en condiciones intravenosas, utilizando un tampón fosfato salino (PBS) en presencia o ausencia de albúmina de suero bovino (BSA, 0.54% p/v y 5.4% p/v de BSA). Posteriormente, se estudió la estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en medio intestinal utilizando fluido intestinal simulado a diferentes concentraciones (SIF y *lis*-SIF) y en presencia o ausencia de pancreatina (0.1% p/v y 1% p/v) o mucina (0.05% p/v y 0.5% p/v). Los resultados obtenidos sugieren que la formación de la corona proteica tras la administración intravenosa del MOF favorece la estabilidad coloidal de las nanopartículas en el suero. Sin embargo, las nanopartículas de **ZnBDP_OH** tienen tendencia a agregarse en condiciones orales (en presencia de pancreatina o mucina). Debe destacarse que concentraciones de mucina del 0.5% p/v conducen a la formación inmediata de agregados con tamaños del orden de las micras, lo que sugiere cierto grado de bioadhesión de las

nanopartículas que podría promover su inserción en la mucosa intestinal tras la administración oral.

Por otra parte, los ensayos de citotoxicidad de los ligandos H₂BDP_X frente a la línea celular de macrófagos murinos (J774), demuestra la toxicidad de los mismos (viabilidad celular <24% a concentraciones 20 μM). A pesar de este resultado, se ha estudiado la adsorción/desorción de los fármacos antitumorales mitoxantrona y RAPTA-C en la serie **ZnBDP_X** como prueba de concepto de la influencia de la funcionalización de la matriz porosa en el proceso de incorporación/liberación de dichas moléculas bioactivas.

En este apartado, se ha demostrado que es posible encapsular el metalofármaco RAPTA-C mediante la impregnación de la serie isoestructural **ZnBDP_X** alcanzándose una carga de 0.55 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP**, 0.22 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NO₂**, 0.11 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NH₂** y 0.15 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_OH**. Asimismo, se ha llevado a cabo la encapsulación del fármaco mitoxantrona mediante impregnación o molturación en los nanoMOFs **ZnBDP** y **ZnBDP_NH₂**, alcanzándose una carga de 0.50 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP** y 0.20 mmol mmol⁻¹ **ZnBDP_NH₂**.

Por otra parte, los patrones de difracción de los MOFs cargados varían sustancialmente en comparación con los patrones de los MOFs activados. Estos resultados ponen de manifiesto el comportamiento flexible de la red. Además, se ha demostrado que la liberación de RAPTA-C en FCS se produce en dos etapas (menos evidente en el caso del **ZnBDP**). Además, dichos estudios ponen de manifiesto el efecto de la funcionalización de los ligandos tanto en la cinética como en el porcentaje de metalofármaco liberado. Las matrices **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_OH** muestran claramente una interacción más débil con el RAPTA-C que las especies **ZnBDP** y **ZnBDP_NO₂**. De hecho, las primeras muestran cinéticas de desorción del mismo más rápidas y mayores porcentajes de metalofármaco liberado que las segundas. Este resultado prueba que la adecuada funcionalización de las cavidades de la matriz porosa puede conducir a interacciones específicas con las drogas huésped que permitan controlar la liberación de las mismas.

Referencias bibliográficas

- 1 Torchilin V. P., *Nanoparticulates as drug carriers*, **2006**, Imperial College Press.
- 2 (a) Meyers S. R., Grinstaff M. W., *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 1615-1632; (b) Nel A. E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M., *Nat. Mater.*, **2009**, *8*, 543-557.
- 3 Tamames-Tabar C., Cunha D., Imbuluzqueta E., Ragon F., Serre C., Blanco-Prieto M. J., Horcajada P., *J. Mater. Chem. B.*, **2014**, *2*, 262-271.
- 4 Gref R., Agostoni V., Daoud-Mahammed S., Rodriguez-Ruiz V., Malanga M., Jicsinszki L., Horcajada P., Serre C., *Solide hybride organique inorganique amelioee à surface externe modifiée*, WO 2013178954 A1, **2013**.
- 5 (a) Kroll A., Pillukat M. H., Hahn D., Schnekenburger J., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *72*, 370-377; (b) Thomas D. G., Pappu R. V., Baker N. A., *J. Biomed. Inform.*, **2011**, *44*, 59-74.
- 6 (a) Panyan J., Labhasetwar V., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2003**, *55*, 329-347; (b) Ehrenberg M. S., Friedman A. E., Finkelstein J. N., Oberdörster G., McGrath J. L., *Biomat.*, **2009**, *30*, 603-610.
- 7 Farrusseng D., *Metal-Organic Frameworks. Applications from Catalysis to Gas Storage*, **2011**, Willey-VCH
- 8 Moddaresi M., Brown M. B., Zhao Y., Tamburic S., Jones S. A., *Intern. J. Pharmac.*, **2010**, *400*, 176-182.
- 9 (a) McClements D. J., Li Y., *Food Funct.*, **2010**, *1*, 32-59; (b) Elsabahy M., Wooley K. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2545-2561.
- 10 Derjaguin B. V., Landau L. D., *Acta Physicochim URSS*, **1941**, *14*, 733.
- 11 Goldberg M., Langer R., Jia X., *J. Biomat. Sci.*, **2007**, *18*, 241-68.
- 12 Dobrovolskaia M. A., MacNeil S. E., *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, *2*, 469-478.
- 13 Lai S. K., Wang Y., Wirtz D., Hanes J., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, *61*, 86.
- 14 Colombo V., Montoro C., Maspero A., Palmisano G., Masciocchi N., Galli S., Barea E., Navarro J. A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 12830-12843.
- 15 Galli S., Masciocchi N., Colombo V., Maspero A., Palmisano G., López-Garzón F. J., Domingo-García M., Fernández-Morales I., Navarro J. A. R., *Chem. Mater.*, **2010**, *22*, 1664.
- 16 Chalati T., Horcajada P., Gref R., Couvreur P., Serre C., *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 2220-2227.
- 17 Bellido E., Guillevic M., Hidalgo T., Santander-Ortega M. J., Serre C., Horcajada P., *Langmuir*, **2014**, *30*, 5911-5920.
- 18 Nicolas J., Mura S., Brambilla D., Mackiewicz N., Couvreur P., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 1147-1235.
- 19 Pourbaix M., *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*, **1974**, National Association of Corrosion Engineers.
- 20 Santander-Ortega M. J., de la Fuente M., Lozano M. V., Tsui M. L., Bolton K., Uchegbu I. F., Schätzlein A. G., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2014**, *14*, 1172.
- 21 Santander-Ortega M. J., Uchegbu I. F., Schätzlein A. G., *Dendrimer-Based Gene Delivery Systems: Administration Routes and In Vivo Evaluation* (in *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: from Theory to Practice*), Cheng Y., (Ed), **2012**, Wiley&Sons.
- 22 Hiemenz P. C., Rajogopalan R., *Principles of Colloidal and Surface Chemistry*, **1997**, CRC Press.
- 23 Peula J. M., de las Nieves F. J., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **1994**, *90*, 55-62.
- 24 Wright A. K., Thompson M. R., *Biophys. J.*, **1975**, *15*, 137-141.
- 25 Casals E., Pfaller T., Duschl A., Janneke Oostingh G., Puentes V., *ACS Nano*, **2010**, *4*, 3623-3632.

- ²⁶ Cedervall T., Lynch I., Foy M., Berggård T., Donnelly S. C., Cagney G., Linse S., Dawson K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 5754-5756.
- ²⁷ Jodar-Reyes A. B., Martin-Rodriguez A., Ortega-Vinuesa J. L., *J. Coll. Interface Sci.*, **2006**, *298*, 248-257.
- ²⁸ Kufe D. W., *Nat. Rev. Cancer*, **2009**, *9*, 874.
- ²⁹ Llewellyn P. L., Bourrelly S., Serre C., Filinchuk Y., Férey F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7751.
- ³⁰ Choi H. J., Dinca M., Long J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7848-7850.
- ³¹ Horcajada P., Serre C., Maurin G., Ramsahye N. A., Balas F., Vallet-Regí M., Sebba M., Taulelle F., Férey G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6774-6780.
- ³² (a) Sonoda Y., *Molecules*, **2011**, *16*, 119-148; (b) Inayama S., Tatewaki Y., Okada S., *Polymer Journal*, **2010**, *42*, 201-207.

Conclusiones



CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de la síntesis y caracterización de redes metalorgánicas (MOFs), así como del estudio de su aplicación como vehículos de moléculas bioactivas. Con este fin, se ha demostrado que es posible diseñar y sintetizar MOFs con propiedades que los hacen adecuados para este tipo de aplicaciones.

En el apartado 2.1, se ha descrito la síntesis y caracterización de una nueva red metalorgánica porosa $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil})\text{bispirazolato})_6]$ basada en clústers cúbicos de tipo $\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH})_2$ conectados entre sí a través del ligado lineal N,N,N,N' 4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato lo que da lugar a un empaquetamiento cúbico centrado en las caras (FCU). Este tipo de estructura genera n huecos octaédricos y $2n$ tetraédricos con un diámetro interno apropiado (1.9 y 1.1 nm, respectivamente) para alojar moléculas huésped de tamaño mediano. La estrategia seguida para la obtención de este MOF revela que el uso de enlaces de coordinación robustos metal-azolato permite obtener materiales con una estabilidad química, térmica y mecánica mayor que la que presentan muchos MOFs tradicionales, basados en sistemas metal-carboxilato. Asimismo, se ha demostrado que el material aislado es altamente poroso, tiene un tamaño de partícula adecuado para aplicaciones biológicas (130 ± 30 nm) y posee una elevada estabilidad química, incluso en fluido corporal simulado. Estas características lo hacen un buen candidato para su aplicación en la liberación controlada del metalofármaco no convencional $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (RAPTA-C) (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano). De hecho, dicha matriz porosa activada es capaz de incorporar una cantidad significativa de RAPTA-C (3.97 mmol de RAPTA-C por mmol de compuesto). Este valor se corresponde con 4 moléculas de RAPTA-C por fórmula unidad de MOF, que se alojan tanto en cavidades octaédricas (2 moléculas) como tetraédricas (1 molécula). Asimismo, el proceso de adsorción es reversible puesto que sólo se produce la fisisorción del RAPTA-C por lo que se libera fácilmente en fluido corporal simulado

CONCLUSIONES

siguiendo una cinética de primer orden con un $t_{1/2}$ de liberación de la metalodroga de 25 minutos.

Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, ésta es la primera vez que aparece descrita en la bibliografía la aplicación de una red metalorgánica porosa como agente portador y liberador de un metalofármaco no convencional. Sin embargo, este MOF presenta algunas limitaciones como son la presencia de metales potencialmente tóxicos en su estructura (Ni(II)) y una cinética de liberación de RAPTA-C demasiado rápida. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de seguir desarrollando nuevos MOFs para esta aplicación que contengan iones metálicos biocompatibles en sus estructuras (ej. Ca(II), Fe(II), Al(III), Zn(II)), y que den lugar a interacciones más específicas con las metalodrogas para conseguir una verdadera liberación controlada de las mismas.

Por otra parte, en el apartado 2.2, se describe la incorporación combinada de RAPTA-C y NO en la matriz porosa **CPO-27-Ni** ($[\text{Ni}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico). De acuerdo con los datos publicados en bibliografía, el **CPO-27-Ni** presenta un comportamiento excepcional en la captura y liberación de NO, así como una elevada estabilidad química, incluso en condiciones fisiológicas. En esta Tesis, se ha ido más allá y se ha demostrado que esta matriz porosa activada es capaz de incorporar simultáneamente 0.23 mmol de RAPTA-C por mmol de **CPO-27-Ni** y 2.51 mmol de NO por mmol de MOF. Además, se ha visto que tanto la adsorción como la liberación de RAPTA-C y NO son independientes. Este hecho se atribuye a las diferencias entre la interacción que tiene lugar entre la matriz porosa y las moléculas de adsorbato: mientras que las moléculas de NO interaccionan directamente con los centros metálicos con posiciones de coordinación insaturadas (quimisorción), las moléculas de RAPTA-C se encuentran fisorbidas dentro de los poros. Asimismo, la liberación del metalofármaco en fluido corporal simulado se ve poco influenciada por la presencia de NO en la red ($t_{1/2} \sim 18$ minutos), principalmente, porque el NO se libera rápidamente al suspenderse la matriz porosa en medio acuoso debido a la rápida cinética del proceso de intercambio

de los ligandos NO por H₂O. Sin embargo, la liberación de NO al someter a la matriz a una corriente de gas húmedo es significativamente más rápida para **CPO-27-Ni@RAPTA-C** que para el material original **CPO-27-Ni**.

Estos resultados demuestran que este sistema puede considerarse como una prueba de concepto adecuada para demostrar la utilidad de los polímeros de coordinación porosos como agentes liberadores de varias moléculas bioactivas. El estudio del efecto sinérgico de la liberación de múltiples fármacos puede dar lugar al desarrollo de terapias combinadas avanzadas. Asimismo, sería interesante extender estos estudios a nuevos MOFs basados en iones metálicos de menor toxicidad. De hecho este MOF está descrito para otros metales menos tóxicos (Fe, Zn, etc.).

El apartado 2.3 se centra en el estudio de la matriz porosa **MIL-100(Fe)** ($[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3)]_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \sim 14.5$)) para la incorporación y liberación de metalofármacos no convencionales de rutenio como el RAPTA-C y el $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). El **MIL-100(Fe)** presenta una alta estabilidad química, porosidad permanente y una elevada área superficial. Además, este MOF es biocompatible y se puede obtener fácilmente en forma de nanopartículas. En este contexto, se ha demostrado que es posible encapsular el metalofármaco RAPTA-C mediante la impregnación de la matriz porosa alcanzándose una carga de 0.8 mmol de RAPTA-C por mmol de **MIL-100(Fe)**. Por otra parte, debe destacarse que la liberación de este metalofármaco en fluido corporal simulado se produce en dos etapas ($t_{1/2} = 2$ horas), poniendo de manifiesto la diferente interacción entre las moléculas de RAPTA-C y los dos tipos de cavidades de la matriz porosa.

Por otro lado, se ha sintetizado un novedoso metalofármaco no convencional basado en Ru(II) y el ligando mitoxantronato $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). Este nuevo metalofármaco reúne las propiedades anticancerígenas de la antraciclina mitoxantrona y de los compuestos “*semi-sandwich*” de rutenio. Los resultados muestran que **Ru_mito** presenta actividad redox, capacidad para interactuar con diferentes dianas biológicas (como la biomolécula de ADN, aminoácidos N y S dadores y las

CONCLUSIONES

catepsinas B y D), así como actividad anticancerígena frente a varias líneas celulares, incluso frente a líneas celulares resistentes al *cis*platino. Por último, también se ha llevado a cabo la incorporación de **Ru_mito** en el **MIL-100(Fe)** (0.4 mmol de **Ru_mito** por mmol de **MIL-100(Fe)**) utilizando la estrategia heterodoxa del “barco en la botella”.

Finalmente, en el apartado 2.4, se ha presentado la optimización de la síntesis a escala nanométrica de la serie isoestructural **ZnBDP_X** ($H_2BDP = 1,4\text{-bis}(1H\text{-pirazol-4-il})\text{benceno}$, $X = H, NO_2, NH_2$ y OH). Los estudios de la evolución del tamaño de partícula de las especies **ZnBDP_X** haciendo uso de diferentes metodologías (ecuación de Scherrer, microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de la luz) han confirmado la formación de partículas tetragonales con un tamaño medio aproximado de 60 nm para los materiales **ZnBDP_X** ($X = H, NO_2$ y OH) y la formación de partículas más grandes y ligeramente alargadas (120 x 45 nm) para el compuesto **ZnBDP_NH₂**. Asimismo, se ha propuesto una estrategia de síntesis asistida por microondas del nanoMOF **ZnBDP_OH** utilizando condiciones más respetuosas con el medio ambiente.

Por otra parte, como caso de estudio, se ha investigado la estabilidad coloidal de **ZnBDP_OH** en diferentes condiciones biológicas simuladas en presencia de distintas proteínas y sales características de medios intravenosos y orales. Los resultados obtenidos en condiciones intravenosas (PBS+BSA 0.54% p/v y PBS+BSA 5.4% p/v) (BSA, albúmina de suero bovino) sugieren la formación de una corona proteica de albúmina tras la administración intravenosa del MOF que favorece la estabilidad coloidal de las nanopartículas en el suero evitando su agregación. Por otra parte, se ha demostrado que en fluido intestinal simulado (SIF) (en ausencia de enzimas o mucina), las nanopartículas de **ZnBDP_OH** muestran una buena estabilidad coloidal similar a la observada en agua MilliQ. Este mismo comportamiento se observa en fluido intestinal diluido (*lis*-SIF) dopado con bajas concentraciones de mucina (0.05% p/v) aunque, en este caso, no se observa la formación de la corona de proteína debido, seguramente, a la baja concentración de la misma en el medio. Concentraciones mayores de mucina (0.5% p/v) conducen a la

formación inmediata de agregados con tamaños del orden de las micras, lo que sugiere cierto grado de bioadhesión de las nanopartículas que podría promover su inserción en la mucosa intestinal tras la administración oral. Por otra parte, en fluido intestinal diluido dopado con pancreatina (0.1% y 1% p/v), se observa la agregación de las nanopartículas después de 1 h y 30 s de incubación, respectivamente.

En otro orden de cosas, los ensayos de citotoxicidad de los ligandos H_2BDP_X frente a la línea celular de macrófagos murinos (J774), demuestra la toxicidad de los mismos (viabilidad celular <24% a concentraciones 20 μM). Estos estudios deben ampliarse a las matrices porosas puesto que, en definitiva, dicha toxicidad dependerá también de la tasa de liberación de los ligandos al producirse la biodegradación de la matriz porosa. A pesar de este resultado, hemos creído conveniente estudiar la adsorción/desorción de los fármacos antitumorales mitoxantrona y RAPTA-C en la serie **ZnBDP_X** como prueba de concepto de la influencia de la funcionalización de la matriz porosa en el proceso de incorporación/liberación de la metalodroga. En primer lugar, debe destacarse que la mitoxantrona se encapsula fácilmente por impregnación o molturación en los nanoMOFs **ZnBDP** y **ZnBDP_NH₂**, alcanzándose valores de carga del fármaco de 0.50 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP** y 0.20 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NH₂**. En segundo lugar, se ha comprobado que el RAPTA-C puede incorporarse por impregnación en la serie **ZnBDP_X** alcanzándose cargas de: 0.55 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP**, 0.22 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NO₂**, 0.11 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NH₂** y 0.15 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_OH**. Estos resultados indican que la capacidad de adsorción de RAPTA-C y mitoxantrona en la serie **ZnBDP_X** sigue la misma tendencia que la superficie de BET de las matrices activadas. Por otra parte, se ha comprobado que la liberación del RAPTA-C en fluido corporal simulado se produce en dos etapas (menos evidente en el caso del **ZnBDP**) lo que podría estar relacionado con la flexibilidad de este tipo de redes. Los estudios de liberación de RAPTA-C en estas matrices isoestructurales, ponen de manifiesto el efecto de la funcionalización de los ligandos tanto en la cinética como en el porcentaje de metalofármaco liberado. Las matrices **ZnBDP_NH₂** y **ZnBDP_OH** muestran claramente una interacción más débil con el RAPTA-C

CONCLUSIONES

que las especies **ZnBDP** y **ZnBDP_NO₂**. Este hecho se demuestra claramente debido a que las primeras muestran cinéticas de desorción del mismo más rápidas (K (h^{-1}): 0.548 (-H), 0.572 (-NO₂), 3.303 (-NH₂) y 0.950 (OH)) y mayores porcentajes de metalofármaco liberado (45% (-H), 37% (-NO₂), 84% (-NH₂) y 84% (-OH)) que las segundas. Este resultado prueba que la adecuada funcionalización de las cavidades de la matriz porosa puede conducir a interacciones específicas con las drogas huésped que permitan controlar la liberación de las mismas.

En definitiva, en esta Tesis Doctoral, se ha demostrado, como prueba de concepto, la utilidad de las redes metalorgánicas como agentes liberadores de fármacos no convencionales (metalofármacos de Ru(II) y la molécula bioseñal NO). Durante este trabajo, se ha comprobado que las características de la matriz porosa (composición, tamaño de las cavidades, hidrofobicidad/hidrofilicidad, estabilidad química y coloidal, etc.) van a influir decisivamente en la afinidad del anfitrión por el huésped, así como en la estabilidad de la matriz porosa en medios fisiológicos simulados. Por tanto, la estructura y las propiedades físico-químicas de los MOFs influirán en el proceso de incorporación/liberación de las drogas. En este contexto, se ha puesto de manifiesto que la funcionalización de los ligandos de los MOFs es una estrategia adecuada para conseguir modular la fortaleza de la interacción MOF-droga y, como consecuencia, controlar el proceso de adsorción/liberación del fármaco. Por otra parte, se ha demostrado que es posible encapsular varias moléculas bioactivas no convencionales con potencial efecto antitumoral sinérgico en el mismo MOF. La liberación simultánea de dichas drogas podría conducir al desarrollo de terapias combinadas avanzadas más efectivas y, por tanto, con menos efectos secundarios para los pacientes.

CONCLUSIONS

This PhD Thesis is focused on the synthesis and characterization of metal organic frameworks (MOFs), as well as on the study of their application as delivery systems for bioactive molecules. To this end, it has been proven that it is possible to design and to synthesize MOFs with certain properties that make them suitable for such applications.

In section 2.1, it has been described the synthesis and characterization of the new porous metal organic framework $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diyne-1,4-diyl})\text{bispyrazolato})_6]$ based on $\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2$ cubic clusters connected to 12 adjacent ones by linear *exo*-tetradentate *N, N, N', N'* 4,4'-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazolato linkers. The result is a cubic close packing (CCP) that leads to the formation of n octahedral and $2n$ tetrahedral voids of proper inner size (1.9 and 1.1 nm, respectively) to incorporate medium-sized guest molecules. The synthetic strategy proved that the use of strong metal-azolate coordination bonds has been decisive to obtain very stable structures with remarkably high thermal, chemical and mechanical stability compared with the metal-carboxylate ones, which are typically found in most of the reported MOFs. Thus, it has been shown that the isolated compound is highly porous, has a proper particle size for biological applications (130 ± 30 nm) and shows a high chemical stability, even under biological conditions. These features make this MOF an adequate candidate for its application for the controlled delivery of the non-conventional metallodrug $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (RAPTA-C) (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane). In fact, the activated porous matrix has been proven to load a significant quantity of RAPTA-C (3.97 mmol of drug per mmol of compound), corresponding to the incorporation of 2 and 1 RAPTA-C molecules in the octahedral and tetrahedral voids, respectively. Noteworthy, this adsorption process is reversible as a consequence of RAPTA-C physisorption, which can be easily released into simulated body fluid to achieve a first order kinetic with a $t_{1/2}$ of release of 25 minutes.

CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, this is the first time that a MOF has been used for the release of a non-conventional metallodrug. However, this MOF shows some limitations like the presence of potentially toxic metals in its structure (Ni(II)) and a too fast RAPTA-C delivery kinetic. This situation highlights the need for the synthesis of new MOFs for this application based on healthy friendly metal ions (i.e. Ca(II), Fe(II), Al(III), Zn(II)) and able to give specific metallodrug-MOF interactions to achieve a real controlled delivery.

Moreover, in section 2.2, we have described the combined incorporation of RAPTA-C and NO in the porous matrix **CPO-27-Ni** ($[\text{Ni}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (H_4dhtp : 2,5-dihydroxyterephthalic acid). As previously reported, **CPO-27-Ni** has an exceptional behaviour over the adsorption and delivery of NO, as well as a high chemical stability, even in physiological conditions. However, in this Thesis, we have gone beyond to demonstrate that this porous matrix can simultaneously incorporate 0.23 mmol of RAPTA-C per mmol of **CPO-27-Ni** and 2.51 mmol of NO per mmol of MOF. Furthermore, it has been proven that the incorporation and delivery processes for both species are independent. These results are a consequence of the different interaction mechanisms taking place among the framework walls and the adsorbates: NO directly interacts with the Ni open metal sites (chemisorption) while RAPTA-C is only physisorbed into the pores. Additionally, metallodrug delivery in simulated body fluid ($t_{1/2} \sim 18$ minutes) is not affected by the presence of NO molecules in the framework, because of the very fast NO delivery when the matrix is suspended in an aqueous solution as a consequence of the rapid ligand rate of exchange between NO and H_2O . Nevertheless, when the matrix is exposed to a wet gas, NO delivery is faster in **CPO-27-Ni@RAPTA-C** in comparison with the original material **CPO-27-Ni**.

These results show that the investigated system may be considered as a proof of concept of the feasibility of the concurrent adsorption of bioactive molecules into MOFs. The study of the synergic effect of multiple drugs may lead to advanced combined therapies. Additionally, it should be interesting to explore new MOFs based on healthy friendly metals. In this context, this MOF has been described using other less toxic metals (Fe, Zn, etc.).

Section 2.3 is focused on the application of the porous matrix **MIL-100(Fe)** ($[\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3)]_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \sim 14.5$)) in the incorporation and delivery of Ru(II) based non-conventional antitumor drugs, like RAPTA-C and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). **MIL-100(Fe)** exhibits a great chemical stability, permanent porosity and a high surface area. Furthermore, this MOF is biocompatible and can be easily prepared as homogeneous nanoparticles. In this context, it has been shown that it is possible to entrap RAPTA-C in **MIL-100(Fe)** using an impregnation method, which achieves a drug loading of 0.8 mmol of RAPTA-C per mmol of **MIL-100(Fe)**. On the other hand, it should be noted that two stages can be distinguished in the delivery of RAPTA-C in simulated body fluid ($t_{1/2} = 2$ hours), which may be related to the different interactions between RAPTA-C molecules and the two types of MOF cavities.

On the other hand, we have synthesized the new non-conventional metallodrug based on Ru(II) and the mitoxantronato ligand $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). This metallodrug combines the anticancer features of the anthracycline mitoxantrone and the half-sandwich Ru(II) compounds. The results show that **Ru_mito** exhibits redox activity, ability to interact with different biological targets (DNA, N and S donors amino acids and cathepsin B and D) as well as an important *in vitro* antitumor activity towards wild type and cisplatin resistant tumour cell lines. Finally, we have also demonstrated the incorporation of **Ru_mito** in **MIL-100(Fe)**, with a maximum loading of 0.4 mmol of **Ru_mito** per mmol of **MIL-100(Fe)**, following the heterodox ship-in-a-bottle strategy.

Lastly, in section 2.4, we have described the optimization of the synthesis of nanoparticles of the isoreticular series **ZnBDP_X** ($\text{H}_2\text{BDP} = 1,4\text{-bis}(1\text{H-pyrazol-4-yl})\text{benzene}$, $X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ and OH). Size particle evolution studies of **ZnBDP_X** nanoparticles using different methods (Scherrer's equation, scanning electron microscopy and dynamic light scattering) have confirmed the formation of tetragonal particles with a mean size of 60 nm for **ZnBDP_X** ($X = \text{H}, \text{NO}_2$ y OH) and more elongated particles of slightly larger size (120 x 45 nm) for **ZnBDP_NH₂** material. Alternatively, an environmentally

CONCLUSIONS

friendly microwave-assisted solvothermal route was attempted for the synthesis of **ZnBDP_OH** nanoMOF.

Moreover, as a case of study, we have investigated the colloidal stability of **ZnBDP_OH** in different simulated biological media containing characteristic species (proteins or salts) found in intravenous and oral conditions. Under intravenous conditions (PBS+BSA 0.54% w/v and PBS+BSA 5.4% w/v) (BSA, bovine serum albumin), the formation of an albumin corona on MOF nanoparticles' surface seems to promote their colloidal stability in the serum, avoiding their aggregation. On the other hand, it has been proven that **ZnBDP_OH** nanoparticles exhibited quite good colloidal stability in simulated intestinal fluid (SIF) (without enzymes or mucin) showing a similar behaviour than that observed in MilliQ water. The same performance is also observed in diluted intestinal fluid (*lis*-SIF) doped with very low concentrations of mucin (0.05% w/v) although, in this case, the formation of the protein corona is not observed probably due to the low concentration of mucin in the medium. However, the use of 0.5% w/v mucin solutions led to a rapid increase of particle size, giving rise to aggregates bigger than 1 micron, suggesting a certain degree of bioadhesion of the nanoparticles that could promote their grafting to the intestinal mucosa after oral administration. Besides, aggregation of nanoparticles is observed in diluted intestinal fluid doped with pancreatin (0.1% and 1% w/v) after an hour and 30 seconds, respectively.

Furthermore, the study of the cytotoxic activity of H₂BDP_X ligands towards murine macrophages cell line (J774) showed a low cell viability (<24% using concentrations of 20 μM) suggesting the high cytotoxicity of these linkers. These studies should be extended to the porous matrix since the toxicity will depend on the ligands delivery rate when the matrix biodegradation takes place. However, despite these results, we decided to investigate the incorporation/desorption of the antitumor drugs mitoxantrone and RAPTAC in **ZnBDP_X** series as a proof of concept of the effect of the framework functionalization in the incorporation/delivery of these bioactive molecules. Firstly, it should be noted that the encapsulation of mitoxantrone can be easily achieved by impregnation or simple grinding of the nanoMOFs **ZnBDP** and

ZnBDP_NH₂, reaching drug loading values of 0.50 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP** and 0.20 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NH₂**. Secondly, it has been proven that RAPTA-C can be incorporated in **ZnBDP_X** by impregnation, with loading values of: 0.55 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP**, 0.22 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NO₂**, 0.11 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_NH₂** and 0.15 mmol mmol⁻¹ in **ZnBDP_OH**. These results suggest that the loading capacity of RAPTA-C and mitoxantrone in this series follows the BET surface area trend of the activated matrices. On the other hand, it has been proven that RAPTA-C delivery in simulated body fluid takes place in two steps (less clear in the case of **ZnBDP**), which may be related to the flexibility of this kind of frameworks. Additionally, these studies are indicative of the effect of the ligands functionalization, both on the kinetics delivery and on the total released amount of drug at the equilibrium. **ZnBDP_NH₂** and **ZnBDP_OH** matrices showed a weaker interaction with RAPTA-C than **ZnBDP** and **ZnBDP_NO₂** compounds. This fact is proven by the faster kinetic of delivery of the former matrices (K (h⁻¹): 0.548 (-H), 0.572 (-NO₂), 3.303 (-NH₂) and 0.950 (OH)) and the higher delivered drug percentage (45% (-H), 37% (-NO₂), 84% (-NH₂) and 84% (-OH)) compared with the later ones. These results are a proof of the effect of the functionalization of the MOF cavities on the host-guest interactions that may lead to the control of the kinetics of delivery.

Summarizing, in this PhD Thesis, we have demonstrated, as a proof of concept, that metal organic frameworks are good candidates for the transport and delivery of non-conventional metallodrugs (i.e. Ru(II) metallodrugs and the signalling molecule NO). During this work, it has been proven that the porous matrix features (composition, cavities size, hydrophobicity/hydrophilicity, chemical and colloidal stability, etc.) will strongly influence on the host-guest affinity, as well as on the porous matrix stability in simulated physiological media. Therefore, the structure and physicochemical properties of MOFs will affect drug incorporation and delivery. In this context, the proper ligand functionalization is a good strategy to modulate the strength of MOF-drug interaction and, as a consequence, to control drug adsorption/delivery. On the other hand, it has been verified that it is possible to encapsulate various non-conventional bioactive molecules with potential synergic antitumor effect in the same MOF. The simultaneous delivery of these drugs may lead to the

CONCLUSIONS

development of more effective advanced combined therapies with fewer side effects for the patients.

Anexos

Anexo A. Detalles experimentales

Anexo B. Lista de publicaciones relacionadas con esta Tesis Doctoral

Anexo A

Detalles experimentales



Todos los reactivos y los disolventes utilizados están disponibles comercialmente y no necesitan tratamiento previo.

A.1 Síntesis de ligandos orgánicos.

Síntesis del ligando **1,1'-di-Boc-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazol (Boc₂L₄)**. El primer intermedio, 1-Boc-4-iodopirazol, fue obtenido tras la reacción del 4-yodo-1*H*-pirazol (6 g, 30.93 mmol) con (Boc₂O) (10.13 g, 46.30 mmol) en 80 mL de CH₂Cl₂ y 15 mL de Et₃N (Figura A.1). Tras la adición de DMAP (0.30 g, 3.09 mmol), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, mientras se observaba el cambio de color de marrón a amarillo. El disolvente se eliminó a vacío mientras que, el sólido se extrajo con acetato de etilo (15 mL) y se purificó mediante una columna cromatográfica (gel de sílice, hexano/acetato de etilo, 8:2). Se obtuvieron unos cristales en forma de agujas de color amarillo (9.81 g, 98% de rendimiento). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 1.61 (s, 9H), 7.70 (s, 1H), 8.12 (s, 1H). ¹³C RMN (CDCl₃) (DEPT) δ: 27.9 (CH₃), 61.5 (C), 86.5 (C), 134.5 (CH), 146.0 (CH), 146.6 (C).

Una vez obtenido el primer intermedio, se preparó una disolución de 1-Boc-4-iodopirazol (2.0 g, 6.86 mmol), diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (0.39 g, 0.58 mmol) e ioduro de cobre (I) (0.13 g, 0.68 mmol) en una mezcla de Et₃N deoxigenada (40 mL) y THF seco (80 mL). La mezcla se agitó bajo atmósfera de Ar durante 15 min a 273 K. Seguidamente, a esta disolución, se le adicionó fluoruro de tetra-*n*-butilamonio trihidratado (1.03 g, 3.92 mmol). A continuación, se añadió poco a poco 1,4-bis(trimetilsilil)butadiinetrimetil[4-(trimetilsilil)-1,3-butadiinil]silano (2.52 g, 8.16 mmol) dejando la mezcla agitar durante 6 h. El disolvente fue eliminado a vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo (25 mL) para, posteriormente, ser lavado con una disolución acuosa saturada de cloruro de amonio (15 mL x 3). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y luego se eliminó el disolvente. El residuo se purificó mediante una columna cromatográfica (gel de sílice), hexano/acetato de etilo, 8:2, y se obtuvo un polvo policristalino puro que se corresponde con el **Boc₂L₄** (1.07 g, 82% de rendimiento). IR (KBr) 3240(br), 2148(m), 1684(s), 1595(w), 1506(m), 1437(s), 1219(s), 1144(s), 1047(m), 1007(m), 725(w), 544(w) cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃) δ:

1.65 (s, 18H), 7.79 (s, 2H), 8.25 (s, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3) DEPT δ : 27.9 (CH_3), 71.5 (C), 76.1 (C), 86.5 (C), 105.2 (C), 134.5 (CH), 146.0 (CH), 146.6 (C). HRMS (ESI) Anal. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$: 405.1539; encontrado 405.1532.

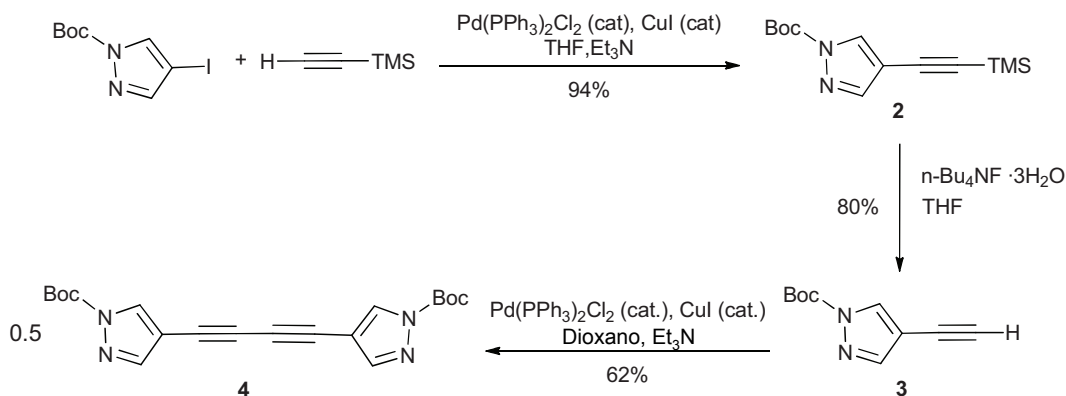


Figura A.1. Proceso de síntesis del ligando **1,1'-di-Boc-4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazol (Boc₂L₄)**.

Síntesis del ligando **1,4-bis(1*H*-pirazol-4-il) benceno (H₂BDP)**. El primer intermedio, **1,4-bis(1-dimetilamino-3-dimetilmonio-prop-1-en-2-il)benceno bis(perclorato)**, se sintetizó de acuerdo con el método publicado anteriormente por Arnold y sus colaboradores.¹ P.f. 673 K. IR (KBr) 2936(w), 1582(vs), 1489(w), 1452(w), 1393(m), 1287(m), 1211(m), 1078(vs), 975(m), 761(w), 622(m), 586(w) cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3) δ : 2.45 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 7.39 (s, 2H), 7.73 (s, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 40.4 (Me), 49.5 (Me), 105.1 (C), 133.1 (C), 134.3 (C), 163.9 (CH). Anal. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8$ (527.40) C, 45.55; H, 6.12; N, 10.62; encontrado C, 44.95; H, 6.10; N, 10.48.

Posteriormente, se preparó una disolución del intermedio bis(perclorato) (470 mg, 0.89 mmol) en EtOH (60 mL) bajo agitación fuerte, y se añadió gota a gota hidracina monohidratada al 98% (95 μL , 1.96 mmol) durante 2 min. Tras estar a reflujo durante 2 h, el sólido de color amarillo se filtró, y se lavó con metanol (10 mL x 2) y se secó a vacío a temperatura ambiente para obtener finalmente el ligando **H₂BDP** puro en forma de polvo cristalino (172 mg, rendimiento 92%). IR (KBr) 3144(br), 1583(w), 1527(w), 1263(w), 1236(w), 1159(s), 1037(w), 965(w), 951(s), 866(s), 824(s), 719(w), 657(w), 627(w) cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.58 (s, 2H), 8.05 (s, 2H), 12.5 (br s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 121.9 (C), 126.3 (HC-

Ph), 131.3 (C), 137.0 (HC-pz). Anal. calc. para $C_{12}H_{10}N_4$ (210.24): C, 68.56; H, 4.79; N, 26.65; encontrado C, 67.98; H, 4.83; N, 26.26.

Síntesis del ligando **2-nitro[1,4-bis(1H-pirazol-4-il)benceno]** ($H_2BDP_NO_2$). Se adicionó H_2BDP (1 g, 4.76 mmol) en pequeñas porciones a ácido sulfúrico concentrado (10 mL) al mismo tiempo que, la temperatura de reacción se controlaba con un baño de hielo. A continuación, se añadió ácido nítrico al 70% (0.255 mL, 5.71 mmol) manteniendo la mezcla de reacción fría. Posteriormente, el baño de hielo se retiró y la disolución se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, se le adicionaron 5 g de hielo y se observó como aparecía un precipitado que se filtró y se lavó con 10 mL de agua (2 x 5 mL). El precipitado final fue neutralizado con una disolución acuosa de $NaHCO_3$ y se lavó con 10 mL de agua (5 mL x 2). Se obtuvo como producto un sólido amarillo puro (1.03 g, rendimiento del 85%). 1H RMN ($DMSO-d_6$) δ : 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 2H), 7.89 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.23 (s, 2H). IR (KBr) 3164(br), 1580(s), 1522(vs), 1350(vs), 1256(w), 1175(w), 1151(w), 1041(s), 976(w), 947(s), 894(w), 865(w), 815(s), 741(w), 664(w) cm^{-1} . Anal. calc. para $C_{12}H_9N_5O_2$ (255.2): C, 56.47; H, 3.55; N, 27.44; encontrado C, 55.7; H, 3.26; N, 26.37.

Síntesis del ligando **2-amino[1,4-bis(1H-pirazol-4-il)benceno]** ($H_2BDP_NH_2$). A una suspensión de $H_2BDP_NO_2$ (0.3 g, 1.176 mmol) en DMF (5 mL), se le adicionó formiato de amonio (0.370 g, 5.873 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue calentada hasta los 393 K y se le añadió Pd/C (5%, 30 mg) en pequeñas porciones. La mezcla final se mantuvo bajo agitación a 373 K durante 2 h. Una vez que la mezcla se volvió clara, se filtró, se lavó con una pequeña cantidad de DMF y el filtrado se diluyó con hielo picado (5 g). El precipitado obtenido se filtró y se lavó con agua (5 mL x 2) resultando como producto el polvo de color blanco puro $H_2BDP_NH_2$ (250 mg, rendimiento 94%). 1H RMN ($DMSO-d_6$) δ : 4.77 (s, 2H), 6.84 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.86 (br s, 4H), 12.88 (br s, 2H). IR (KBr): 3420(s), 3338(s), 3111(br), 1621(s), 1575(s), 1522(w), 1334(w), 1290(w), 1169(vs), 1042(s), 988(w), 961(s), 946(w), 880(w), 864(s), 805(vs), 721(w),

660(w), 627(w) cm^{-1} . Anal. calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ (225.2): C, 63.99; H, 4.92; N, 31.09; encontrado C, 63.31; H, 5.42; N, 31.30.

Síntesis del ligando **2-hidroxo[1,4-bis(1H-pirazol-4-il)benceno] ($\text{H}_2\text{BDP_OH}$)**. 1 g (4.444 mmol) de $\text{H}_2\text{BDP_NH}_2$ fue disuelto en 5 mL de ácido sulfúrico. La mezcla se agitó hasta la formación de una pasta espesa. Mientras la mezcla se mantuvo fría con un baño de hielo, se le adicionaron 3 g de hielo picado. En un vaso de precipitado aparte, se disolvió NaNO_2 (0.440 g, 5.176 mmol) en 4 mL de agua. Esta disolución se enfrió y se adicionó gota a gota, bajo agitación, a la disolución ácida de la amina. En un matraz separado, se calentó una disolución de H_2SO_4 (3 mL) y agua (3 mL) a 383 K y se le añadió gota a gota la disolución de sal de diazonio. Una vez terminada la adición, la disolución se dejó hervir durante 30 min. Posteriormente, se enfrió con un baño de hielo y el precipitado formado se filtró y, se suspendió en una disolución de NaHCO_3 en agua agitando durante 2 h a 353 K. El precipitado amarillento formado se filtró, se lavó con agua (2 x 5 mL) y se secó a vacío (0.763 g, rendimiento 76%). ^1H RMN (DMSO-d_6) δ : 7.04 (m, 2H), 7.51 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (br s, 4H), 9.67 (s, 1H), 12.83 (br s, 2H). IR (KBr) 3525(s), 3387(br), 3182(br), 1621(w), 1588(s), 1563(w), 1534(w), 1440(s), 1346(w), 1274(w), 1254(w), 1216(w), 1160(vs), 1106(w), 1036(s), 959(s), 948(s), 888(w), 865(w), 834(w), 817(s), 736(w), 670(w) cm^{-1} . Anal. calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ (226.2): C, 63.71; H, 4.46; N, 24.76; encontrado C, 62.41; H, 5.11; N, 24.50.

A.2 Síntesis de Redes Metalorgánicas Porosas (MOFs).

Síntesis de **$[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato})_6]_n$ (1)**. A una disolución de Boc_2L_4 (0.3 mmol) en 16 mL de DMF se le adicionó una disolución de $\text{Ni}(\text{AcO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mmol) en 4 mL de H_2O . La mezcla resultante de color verde se puso a reflujo durante 7 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se filtró el precipitado obtenido y se lavó con EtOH y éter. Anal. calc. para **$\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{10}\text{N}_4\text{H}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{11}(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{13}$ (1)** (2802.99) C, 42.65; H, 4.36; N, 18.84; encontrado C, 42.68; H, 5.21; N, 17.98. IR (KBr) 3446 (br), 2933(m), 2150(m), 1670(vs), 1523(m), 1390(m), 1338(w), 1257(w), 1221(m), 1173(w), 1099(m), 1065(m), 1014(w), 866(w), 787(m), 646(w), 606(w) cm^{-1} .

Síntesis de **[Ni₂(2,5-dihidroxitereftalato)(H₂O)₂](H₂O)₈ (CPO-27-Ni)**. A una disolución de ácido 2,5-dihidroxitereftálico (H₄dhtp) (0.75 mmol) en 10 mL de THF se le adicionó una disolución de Ni(AcO)₂·4H₂O (1.5 mmol) en 10 mL de H₂O. La combinación de ambas disoluciones se hizo reaccionar en condiciones solvotermales a 383 K durante 72 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se filtró el precipitado amarillo obtenido y se lavó con THF y agua. Anal. calc. para **C₈H₂₂O₁₆Ni₂** (491.64) C, 19.54; H, 4.48; O, 52.10; Ni, 23.89; encontrado C, 19.57; H, 4.39; O, 52.04; Ni, 23.54.

Síntesis de **[Fe^{III}₃F(H₂O)₂O(C₆H₃(CO₂)₃)₂·nH₂O (n ≈ 14.5)] (MIL-100(Fe))**. Para la síntesis de la matriz porosa **MIL-100(Fe)** se siguió el procedimiento previamente descrito en bibliografía basado en la reacción hidrotermal de ácido trimésico con hierro metálico, ácido nítrico y agua a 433 K durante 8h.² En la síntesis típica, la composición de la mezcla de reacción fue 55.84 mg (1.0 mmol) de Fe(0): 138.7 mg (0.67 mmol) de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (ácido trimésico) (H₃btc): 35 μL (2.0 mmol) de HF: 50 μL (0.6 mmol) de HNO₃: 5 mL (277 mmol) de H₂O. Trascurrido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró y se obtuvo un sólido cristalino de color naranja **MIL-100(Fe)**. Con el fin de eliminar el posible ligando orgánico excedente de la reacción, el compuesto sintetizado se purificó mediante un proceso de extracción en dos pasos, utilizando agua y etanol. Para ello, en primer lugar 200 mg de **MIL-100(Fe)** se suspendieron con agitación en 100 mL de agua destilada a 343 K durante 3 h y, posteriormente, se agitaron en 100 mL etanol a 338 K durante 3 h. Anal. calc. para **Fe₃X(H₂O)₂O[(C₆H₃)(CO₂)₃]₂·n (H₂O, X = F, n = 14.5)** (914.02) C, 23.65; H, 4.30; encontrado C, 24.21; H, 2.25.

Síntesis de **Fe₃F(H₂O)₂O(C₉H₃O₆)₂(Ru(H₂O)₃Cl₃)₂(H₂O)₃(C₃H₆O) (MIL-100(Fe)@Ru(H₂O)₃Cl₃)**. 210 mg de Ru(H₂O)₃Cl₃ (1.01 mmol) se disolvieron en 20 mL de acetona. Posteriormente, se añadieron 200 mg (0.324 mmol) de **MIL-100(Fe)**, previamente activado, y la mezcla se molturó con el fin de agilizar la evaporación del disolvente y aumentar la concentración de la disolución (hasta que todo el disolvente se evaporó). Finalmente, el producto sólido de color rojo oscuro obtenido se lavó con acetona (10 mL x 2) con el fin de eliminar el exceso de Ru(H₂O)₃Cl₃ que no haya sido adsorbido. Anal. calc. para

$\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2(\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ (MIL-100(Fe)@Ru(H₂O)₃Cl₃) (1287.87) C, 20.15; H, 2.42; encontrado C, 20.01; H, 2.23. Residuo calculado tras el tratamiento térmico de MIL-100(Fe)@Ru(H₂O)₃Cl₃: (RuO₂)₂(Fe₃O₄): 39.76%; encontrado: 41.37%.

Síntesis de $\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2(\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_4\text{Ru}_2)_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3)$ (MIL-100(Fe)@[Ru(*p*-cimeno)Cl]₂Cl₂). 700 mg de MIL-100(Fe)@Ru(H₂O)₃Cl₃ (0.68 mmol) y 1.1 mL de α -terpineno (6.8 mmol) se pusieron a reflujo en etanol (80 mL) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción el sólido se filtró y se lavó con EtOH (10 mL x 2). Anal. calc. para $\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2(\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_4\text{Ru}_2)_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3)$ (MIL-100(Fe)@[Ru(*p*-cimeno)Cl]₂Cl₂) (1274.51) C, 26.39; H, 2.85; encontrado C, 26.36; H, 2.92. Residuo calculado tras el tratamiento térmico de MIL-100(Fe)@[Ru(*p*-cimeno)Cl]₂Cl₂: (RuO₂)₂(Fe₃O₄): 49.14%; encontrado: 50.33%.

Síntesis de $\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2(\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_6\text{Ru}_2)_{0.4}(\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_4\text{Ru}_2)_{0.1}(\text{H}_2\text{O})_9(\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3)$ (MIL-100(Fe)@Ru_mito). 200 mg de MIL-100(Fe)@[Ru(*p*-cymeno)Cl]₂Cl₂ (0.16 mmol) y 72 mg de clorhidrato de mitoxantrona (C₂₂H₂₈N₄O₆ · 2HCl) (0.16 mmol) se suspendieron en 50 mL de EtOH y se calentaron a 313 K durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción el sólido se filtró y se lavó con EtOH (10 mL x 2). Anal. calc. para $\text{Fe}_3\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2(\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_6\text{Ru}_2)_{0.4}(\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_4\text{Ru}_2)_{0.1}(\text{H}_2\text{O})_9(\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3)$ (MIL-100(Fe)@Ru_mito) (1502.86) C, 29.41; N, 1.49; H, 3.92; encontrado C, 28.73; N, 1.52; H, 2.91. Residuo calculado tras el tratamiento térmico de MIL-100(Fe)@Ru_mito: (RuO₂)₂(Fe₃O₄): 45.54%; encontrado: 47.96%.

Síntesis general para la preparación de ZnBDP_X (X = H, NO₂, NH₂ y OH). En un matraz Schlenk de 50 mL se disolvió H₂BDP_X (0.5 mmol) en DMF (10 mL) y se calentó a 423 K. A continuación, se añadió Zn(CH₃COO)₂·2H₂O (0.5 mmol) a la disolución anterior con agitación. La mezcla se dejó reaccionar durante 7 h a reflujo. Después de enfriar a temperatura ambiente, el sólido blanco se recuperó por filtración, se lavó con metanol (10 mL x 3) y se secó a vacío. Anal. calc. para C₂₀H₃₀N₆ZnO₄ (ZnBDP) (0.138 g, rendimiento 57%)

(483.88) C, 49.64; H, 6.25; N, 17.37; encontrado C, 49.23; H, 5.98; N, 17.42. IR (KBr) 1584 (s), 1350 (s), 1286 (m), 1174 (m), 1133 (s), 1056 (vs), 956 (s), 826 (vs), 723 (w) cm^{-1} . Anal. calc. para **Zn(C₁₂H₇N₅O₂)(C₃H₇NO)₂(CH₃OH)₂(H₂O)₅ (ZnBDP_NO₂)** (0.192 g, rendimiento 62%) (619) C, 38.81; H, 6.35; N, 15.84; encontrado C, 38.63; H, 6.03; N, 16.06. IR (KBr) 3350(br), 1670(vs), 1578(s), 1527(s), 1532(w), 1257(vs), 1134(w), 1092(w), 1064(s), 1012(w), 982(w), 954(w), 869(w), 847(w), 764(w), 739(w), 722(w), 659(w), 623(w) cm^{-1} . Anal. calc. para **Zn(C₁₂H₉N₅)(C₃H₇NO)₂(CH₃OH)(H₂O) (ZnBDP_NH₂)** (0.141 g, rendimiento 58%) (484.8) C, 47.07; H, 6.03; N, 20.22; encontrado C, 47.33; H, 5.74; N, 20.07. IR (KBr) 3409(w), 3341(w), 1675(vs), 1629(w), 1571(s), 1402(w), 1344(w), 1256(s), 1177(w), 1131(s), 1091(w), 1060(s), 1012(w), 995(w), 951(s), 856(w), 810(w), 724(w), 662(w) cm^{-1} . Anal. calc. para **Zn(C₁₂H₈N₄O)(C₃H₇NO)₂(CH₃OH) (ZnBDP_OH)** (0.147 g, rendimiento 63%) (467.8) C, 48.78; H, 5.60; N, 17.96; encontrado C, 48.63; H, 5.98; N, 18.29. IR (KBr) 3470(br), 1675(vs), 1575(s), 1354(w), 1254(s), 1223(w), 1170(w), 1141(w), 1125(w), 1102(w), 1058(s), 1013(w), 955(w), 867(w), 840(w), 814(w), 720(w), 663(w), 603(w) cm^{-1} .

Síntesis de **ZnBDP_OH** asistida por microondas. Para llevar a cabo esta síntesis, se utilizó un reactor Mars 5 (potencia máxima 1600 vatios, frecuencia máxima 2450 MHz, USA). 8.25 mg (0.04 mmol) de H₂BDP_OH y 8.78 mg de Zn(CH₃COO)₂ ó 11.26 mg Zn(2,4-pentanodionato)₂ (0.04 mmol) se mezclaron en 1.5 mL de isopropanol utilizando un reactor de 3.5 mL. La mezcla se hizo reaccionar a 373 K con una rampa de calentamiento de 3 minutos con radiación microondas utilizando 600 vatios de potencia, sin agitación durante 1 h. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, y los sólidos blancos se recogieron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 1 min, y se lavaron con DMF (10 mL x 3), y se secaron a vacío. Se obtuvieron buenos rendimientos para ambas reacciones ($\approx 50\%$).

A.3 Síntesis de metalofármacos de Rutenio.

Síntesis del metalofármaco **[Ru(p-cimeno)Cl₂(pta)]** (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfanoadamantano) (**RAPTA-C**). Para la síntesis de RAPTA-C se siguió el

método descrito en bibliografía.³ En primer lugar, se sintetizó el precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$. Para ello, se preparó una disolución de tricloruro de rutenio trihidratado (4.18 g, 16 mmol) y γ -terpeno (21.8 g, 160 mmol) en etanol (250 mL) y se agitó durante 24 h en condiciones de atmósfera de nitrógeno a 363 K. La mezcla se dejó enfriar y se filtró. A continuación, la disolución se concentró al rotavapor para eliminar el disolvente y el producto obtenido se lavó con EtOH (3 mL x 3). En estas condiciones, se obtuvieron 4.06 g del sólido pulverulento rojo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ (rendimiento 83.7%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 5.45 (d, 2H), 5.32 (d, 2H), 2.90 (septeto, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.26 (d, 6H).

Una vez obtenido el intermedio, se preparó una disolución de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ (0.2 g, 0.33 mmol) y 1,3,5-triaza-fosfanoadamantano (pta) (0.103 g, 0.66 mmol) en 60 mL de metanol. La disolución resultante se agitó durante 24 h calentando a 343 K. Posteriormente, se dejó enfriar y se filtró. A continuación, el disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo obtenido se disolvió en 20 mL de cloroformo y se volvió a filtrar. Finalmente, la disolución se llevó de nuevo al rotavapor y se obtuvieron, aproximadamente, 0.208 g de RAPTA-C como un sólido pulverulento rojizo (rendimiento 68.2%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 5.46 (q, 4H), 4.53 (s, 6H), 4.32 (s, 6H), 2.78 (septeto, CH), 2.08 (s, 3H), 1.22 (d, 6H).

Síntesis del metalofármaco $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**). Se disolvieron el fármaco comercial clorhidrato de mitoxantrona ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{HCl}$) (1 mmol) con un equivalente de $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ (1 mmol) en EtOH (200 mL) a 298 K y se agitó durante 2 h. La mezcla se dejó evaporar hasta sequedad, y se obtuvo un precipitado verde. El sólido se extrajo con CH_2Cl_2 , y mediante la adición de n-hexano se consiguió precipitar el producto final $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**Ru_mito**) de color verde oscuro con un rendimiento moderado (48%). Anal. calc. para $[(\text{C}_{10}\text{H}_{14})_2\text{Ru}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6)\text{Cl}_2](\text{H}_2\text{O})_{3.5}$ (**Ru_mito**) C, 48.18; H, 5.87; N, 5.35; encontrado C, 48.27; H, 6.12; N, 5.57. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ : 7.53 (s, 2H, mito), 7.86 (s, 2H, mito), 5.67 (dd, 4H, Cim), 5.56 (d, 4H, Cim), 4.43 (dd, 2H, mito), 3.79 (m, 4H, mito), 3.64 (m, 2H, mito), 3.36 (m, 2H, mito), 2.93 (m, 2H, mito), 2.79 (m, 2H, Cim), 2.69 (m, 2H, mito), 2.20 (s, 6H, Cim), 2.05 (m, 2H,

mito), 1.23 (m, 12H, Cim). Espectro de masas ESI (MeOH) m/z +948.1844 $[(C_{10}H_{14})_2Ru_2(C_{22}H_{26}N_4O_6)Cl]^+$, 100%].

A.4 Materiales y Métodos.

Análisis elemental.

La determinación del contenido en carbono, hidrógeno y nitrógeno de los diferentes compuestos se ha realizado en un analizador elemental THERMO SCIENTIFIC Modelo Flash 2000 compuesto por una microbalanza de precisión METTLER M-3, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para la muestra **CPO-27-Ni@RAPTA-C** se utilizó un analizador elemental Carlo Erba 1108 de la Universidad Metropolitana de Londres, Reino Unido.

Espectroscopía infrarroja.

Los espectros IR se han obtenido en un espectrofotómetro con transformada de Fourier THERMO NICOLET IR200 (Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada) empleando KBr como medio dispersante en las pastillas. Para la muestra **CPO-27-Ni** y sus derivados se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum GX, disponible en la Escuela de Química de la Universidad de Saint Andrews, Escocia. La presencia de NO en la matriz porosa se confirmó mediante espectroscopía IR utilizando un espectrofotómetro Bruker Equinox 55, equipado con un detector MCT y con una resolución espectral de 2 cm^{-1} , disponible en la Facultad de Química de la Universidad Jaguelónica, Polonia.

Identificación de NO mediante espectroscopía infrarroja. Antes del proceso de adsorción, el gas NO se destiló mediante ciclos de congelación/descongelación con el fin de eliminar cualquier traza o impureza. Para los estudios de IR, las muestras **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C** se compactaron en forma de obleas y se activaron en la propia celda del espectrofotómetro de IR. En primer lugar, se hizo vacío en la celda del espectrofotómetro a temperatura ambiente

durante 30 min y, posteriormente, las muestras se calentaron a 423 K con una rampa de calentamiento de 5 K/min, y se mantuvo a esta temperatura y a vacío durante 12 h. Las medidas de adsorción se llevaron a cabo por IR utilizando una celdilla con volumen calibrado (5 cm³). Posteriormente, el NO se introdujo en la celdilla y se expusieron las muestras a este gas.

Resonancia magnética nuclear.

Los espectros de RMN control del RAPTA-C y de su precursor [Ru(η⁶-p-cimeno)Cl₂]₂, del ligando **Boc₂L₄** y sus precursores, del compuesto **Ru_Mito** y los estudios de su interacción con los aminoácidos N y S dadores, y de los ligandos H₂BDP_X (X = H, NO₂, NH₂ y OH) se registraron en un espectrómetro de RMN de 400 MHz (2 canales) VARIAN INOVA UNITY que se encuentra en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los espectros fueron registrados en CDCl₃ (para el **RAPTA-C** y su precursor, y el **Boc₂L₄** y su precursor), MeOD (para el **Ru_mito**, **Ru_mito** + cisteína, **Ru_mito** + histidina) y DMSO-d⁶ (para los ligandos **H₂BDP_X** y sus precursores, y para **Ru_mito** + glutatión).

Caracterización estructural mediante difracción de rayos X en polvo.

Los datos de difracción de rayos X en polvo han permitido resolver la estructura de **[Ni₈(OH)₄(H₂O)₂(4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)₆]_n**. Previamente a la medida, el compuesto fue manualmente molturado usando un mortero de ágata y, posteriormente, depositado en el orificio de un portamuestras de aluminio de fondo cero. Los datos de difracción de rayos X se midieron en un difractómetro Bruker AXS D8 Advance (disponible en el Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales de la Universidad de Insubria, Como, Italia), equipado con una fuente de radiación CuKα (λ = 1.5418 Å), un filtro de Ni en el haz difractado y un detector lineal Lynxeye. El generador se fijó a 40 kV y 40 mA. La resolución de la estructura cristalina mediante métodos computacionales *ab initio* fue llevada a cabo por el grupo del Prof. Norberto Masciocchi (Universidad de Insubria, Como, Italia). Los datos detallados referentes al registro del difractograma, así como la resolución

estructural se pueden consultar en los artículos correspondientes que se adjuntan como anexos.

Por otra parte, se han medido de forma rutinaria difractogramas de RX en polvo de los distintos MOFs con objeto de comprobar la pureza de fase de los materiales obtenidos en diferentes síntesis, verificar la cristalinidad de estos materiales después la encapsulación de fármacos o después de los ensayos de estabilidad química o mecánica, etc. Estos difractogramas de RX en polvo se han registrado en un difractómetro Bruker D2-PHASER (disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada) usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), y un detector Lynxeye. Antes de las medidas, los compuestos siempre se han molturado manualmente usando un mortero de ágata y, posteriormente, se han depositado en el orificio de un portamuestras de monocristal de silicio de fondo cero. Los datos se registraron en un rango 2θ de $3\text{-}35^\circ$ cada 0.02° y a intervalos de tiempo de 0.5 segundos. Sólo en el caso de la matriz **CPO-27-Ni** y sus derivados se ha utilizado un difractómetro Stoe Stadip, disponible en la Escuela de Química de la Universidad de Saint Andrews, Escocia. Los datos se registraron en un rango de 2θ de $5\text{-}50^\circ$ cada 0.02° , usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Por otra parte, los difractogramas de RX en polvo para la serie **ZnBDP_X** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) (seguimiento de la síntesis de nanopartículas y estudios de estabilidad coloidal) se han medido en un difractómetro Bruker D8 Advance, disponible en la Universidad de Versailles-St-Quentin, Francia. Los datos se registraron en un rango de 2θ de $2\text{-}50^\circ$ cada 0.02° y 22 segundos en cada paso, usando radiación $\lambda_{\text{Cu}}, \text{K}\alpha_1, \text{K}\alpha_2$ ($\lambda = 1.54051, 1.54433 \text{ \AA}$).

Estudio del tamaño de partícula de las redes metalorgánicas.

Para el estudio del tamaño de partícula de **1**, **CPO-27-Ni**, **MIL-100(Fe)** y la serie **ZnBDP_X** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) se han utilizado distintas técnicas.

Dispersión dinámica de la luz (DLS).

Las medidas de dispersión dinámica de la luz para la serie **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂ y OH) se realizaron en un Malvern Nano-ZS, Zetasizer Nano, disponible en la Universidad de Versailles-St-Quentin, Francia. Para las medidas de dispersión de las muestras se suspendió el compuesto desolvatado en el disolvente a estudiar con una concentración final de 1 mg/mL. Utilizando una punta sonicadora Digital Sonifer 450 Branson, las suspensiones se sonicaron a diferentes amplitudes (desde 10% a 40%) durante 0.5 ó 1 min. Para amplitudes mayores a 20% se utilizó un baño de hielo para evitar la agregación de las partículas por el calor.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las imágenes de **1** y **CPO-27-Ni** se obtuvieron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido de Presión Variable, de Alta Resolución (FESEM) *Zeiss SUPRA40VP*. Las imágenes de alta resolución se obtuvieron utilizando electrones secundarios, y operando a voltaje bajo, 3 kV, y alto vacío. Dado que las muestras no son conductoras, es necesario recubrirlas de una fina capa de carbono, evitando así la acumulación de cargas sobre la superficie. Tanto las medidas de microscopía como la preparación de muestras fueron llevadas a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las imágenes de **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂ y OH) se obtuvieron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 6335F a 15 KV acoplado a una unidad Oxford Instrument X-Max 80 mm² disponible en la Universidad de Versailles-St-Quentin, Francia. Dado que las muestras no son conductoras, es necesario recubrirlas de una fina capa de oro, evitando así la acumulación de cargas sobre la superficie.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las imágenes de **MIL-100(Fe)** y sus derivados se obtuvieron utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT del Centro de Instrumentación Científica de la

Universidad de Granada. Las imágenes de alta resolución se obtuvieron utilizando un filamento LaB6 como fuente de electrones, y operando con un voltaje de entre 80 y 120 KV. Asimismo, el análisis químico puntual de las muestras se llevó a cabo mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X mediante un detector XEDS_Oxford INCA 350.

Caracterización textural. Medida de las isotermas de adsorción de N₂.

Se midieron las isotermas de adsorción de N₂ a 77 K de las redes metalorgánicas con el objetivo de establecer si su porosidad era permanente, así como de determinar su superficie específica y/o volumen de poros. En la mayoría de los casos estas medidas se realizaron en un equipo Micromeritics Tristar 3000 de adsorción volumétrica del Departamento de Petrología y Mineralogía de la Universidad de Granada. Por su parte, el compuesto **CPO-27-Ni** y sus derivados fueron medidos en un equipo Micromeritics Tristar 3000 de adsorción volumétrica de la Escuela de Química de la Universidad de Saint Andrews, Escocia.

En todos los casos, el análisis de los datos obtenidos mediante el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) permitió determinar el área superficial específica de cada una de las muestras. Antes de llevar a cabo las medidas, las muestras se activaron mediante calentamiento -[Ni₈(OH)₄(H₂O)₂(4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)₆]_n (**1**) (403 K, 7h); **CPO-27-Ni** (423 K, 12h); **MIL-100(Fe)** (473 K, 7h); **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂ y OH) (453 K, 12h)- y a vacío a 10⁻⁶ bar (excepto para el **CPO-27-Ni** donde se utilizó 10⁻⁴ bar). Las muestras cargadas con fármacos también se activaron en las siguientes condiciones de calentamiento: **1@RAPTA-C** (373 K, 7h); **CPO-27-Ni@RAPTA-C** (423 K, 12h); **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** (373 K, 7h); **MIL-100(Fe)@Ru_Mito** (373 K, 7h), **ZnBDP_X@RAPTA-C** (373 K, 7h) y **ZnBDP_X@Mitoxantrona** (373 K, 7h)- y de vacío a 10⁻⁶ bar (excepto para el **CPO-27-Ni@RAPTA-C** que se utilizó 10⁻⁴ bar). Hay que recordar que en el caso del compuesto **1**, las muestras habían sido intercambiadas previamente con CH₂Cl₂ durante 7h. Para ello, 100 mg del sólido inicial **1@H₂O@DMF** se suspendieron durante 4 h en 200 mL de CH₂Cl₂ bajo agitación para obtener el sólido intercambiado **1@CH₂Cl₂**.

Análisis termogravimétrico.

Los análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido se llevaron a cabo mediante un analizador termogravimétrico SHIMADZU-TGA-50H/DSC, con un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (IRFT) NICOLET mod. 550 acoplado, en atmósfera reactiva de aire y con una rampa de calentamiento de 20 K min⁻¹, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Sólo en el caso del **CPO-27-Ni** y sus derivados se utilizó un equipo NETZSCH TG 209, con una rampa de calentamiento de 5 K min⁻¹ en atmósfera reactiva de aire, disponible en la Escuela de Química de la Universidad de Saint Andrews, Escocia.

Ensayos de estabilidad mecánica de la red metalorgánica 1.

Para evaluar la estabilidad mecánica del compuesto **1**, se prepararon pastillas de, aproximadamente, 100 mg del MOF, y se le aplicaron valores específicos de presión de 1 y 2 toneladas cm⁻² durante 1 minuto utilizando una prensa. A continuación, se molturaron las pastillas y se registraron los correspondientes difractogramas de rayos X en polvo (difractómetro Bruker D2-PHASER) para comprobar si la cristalinidad de **1** se había modificado. Finalmente, se midieron las isothermas de adsorción/desorción de N₂ a 77 K (Micromeritics Star 3000) en el rango de bajas presiones (0 - 1 atm) para comprobar si el material seguía siendo poroso.

Ensayos de estabilidad química de las matrices porosas 1, CPO-27-Ni y ZnBDP_X.

Para la evaluación de la estabilidad química se agitó el compuesto objeto de estudio en disoluciones acuosas a distinto pH y en disolventes orgánicos comunes a temperatura ambiente y a reflujo durante diferentes períodos de tiempo. Se realizaron varias experiencias.

Para evaluar la estabilidad química del compuesto **1**, en primer lugar, se agitaron 5 mg de la especie **1@H₂O@DMF** en una disolución acuosa de NaOH

(0.05M) (2.5 mL) a temperatura ambiente durante 24 h. También, se sometieron 20 mg de **1@H₂O@DMF** a condiciones de reflujo en metanol y agua (20 mL), durante 24 h. Finalmente, se tomaron 20 mg de **1@H₂O@DMF** y se agitaron en 40 mL de fluido corporal simulado (FCS) a 310 K durante una semana. Después de cada ensayo, se recuperó el sólido por filtración y se registró el correspondiente difractograma de RX en polvo con el fin de comprobar la estabilidad química del compuesto.

Por otro lado, para el estudio de la estabilidad química del compuesto **CPO-27-Ni** se pesaron 5 mg de **CPO-27-Ni**, previamente activado, y se agitaron en 10 mL de MeOH, CH₂Cl₂ y THF, todo ellos anhidros, durante 3 días a temperatura ambiente. Después, se recuperaron las muestras por filtración y se registraron los correspondientes difractogramas de RX en polvo, con el fin de comprobar la estabilidad química del compuesto. Asimismo, se midieron las isotermas de N₂ a 77 K, con el fin de comprobar si el **CPO-27-Ni** seguía siendo poroso tras los diferentes tratamientos químicos.

Finalmente, para el estudio de la estabilidad química del compuesto **ZnBDP** se suspendieron 20 mg de **ZnBDP**, previamente activado, en 40 mL de MeOH a temperatura ambiente durante 4 h. Después, la suspensión se filtró y se registró el correspondiente difractograma de RX en polvo, con el fin de comprobar la estabilidad química del compuesto.

Ensayos de estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂ y OH).

Para evaluar la estabilidad coloidal de **ZnBDP_X** se utilizaron diferentes medios fisiológicos simulados. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando la instrumentación disponible en la Universidad de Versailles-St-Quentin, Francia.

- Preparación de medios fisiológicos simulados (intravenosos y orales):

Todos los medios se prepararon doblemente concentrados, teniendo en cuenta la dilución inicial a ½. La disolución de PBS (doblemente concentrada) se

preparó diluyendo un sobre preparado de PBS (P4417, Sigma Aldrich) en la mitad de volumen indicado. La disolución de PBS dopada con BSA (albúmina de suero bovino) se preparó añadiendo la albúmina lentamente en agitación hasta conseguir una concentración final del 10.8% p/v. La mezcla se agitó durante 1.5 h, hasta conseguir la completa disolución del sólido y obtener una mezcla viscosa.

La disolución de fluido intestinal simulado (SIF) se preparó siguiendo el método descrito en la European Pharmacopeia 7.0.⁴ En primer lugar, se disolvieron 3.4 g de KH_2PO_4 en 125 mL de agua MilliQ, y se añadieron 38.5 mL de una disolución de NaOH (0.2 M) bajo agitación. Posteriormente, se añadió agua MilliQ hasta alcanzar un volumen total de 250 mL, y se ajustó el pH a 6.8 con una disolución de NaOH (2 M). A partir de la disolución de SIF, se preparó la disolución de SIF de baja fuerza iónica (SIF diluido 1/25, abreviado como *lis*-SIF). Mediante el uso de fluido intestinal diluido (*lis*-SIF) se pretende evitar la posible desestabilización de las nanopartículas causada por las sales presentes en el medio, ya que se trata de un medio con una concentración de electrolitos baja que permite diferenciar y estudiar el efecto de las proteínas o enzimas en la estabilidad coloidal de la suspensión. A continuación, para preparar la disolución de fluido intestinal simulado dopado con pancreatina, se añadió pancreatina a una disolución de *lis*-SIF (doblemente concentrada) en agitación hasta conseguir una concentración final del 2% p/v, y se agitó durante 3 horas. Posteriormente, la disolución se centrifugó (10500 rpm, 10 min) para eliminar los agregados de pancreatina. La suspensión sobrenadante se utilizó para las medidas de estabilidad coloidal del **ZnBDP_OH**. De forma similar, para preparar la disolución de fluido corporal simulado dopado con mucina, se añadió mucina a una disolución de *lis*-SIF (doblemente concentrada) hasta alcanzar una concentración final del 10% p/v, y se agitó durante 3.5 h, hasta conseguir una mezcla densa. Antes de llevar a cabo los análisis, los medios fisiológicos simulados se mantuvieron a 310 K en una incubadora. Todos los medios se utilizaron frescos, con el fin de evitar la oxidación de las enzimas y de las proteínas.

- Ensayos de estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_X**:

En primer lugar, se estudió la estabilidad coloidal de la serie activada **ZnBDP_OH** suspendiendo 1 mg de nanoMOF en 10 mL de diferentes disoluciones (agua MilliQ, una disolución de NaCl (1 mM), etanol y DMF) (concentración final 0.1 mg/mL). Posteriormente, las suspensiones se sonicaron utilizando una punta sonicadora (Digital Sonifer 450, Branson) en diferentes condiciones de amplitud y tiempo de sonicación (de 10 a 40 % y de 30 segundos a 1 minuto, respectivamente), y se realizaron medidas de DLS (Malvern Nano-ZS, Zetasizer Nano) a 298 K con el fin de determinar el tamaño de partícula y la carga superficial (potencial ζ). Para los casos en los que durante la sonicación se han aplicado amplitudes mayores del 20%, se utilizó un baño de hielo para evitar la posible agregación producida por el calor. Finalmente, las nanopartículas se filtraron y se registraron los difractogramas de RX en polvo para comprobar la estabilidad química de los compuestos.

A continuación, se estudió el efecto del pH en la estabilidad de los nanoMOFs **ZnBDP_X**. En primer lugar, se prepararon suspensiones de 10 mg de nanoMOF activado en 100 mL de agua MilliQ (concentración final 0.1 mg/mL). Las medidas de pH se realizaron utilizando un pH-metro Thermo Scientific ATI Orion, 8163. A diferentes valores de pH, la suspensión previamente agitada (1.5 mL), se dispersó con una punta sonicadora (utilizando un 10% de amplitud durante 1 minuto) y se realizaron medidas de DLS a 298 K con el fin de determinar el tamaño de partícula y el potencial ζ . El valor del pH de las disoluciones se ajustó (en un rango de entre 1 y 12) añadiendo bajo agitación disoluciones diluidas de NaOH y HCl (0.03 M). Por otro lado, la estabilidad química de la serie isorreticular **ZnBDP_X** se estudió mediante difracción de RX en polvo suspendiendo 2 mg de nanoMOF en 1 mL de agua MilliQ a diferentes valores de pH (1.2, 3, 8 y 12), y se mantuvieron en una incubadora con agitación orbital a 310 K durante 1 hora. Posteriormente, las nanopartículas se filtraron y se registraron los difractogramas de RX en polvo para comprobar su estabilidad química.

Finalmente, se estudió en profundidad la evolución de la estabilidad coloidal de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en agua MilliQ, en condiciones intravenosas y en condiciones orales a tiempos cortos (10 min) y durante un período largo (24 h) a 310 K. En primer lugar, se suspendieron 2 mg de **ZnBDP_OH** en 10 mL de agua MilliQ y se sonicaron durante 1 minuto al 10%. Posteriormente, se realizaron medidas de DLS tras mezclar las suspensiones del nanoMOF preparadas en agua MilliQ con diferentes medios (en un ratio 1:1): agua MilliQ, en tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), en PBS dopado con albumina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) a diferentes concentraciones -PBS+BSA (0.54% p/v) y PBS+BSA (5.4% p/v)-, en fluido intestinal simulado (*Simulated body fluid*, SIF), fluido intestinal diluido (*lis-SIF*) y en *lis-SIF* dopando con pancreatina y mucina a diferentes concentraciones -*lis-SIF*+pancreatina (0.1% p/v), *lis-SIF*+pancreatina (1% p/v), *lis-SIF*+mucina (0.05% p/v) y *lis-SIF*+mucina (0.5% p/v)-. Todos los medios se prepararon con una concentración doble ya que se ha considerado la dilución a ½ previa a las medidas de DLS (con una concentración final de **ZnBDP_OH** de 0.1 mg/mL). Después de mezclar la suspensión de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** en agua MilliQ con los diferentes medios fisiológicos, no se volvió a sonicar la mezcla, puesto que lo que se pretendía era evaluar la evolución de la estabilidad coloidal en presencia del medio biológico. Todos los estudios cinéticos se realizaron a 310 K utilizando disoluciones previamente incubadas a esa temperatura y ajustando la temperatura del soporte de la cubeta del DLS. Las medidas de DLS se realizaron a diferentes tiempos: en detalle durante los primeros 10 minutos y, a continuación, a 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. Cada experimento se realizó por triplicado. En todos los estudios de estabilidad, se midió tanto el tamaño como la carga superficial de las nanopartículas (potencial ζ). En paralelo, se estudió la cristalinidad de las suspensiones filtradas mediante difracción de RX en polvo a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 24 horas).

A.5 Estudios de incorporación de moléculas bioactivas en las redes metalorgánicas.

Incorporación de las drogas RAPTA-C, Ru_mito y mitoxantrona.

Los procesos de adsorción de las drogas en las matrices porosas (isotermas de adsorción sólido-líquido a 298 K) así como las cinéticas de liberación de los fármacos en fluido corporal simulado (FCS a 310 K) se monitorizaron mediante UV-vis. Para el estudio de la incorporación/liberación de RAPTA-C en **1**, RAPTA-C y $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3$ en **MIL-100(Fe)**, y RAPTA-C y mitoxantrona en **ZnBDP_X** (X = H, NO_2 , NH_2 y OH), el espectrofotómetro utilizado fue un Thermo Unicam UV 300 (Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada). Sin embargo, para el estudio de la incorporación/liberación de RAPTA-C en el **CPO-27-Ni** se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS, disponible en la Escuela de Química de la Universidad de Saint Andrews, Escocia. En todos los casos, los espectros fueron registrados a temperatura ambiente (para los procesos de adsorción) y a 310 K (para los procesos de liberación) en un rango de longitud de onda entre 250 - 600 nm. Según el caso, el proceso de carga de la droga en el MOF correspondiente se realizó utilizando distintos disolventes: **1@RAPTA-C** (agua destilada), **MIL-100(Fe)@Ru(H₂O)₃Cl₃** (acetona), **MIL100(Fe)@RAPTA-C** (etanol absoluto), **CPO-27-Ni@RAPTA-C** (MeOH, CH_2Cl_2 y THF), **ZnBDP_X@Mitoxantrona** (MeOH) y **ZnBDP_X@RAPTA-C** (MeOH). Sin embargo, en todos los casos, se estudió el proceso de liberación de la droga en fluido corporal simulado. El análisis de los datos obtenidos permitió calcular la carga máxima de cada fármaco, así como la reversibilidad del proceso de adsorción y la cinética de liberación del mismo en fluido corporal simulado.

Por otra parte, la máxima cantidad de fármaco incorporado a las redes porosas también se confirmó con otras técnicas como análisis elemental, termogravimetría y reflectancia total atenuada (ATR). En este último caso, utilizando un espectrofotómetro JASCO 6200, con software SPECTRA

MANAGER v2 disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

En el caso de la incorporación de la mitoxantrona a la serie **ZnBDP_X** (H = H y NH₂), la cantidad de fármaco adsorbido en la red porosa también se determinó mediante reflectancia difusa (DR). El espectrofotómetro utilizado para estas medidas es un VARIAN, mod. CARY-5E, dotado con un dispositivo “mantis religiosa” para el análisis de pequeñas cantidades de muestra sólida disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Isotermas de adsorción de las drogas sólido-líquido.

Antes de estudiar la encapsulación de las drogas todas las matrices porosas fueron activadas.

- Medida de la isoterma de adsorción de RAPTA-C en **[Ni₈(OH)₄(H₂O)₂(4,4'-(buta-1,3-diino-1,4-diil)bispirazolato)₆]_n (1) (1@RAPTA-C)** a 298 K. El proceso de adsorción se llevó a cabo mediante la impregnación de la red porosa activada **1** en disoluciones acuosas de RAPTA-C con concentraciones crecientes (C₀ = 0.022 - 0.0043 - 0.0086 - 0.0129 - 0.0151 - 0.0173 - 0.0216 - 0.0281 - 0.0345 M). Con este objetivo, se prepararon disoluciones con 5 - 10 - 20 - 30 - 35 - 40 - 50 - 65 - 80 mg, respectivamente, de RAPTA-C en 5 mL de agua destilada y para asegurar la completa disolución del RAPTA-C se agitaron durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 mg de **1** a cada una de las disoluciones anteriores y se agitó durante 4 h para dejar que se alcanzara el equilibrio de adsorción. Posteriormente, cada muestra se centrifugó en una centrífuga Sigma 3-30 K, utilizando tubos provistos de una membrana de polietersulfona (30.000 KDa), a 8000 rpm durante 10 min, de manera que la matriz porosa con el RAPTA-C encapsulado, **1@RAPTA-C**, quedó en el filtro y, en disolución, el RAPTA-C que no había sido incorporado a la red porosa **1**. A continuación, se registraron los espectros de UV-visible de las diferentes disoluciones de RAPTA-C. A partir de la intensidad de la banda característica del RAPTA-C a 323 nm y, aplicando la ley de Lambert Beer, se pudo determinar la concentración de RAPTA-C en la

disolución y, teniendo en cuenta la concentración de RAPTA-C inicial (C_0), se pudo calcular la cantidad de RAPTA-C adsorbida en **1** (3.97 mmol de RAPTA-C por mmol de **1**). Estos datos permitieron representar la isoterma de adsorción de RAPTA-C y determinar la carga máxima de **1** en agua destilada y a temperatura ambiente.

- Medida de la isoterma de adsorción de RAPTA-C en **ZnBDP** (**ZnBDP@RAPTA-C**) a 298 K. El proceso de adsorción se llevó a cabo mediante la impregnación de la red porosa activada **ZnBDP** en disoluciones de RAPTA-C en metanol con concentraciones crecientes ($C_0 = 0.0008, 0.0017, 0.0035, 0.0043, 0.0052, 0.006, 0.0069, 0.0086$ y 0.0104 M). Con este objetivo, se prepararon disoluciones con 4, 8, 16, 20, 24, 28, 32, 40 y 48 mg, respectivamente, de RAPTA-C en 10 mL de metanol y para asegurar la completa disolución del RAPTA-C se agitaron durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 mg de **ZnBDP** a cada una de las disoluciones anteriores y se agitaron durante 4 h para dejar que se alcanzara el equilibrio de adsorción. Posteriormente, cada muestra se centrifugó en una centrífuga Sigma 3-30 K, utilizando tubos provistos de una membrana de polietersulfona (30.000 KDa), a 8000 rpm durante 10 min, de manera que la matriz porosa con el RAPTA-C encapsulado, **ZnBDP@RAPTA-C**, quedara en el filtro y, en disolución, el RAPTA-C que no había sido incorporado a la red porosa **ZnBDP**. A continuación, se registraron los espectros de UV-visible de las diferentes disoluciones de RAPTA-C. A partir de la intensidad de la banda característica del RAPTA-C a 338 y 466 nm y, aplicando la ley de Lambert Beer, se pudo determinar la concentración de RAPTA-C en la disolución y, teniendo en cuenta la concentración de RAPTA-C inicial (C_0), se pudo calcular la cantidad de RAPTA-C adsorbida en **ZnBDP** (0.55 mmol de RAPTA-C por mmol de **ZnBDP**). Estos datos permitieron representar la isoterma de adsorción de RAPTA-C y determinar la carga máxima de RAPTA-C en **ZnBDP** utilizando metanol como disolvente y a temperatura ambiente.

- Incorporación de RAPTA-C en **CPO-27-Ni** a 298 K. En primer lugar se prepararon disoluciones de RAPTA-C (saturadas al 80%) en diferentes

disolventes anhidros (metanol, tetrahidrofurano y diclorometano). El proceso de adsorción se llevó a cabo a 298 K suspendiendo 90 mg de **CPO-27-Ni** activado en cada una de las disoluciones de RAPTA-C en agitación durante 24 h para dejar que se alcanzara el equilibrio de adsorción. Posteriormente, cada una de las muestras se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos hasta separar la matriz cargada **CPO-27-Ni@RAPTA-C** de la disolución con el RAPTA-C que no se había adsorbido. A partir de la intensidad de las bandas características del RAPTA-C en los diferentes disolventes: 339 y 470 nm (CH₂Cl₂), 338 y 466 nm (MeOH) y 336 y 432 nm (THF) y, aplicando la ley de Lambert Beer, se pudo determinar la concentración de RAPTA-C en las tres disoluciones y, teniendo en cuenta la concentración de RAPTA-C inicial (C₀), se pudo calcular la cantidad de RAPTA-C adsorbida en el **CPO-27-Ni** (0.23 mmol de RAPTA-C por mmol de **CPO-27-Ni** en CH₂Cl₂, 0.13 mmol de RAPTA-C por mmol de **CPO-27-Ni** en MeOH y 0.02 mmol de RAPTA-C por mmol de **CPO-27-Ni** en THF). Anal. calc. para **Ni₂(H₂O)₂(C₈H₂O₆)(H₂O)₈(C₁₆H₂₅Cl₂N₃PRu)_{0,23} (H₂O) (CPO-27-Ni@RAPTA-C)** (utilizando CH₂Cl₂ como disolvente) C, 22.81; H, 4.88; N, 1.57; encontrado C, 22.20; H, 4.22; N, 1.90. Residuo calculado tras el tratamiento térmico de **CPO-27-Ni@RAPTA-C**: (NiO)₂(RuO₂)_{0,23}: 32.49%; encontrado: 32.84%.

- Incorporación de RAPTA-C en **MIL-100(Fe) (MIL-100(Fe)@RAPTA-C)**: En primer lugar se preparó una disolución de RAPTA-C (0.086 M) en etanol absoluto. El proceso de adsorción se llevó a cabo a 298 K suspendiendo 100 mg de **MIL-100(Fe)** activado en la disolución de RAPTA-C en agitación durante 24 h para dejar que se alcance el equilibrio de adsorción. Posteriormente, la muestra se centrifugó en una centrífuga Sigma 3-30 K, utilizando tubos provistos de una membrana de polietersulfona (30.000 KDa), a 8000 rpm durante 10 min, de manera que la matriz porosa con el RAPTA-C encapsulado, **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**, quede en el filtro y, en disolución, el RAPTA-C que no ha sido incorporado a la red porosa **MIL-100(Fe)**. A partir de la intensidad de las bandas características del RAPTA-C en etanol (352 y 490 nm) y, aplicando la ley de Lambert Beer, se determinó la concentración de RAPTA-C en la disolución y, teniendo en cuenta la concentración de RAPTA-C inicial (C₀), se calculó la cantidad de RAPTA-C adsorbida en **MIL-100(Fe)** (0.82 mmol

de RAPTA-C por mmol de **MIL-100(Fe)**. Anal. calc. para **Fe₃O(H₂O)₂F(C₆H₃(CO₂)₃)₂(H₂O)₉(C₁₆H₂₅Cl₂N₃PRu)_{0.8} (C₆H₁₂PN₃)_{0.45} (MIL-100@RAPTA-C)** C, 32.05; H, 4.29; N, 4.18; encontrado C, 32.62; H, 6.28; N, 4.28. Residuo calculado tras el tratamiento térmico de **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**: (Fe₃O₄)(RuO₂)_{0.8} : 32.59%; encontrado: 30.91%.

- Incorporación de RAPTA-C y mitoxantrona en **ZnBDP_X** (X = X, NO₂, NH₂ y OH). En primer lugar, se prepararon disoluciones de RAPTA-C o mitoxantrona (saturadas al 80%) en metanol, y se suspendieron 100 mg de **ZnBDP_X** en cada una de las disoluciones a 298 K en agitación durante 4 h, con el fin de alcanzar el equilibrio de adsorción. Posteriormente, cada muestra se centrifugó en una centrífuga Sigma 3-30 K, utilizando tubos provistos de una membrana de polietersulfona (30.000 KDa), a 8000 rpm durante 10 min, de manera que se consiguió separar la matriz cargada **ZnBDP_X@RAPTA-C** o **ZnBDP_X@Mitoxantrona** de la disolución con el RAPTA-C o la mitoxantrona que no se había adsorbido. A partir de la intensidad de la bandas características del RAPTA-C en metanol (338 y 466 nm) o de mitoxantrona (614 y 663) y, aplicando la ley de Lambert Beer, se pudo determinar la concentración de RAPTA-C y mitoxantrona para los cuatro MOFs de la serie y, teniendo en cuenta la concentración de RAPTA-C o mitoxantrona inicial (C₀), se calculó la cantidad de RAPTA-C o mitoxantrona adsorbida en **ZnBDP_X** (0.55 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP**, 0.22 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NO₂**, 0.12 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NH₂** y 0.15 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_OH** para el RAPTA-C, y 0.50 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP** y 0.21 mmol mmol⁻¹ en **ZnBDP_NH₂** para la mitoxantrona).

Determinación de la cantidad máxima de droga incorporada en los MOFs mediante otras técnicas.

Análisis elemental:

Anal. calc. para **Zn(C₁₂H₈N₄)(C₁₆H₂₅Cl₂N₃PRu)_{0.55}(H₂O)₂ (ZnBDP@RAPTA-C)** (563.93) C, 44,30; H, 4,60; N,14,03; encontrado C, 44.37; H, 5.65; N, 14.60.

ANEXO A

Anal. calc. para $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_2)(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.22}(\text{CH}_3\text{OH})_{1.5}(\text{H}_2\text{O})$
(**ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**) (486.4) C, 42.03; H, 4.25; N, 16.30; encontrado C,
41.23; H, 6.54; N, 16.40.

Anal. calc. para $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5)(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.11}(\text{CH}_3\text{OH})_{1.5}(\text{H}_2\text{O})_2$
(**ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**) (423.57) C, 43.27; H, 5.18; N, 17.63; encontrado C,
43.55; H, 7.91; N, 17.30.

Anal. calc. para $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O})(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.15}(\text{H}_2\text{O})_{1.5}$
(**ZnBDP_OH@RAPTA-C**) (385.92) C, 44.81; H, 3.85; N, 16.15; encontrado C,
43.90; H, 4.90; N, 16.12.

Anal. calc. para $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4)(\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6)_{0.5}(\text{CH}_3\text{OH})(\text{H}_2\text{O})$
(**ZnBDP@Mitoxantrona**) (545.91) C, 52,8; H, 5,16; N,15,39; encontrado C,
51,57; H, 4,88; N, 16,64.

Anal. calc. para $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5)(\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6)_{0.2}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})$
(**ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**) (522.67) C, 44,58; H, 5,7; N,18,22; encontrado
C, 43,23; H, 4,75; N, 18,57.

Termogravimetría:

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de
 $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4)(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.55}(\text{H}_2\text{O})_2$ (**ZnBDP@RAPTA-C**): $(\text{ZnO})(\text{RuO}_2)_{0.55}$:
29.31%; encontrado: 32.12%.

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de
 $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_2)(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.22}(\text{CH}_3\text{OH})_{1.5}(\text{H}_2\text{O})$ (**ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**): $(\text{ZnO})(\text{RuO}_2)_{0.22}$: 28.77%; encontrado: 29.35%.

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de
 $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5)(\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PRu})_{0.11}(\text{CH}_3\text{OH})_{1.5}(\text{H}_2\text{O})_2$ (**ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**): $(\text{ZnO})(\text{RuO}_2)_{0.11}$: 27.50%; encontrado: 29.88%.

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de **Zn(C₁₂H₈N₄O)(C₁₆H₂₅Cl₂N₃PRu)_{0.15}(H₂O)_{1.5}** (**ZnBDP_OH@RAPTA-C**): (ZnO)(RuO₂)_{0.15}: 26.26%; encontrado: 27.92%.

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de **Zn(C₁₂H₈N₄)(C₂₂H₂₈N₄O₆)_{0.5}(CH₃OH)(H₂O)** (**ZnBDP@Mitoxantrona**): (ZnO): 26.38%; encontrado: 23.07%.

Residuo calculado tras el tratamiento térmico de **Zn(C₁₂H₉N₅)(C₂₂H₂₈N₄O₆)_{0.2}(H₂O)₄(C₃H₇NO)** (**ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**): (ZnO): 17.95%; encontrado: 18.59%.

ATR:

ATR para **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**. Con el fin de determinar la máxima cantidad de RAPTA-C incorporado a la matriz porosa **MIL-100(Fe)**, en primer lugar se hizo una recta de calibrado. Para ello, se molturaron manualmente diferentes cantidades de **MIL-100(Fe):RAPTA-C** (10:16, 10:12, 10:8, 10:4) manteniendo siempre constante la cantidad de MOF, y se midieron los espectros de reflectancia total atenuada. Además, se midieron las muestras **MIL-100(Fe)**, RAPTA-C y **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**, para obtener el ajuste lineal de la relación entre la Absorbancia de la muestra y los mmol de RAPTA-C por g **MIL-100(Fe)** (Figura A.2). Hay que destacar que para calcular la cantidad de RAPTA-C absorbida se eligieron máximos de IR (806, 1014 y 972 cm⁻¹) donde RAPTA-C presenta máximos de adsorción, mientras que la matriz porosa **MIL-100(Fe)** no absorbe. Los cálculos se realizaron para varias λ y se hizo la media de todas ellas.

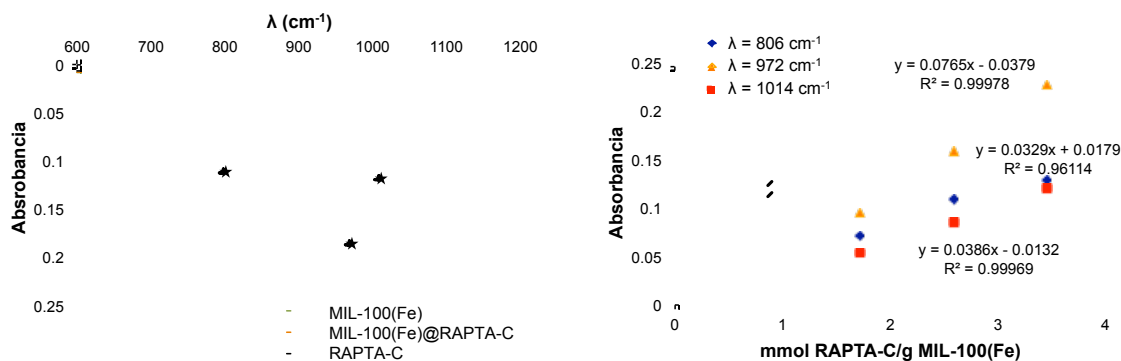
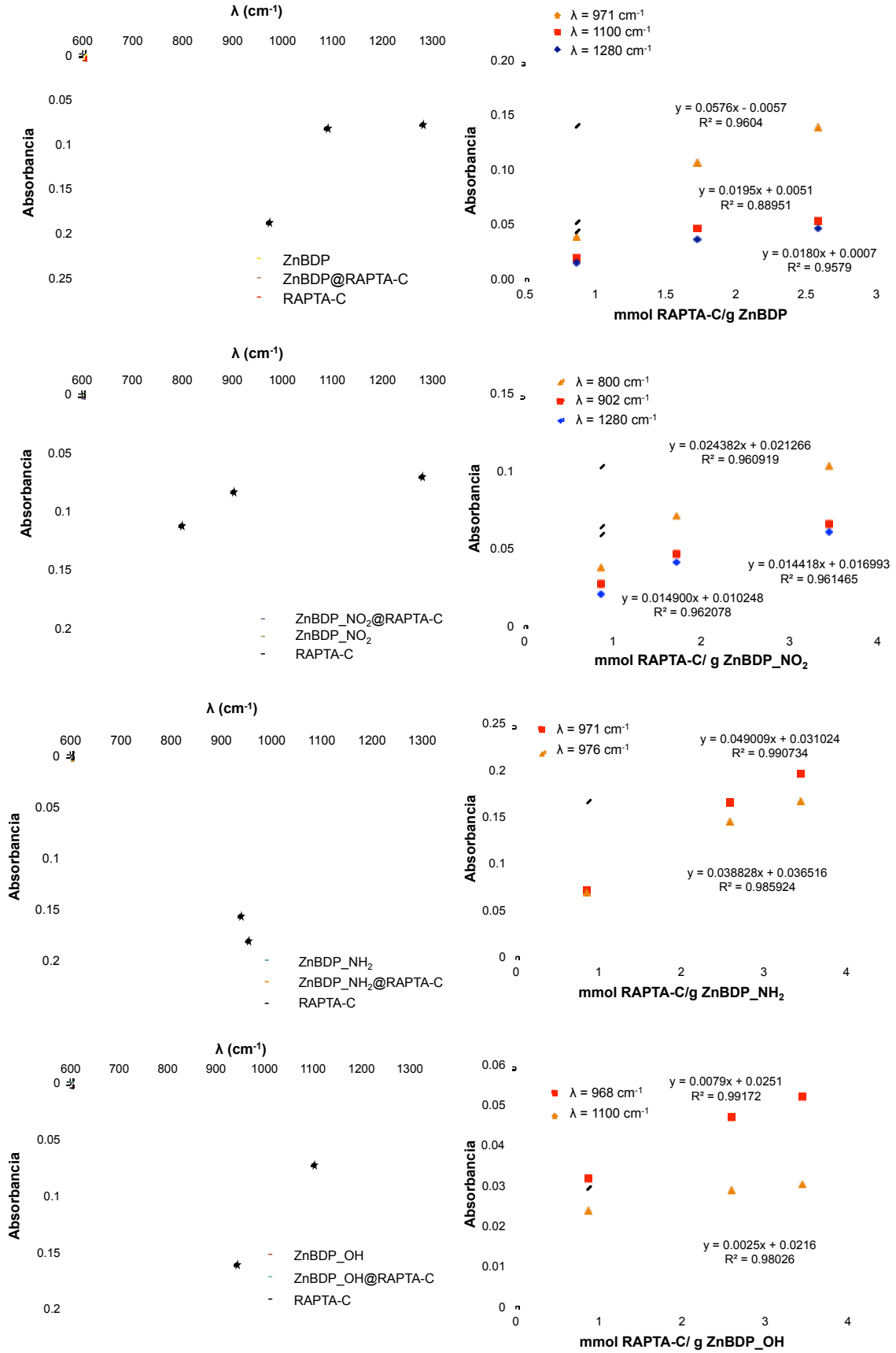


Figura A.2. Izquierda: representación de los datos de ATR para los compuestos **MIL-100(Fe)**, **RAPTA-C** y **MIL-100(Fe)@RAPTA-C**. Derecha: ajuste lineal de la relación entre la Absorbancia de la muestra y los mmol RAPTA-C/g de **MIL-100(Fe)**.

ATR para **ZnBDP_X@RAPTA-C** y **ZnBDP_X@Mitoxatrona**. Con el fin de determinar la cantidad de RAPTA-C y mitoxatrona adsorbidos en la serie **ZnBDP_X** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH), en primer lugar, se hicieron las rectas de calibrado. Para ello, se molturaron manualmente diferentes cantidades de **ZnBDP_X:RAPTA-C** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) y **ZnBDP_X:mitoxatrona** ($X = \text{H}$ y NH_2) (10:16, 10:12, 10:8, 10:4) manteniendo siempre la misma cantidad de MOF, y se midieron los espectros de reflectancia total atenuada. Además, se midieron las muestras **ZnBDP_X**, **RAPTA-C**, **mitoxatrona**, **ZnBDP_X@RAPTA-C** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) y **ZnBDP_X@Mitoxatrona** ($X = \text{H}$ y NH_2) y se obtuvo el ajuste lineal de la relación entre la Absorbancia de la muestra con los mmol de RAPTA-C por g **ZnBDP_X** ($X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$ y OH) o mmol mitoxatrona/g **ZnBDP_X** ($X = \text{H}$ y NH_2) (Figura A.3). Hay que destacar que para calcular la cantidad del RAPTA-C adsorbida en la serie **ZnBDP_X** se eligieron máximos de IR donde el RAPTA-C presenta un máximo de absorción, mientras que el **ZnBDP_X** no absorbe ($971, 1100$ y 1280 cm^{-1} para $X = \text{H}$; $805, 902$ y 1280 cm^{-1} para $X = \text{NO}_2$; 971 y 976 para $X = \text{NH}_2$; y 968 y 1100 cm^{-1} para $X = \text{OH}$). Para calcular la cantidad de mitoxatrona adsorbida en la serie **ZnBDP_X** ($X = \text{H}$ y NH_2) se eligieron longitudes de onda donde la mitoxatrona presenta máximos de absorción y, en cambio, las matrices porosas no presentan bandas de absorción ($720, 1211$ y 1462 cm^{-1} para $X = \text{H}$; y 983 y 1214 cm^{-1} para $X = \text{NH}_2$). Los cálculos se realizaron para varias λ y se hizo la media de todas ellas.

DETALLES EXPERIMENTALES



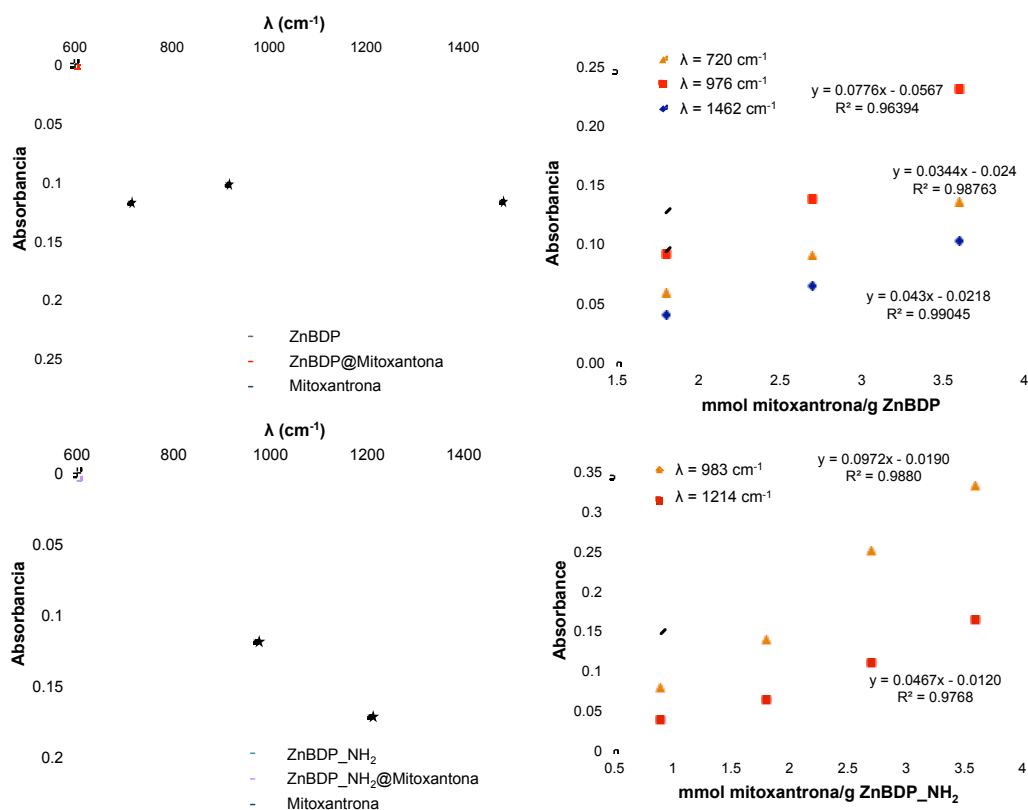


Figura A.3. Izquierda: representación de los datos de ATR para los compuestos **ZnBDP**, **ZnBDP@RAPTA-C**, **ZnBDP@Mitoxantrona**, **ZnBDP_NO₂**, **ZnBDP_NO₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂**, **ZnBDP_NH₂@RAPTA-C**, **ZnBDP_NH₂@Mitoxantrona**, **ZnBDP_OH** y **ZnBDP_OH@RAPTA-C**, mitoxantrona y RAPTA-C. Derecha: ajuste lineal de la relación entre la Absorbancia de la muestra y los mmol RAPTA-C/g de **ZnBDP_X** o mmol mitoxantrona/g **ZnBDP_X** (X = H, NO₂, NH₂, OH).

Reflectancia difusa:

DR para **ZnBDP_X@Mitoxantrona** (X = H y NH₂). Se molturaron manualmente diferentes cantidades de **ZnBDP**:mitoxantrona (1:0.5; 1:0.6; 1:0.7; 1:0.8; 1:0.9; 1:1) y **ZnBDP_NH₂**:mitoxantrona (1:0.1; 1:0.2; 1:0.3; 1:0.4; 1:0.5) durante 20 minutos. A continuación, se registraron los espectros de reflectancia difusa para todas las mezclas y para **ZnBDP_X**, mitoxantrona y **ZnBDP_X@Mitoxantrona** (X = H y NH₂) (Figura A.4).

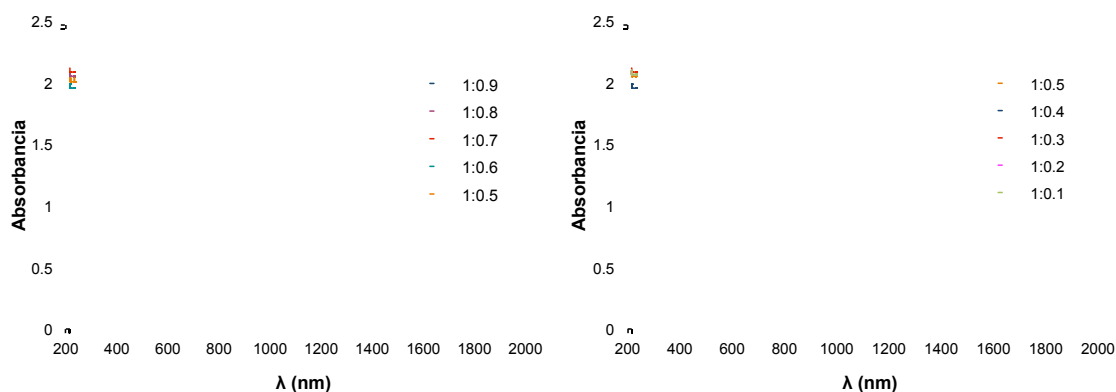


Figura A.4. Espectros de reflectancia difusa para los mezclas **ZnBDP**:mitoxantrona (1:0.5; 1:0.6; 1:0.7; 1:0.8; 1:0.9; 1:1; izquierda) y **ZnBDP-NH₂**:mitoxantrona (1:0.1; 1:0.2; 1:0.3, 1:0.4; 1:0.5; derecha).

*Incorporación de NO en las redes metalorgánicas **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C**.*

Medida de la isoterma de adsorción-desorción de NO en **CPO-27-Ni**.

Las isotermas de adsorción/desorción para las matrices **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C** se midieron utilizando un sistema de adsorción gravimétrico. La microbalanza, térmicamente estabilizada para evitar efectos externos, tenía una sensibilidad de 0.1 μg y una reproducibilidad del 0.01% de la carga. La presión del sistema de adsorción se monitorizó mediante dos medidores activos BOC Edwards con un rango de 10^{-8} a 10^{-2} y 10^{-4} a 10^3 mbar, respectivamente. 25 mg de muestra se sometieron inicialmente a vacío dinámico (10^{-4} mbar) durante toda la noche antes de desgasificarse a 423 K, hasta que no se observó una variación de peso. Posteriormente, se dejó enfriar hasta los 298 K, temperatura que se mantenía constante mediante un baño de agua circulante, con una precisión de 0.02 K. La temperatura del contrapeso se mantuvo a la misma temperatura que la muestra con el fin de minimizar la influencia de la diferencia de temperaturas en las lecturas de peso. La temperatura de la muestra se monitorizó utilizando un termopar tipo K localizado cerca del portamuestras (< 5mm). La variación de la temperatura de la muestra es mínima (< 0.1 K) a lo largo de todo el experimento. El gas NO se introdujo en el sistema de adsorción hasta alcanzar la presión deseada, y el incremento en la masa del sistema se midió en función del tiempo hasta que se

alcanzó el equilibrio de adsorción. De esta forma, la isoterma de adsorción se midió introduciendo NO (Air Liquid, 99.5%) con incrementos graduales de presión, apuntando la masa alcanzada cada vez que se introducía NO y que se alcanzaba el equilibrio a cada presión. La desorción del NO en las muestras se realizó gradualmente disminuyendo la presión del sistema hasta 10^{-2} mbar.

Carga de NO en **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C** (**CPO-27-Ni@NO** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO**).

Las matrices porosas **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C** (20 mg) se activaron a 423 K a vacío (10^{-4} mbar) durante toda la noche. Posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente y se expusieron a una atmosfera de NO (Air Liquid, 2 bar) durante 1 h. A continuación, el Schlenk donde se encontraban las muestras se evacuó y se expuso a argón seco. Este último proceso se repitió 3 veces con el fin de asegurar la eliminación completa del exceso de NO.

Estudios de liberación de moléculas activas.

Liberación de RAPTA-C.

Preparación del Fluido Corporal Simulado (FCS).

El fluido corporal simulado es una disolución acuosa exactamente con la misma concentración de iones libres que el plasma sanguíneo humano, por lo tanto, es útil para estudios de liberación de fármacos puesto que simularía las condiciones reales en las que tendría lugar el proceso de liberación en el organismo. Algunas recetas descritas en bibliografía para preparar fluido corporal simulado presentan problemas de precipitación prematura de sus componentes.⁵ Por ese motivo, en esta Tesis Doctoral, se ha utilizado un fluido corporal simulado que requiere la preparación de dos disoluciones acuosas A y B (Tabla A.1), que se mezclan equitativamente justo antes del ensayo. La composición de cada una de las disoluciones se muestra en la tabla. Además, de los reactivos indicados, cada una de ellas contiene 0.850 mL/L de HCl (1 M) para conseguir un pH de 7.40.⁶

	Sol. A (g/L)	Sol. B (g/L)
NaCl	6.213	6.213
NaHCO ₃	5.948	
KCl	0.450	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O		0,498
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.462	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.622	
CaCl ₂		0.584
Na ₂ SO ₄	0.144	

Tabla A.1. Tabla de la composición de las disoluciones A y B para la preparación del fluido corporal simulado.

Proceso de liberación de RAPTA-C.

El proceso de liberación de la metalodroga se estudió suspendiendo el MOF cargado en fluido corporal simulado (FCS) (10 mg de **1@RAPTA-C** en 20 mL de FCS, 20 mg de **CPO-27-Ni@RAPTA-C** o **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO** en 20 mL de FCS, 30 mg de **MIL-100(Fe)@RAPTA-C** en 40 mL de FCS y 20 mg de **ZnBDP_X@RAPTA-C** (X = H, NO₂, NH₂ y OH) en 40 ml de FCS) a temperatura corporal (310 K) con agitación. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 2 mL a tiempos fijos (10, 20, 30, 45, 60 min, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 h), se filtraron utilizando tubos de centrifuga con filtros 30 KDa PES, a 8000 rpm durante 2 minutos, y se midió la concentración de RAPTA-C liberado mediante espectroscopía UV-visible ($\lambda = 323$ nm) utilizando fluido corporal simulado como blanco. Después de la medida, se volvió a añadir a la disolución madre tanto el soluto filtrado como las alícuotas, de forma que la medida siempre se realizara a volumen constante. De esta forma, se mide el porcentaje de RAPTA-C liberado en función del tiempo a un volumen constante de fluido corporal simulado.

Por otro lado, se estudió la reversibilidad del proceso de adsorción cuantificando la máxima cantidad de RAPTA-C liberado después de que se haya alcanzado el equilibrio. En este caso, se preparó una suspensión del MOF cargado con el metalofármaco y se suspendió en FCS (10 mg de

1@RAPTA-C en 20 mL de FCS y 10 mg de **ZnBDP_X@RAPTA-C** (X = H, NO₂, NH₂ y OH) en 10 mL de FCS) hasta alcanzar el equilibrio de desorción (90 minutos). A continuación, se añadieron volúmenes conocidos de fluido corporal simulado ($V_T = 20, 30, 50, 75, 100, 150$ y 200 mL) y a los 90 minutos se tomó una alícuota de 2 mL. Estas alícuotas se filtraron y se midió la concentración de RAPTA-C liberado en la disolución mediante espectroscopía UV-visible ($\lambda = 323$ nm). Este proceso se repitió hasta alcanzar un volumen de fluido corporal simulado total de 200 mL.

Liberación de NO.

Estudio de la cinética de desorción de NO mediante quimioluminiscencia.

Con el fin de medir la cinética de liberación de NO de las matrices **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO**, el analizador de NO por quimioluminiscencia (NOA 280i) se calibró haciendo pasar aire a través de los filtros cero (Sievers, < 1ppb NO) y 89.7 ppm de NO (Air Products, calibrado con nitrógeno). El flujo se mantuvo a 180 mL/min con una presión de celda de 0.011 bar y una presión de oxígeno de 0.42 bares. Para iniciar el proceso de desorción del NO de las matrices **CPO-27-Ni** y **CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO**, se hizo pasar nitrógeno húmedo (humedad controlada del 11% HR) a través de las muestras a temperatura ambiente. El flujo diluido se introdujo en el analizador y se registró la concentración de NO en función del tiempo.

A.7 Caracterización biofísica de Ru_mito y actividad citotóxica de Ru_mito y H₂BDP_X (X = H, NO₂, NH₂ y OH).

Estudios de la interacción del Ru_mito con ADN.

En primer lugar, se preparó la disolución de *ct*-ADN en agua y se mantuvo en el congelador hasta su uso. La concentración de *ct*-ADN (moles de bases por litro) se determinó mediante UV-vis utilizando el coeficiente de extinción molar en su máximo de absorción (*ct*-ADN $\lambda_{258} = 6600 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). El espectro de

UV-vis se registró en un ThermoSpectronic UV300 utilizando 2 mL de *ct*-ADN (170 μ M) en NaCl (20 mM) y un buffer de cacodilato de sodio (1 mM).

Dicroísmo circular (CD).

Los espectros se registraron utilizando un espectropolarímetro Jasco J-715. Las disoluciones previamente preparadas (*ct*-ADN (170 μ M) en NaCl (20 mM) y un tampón de cacodilato de sodio (1 mM)) se utilizaron para registrar los espectros de CD con concentraciones crecientes de **Ru_mito** y mitoxantrona, manteniendo constante la concentración de *ct*-ADN (proporciones de mezcla de *ct*-ADN/compuesto en un rango de 200:1 a 3:1).

Fluorescencia.

El desplazamiento del bromuro de etidio (EB) intercalado en el ADN por el **Ru_mito** y la mitoxantrona, se evaluó midiendo la extinción de la señal fluorescente del EB (*ct*-ADN/EB 4:5, 4 μ M:5 μ M). El espectro de emisión se midió en función de la concentración de **Ru_mito** y mitoxantrona utilizando un espectrómetro de luminiscencia Variant mod. Cary Elipse. La concentración del compuesto a estudiar se fue aumentando lentamente utilizando proporciones *ct*-ADN/compuesto desde 200:1 hasta 1:1 manteniendo la concentración de *ct*-ADN y EB constantes. Parámetros de los espectros de fluorescencia: $\lambda = 600$ nm, $\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm, $\text{abertura}_{\text{em}} = 15.0$ nm, $\text{abertura}_{\text{ex}} = 10.0$ nm.

Ensayos de inhibición de actividad enzimática de catepsinas.

Se estudió la capacidad de **Ru_mito** y la mitoxantrona libre para inhibir la actividad enzimática de la catepsina B y D.

Ensayo con catepsina B. El ensayo colorimétrico se realizó utilizando una disolución 20 mM de acetato de sodio y 1 mM de EDTA (con un pH ajustado a 5.1 con HCl 1 M), utilizando como sustrato Na-CBZ-L-lisina éster *p*-nitrofenilo (CBZ = N-carbobenzóxido). Para que la enzima sea catalíticamente funcional, los centros activos de cisteína necesitan estar en la forma reducida. Por lo

tanto, en primer lugar, la catepsina B se redujo con ditioneitol (DTT) con el fin de cerciorarse de que la mayoría de la enzima está en la forma catalíticamente activa. Por lo tanto, la catepsina B se activó, antes de su disolución, en presencia de un exceso de DTT (1.2 eq.) durante 1 hora a 303 K. Las medidas de IC₅₀ se realizaron por triplicado utilizando una concentración fija de enzima de 200 nM y una concentración fija de sustrato 100 µM. La enzima y el inhibidor se mezclaron e incubaron a 303 K durante 24 h antes de añadir el sustrato. La actividad se midió durante 4 min a 326 nm. Para los ensayos se utilizaron concentraciones de los inhibidores (**Ru_mito** o mitoxantrona libre) entre 0.3 y 50 µM.

Ensayo con catepsina D. El ensayo enzimático con catepsina D se realizó utilizando un Kit de Sigma Aldrich basado en un tampón (A3855) con una disolución de albúmina (2.5%, A3980), utilizando una sal de trifluoroacetato de MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂ (1 mM, C4492). La concentración final de la mezcla fue: catepsina D ≈ 5 nM, sustrato 20 µM, **Ru_mito** = 20 µM, mitoxantrona = 200 µM. La capacidad de **Ru_mito** (20 µM) para inhibir la actividad enzimática de la catepsina D se confirmó construyendo una curva de fluorescencia donde se representaba la hidrólisis del sustrato frente al tiempo. En este caso, se observaba la reducción de la pendiente con el tiempo. Sin embargo, para la mitoxantrona (200 µM), la misma curva presentaba un aumento progresivo de la hidrólisis del sustrato, como resultado del aumento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo.

Estudios de actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerígenas.

Citotoxicidad de **Ru_mito** y mitoxantrona.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en la Unidad de Evaluación de la Actividad Farmacológica del Instituto de Farmacia Industrial de la Facultad de Farmacia (Universidad de Santiago de Compostela). Las líneas celulares A2780 y A2780cisR se incubaron en el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y L-Glutamina 2 mM. La línea celular LLC-PK1, se incubó en el medio de cultivo Medium 199

suplementado con un 3% de FBS y 1.5 g/L de hidrogenocarbonato de sodio. La línea celular HL-60 se cultivó en el medio RPMI 1640 suplementado con un 20% de FBS y 2 mM de L-Glutamina. La línea celular MCF-7 se cultivó en el medio de crecimiento EMEM con 2 mM de L-Glutamina y Earle's BSS ajustado con 1.5 g/L de hidrogenocarbonato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio y suplementado con un 10% de FBS. Todas las líneas celulares se cultivaron en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ a 310 K. La muerte celular se midió utilizando un sistema basado en el compuesto MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio], que se reduce en presencia de células vivas para dar lugar a un producto soluble (formazan) que puede detectarse por colorimetría. Las células se sembraron en placas estériles con 96 pocillos, con una densidad de 4000 células/pocillo en 100 µL de medio y se incubaron durante 24 h. Los compuestos **Ru_mito** y mitoxantrona se disolvieron en DMSO y se añadieron para obtener una concentración final desde 0 a $1.1 \cdot 10^{-4}$ M, en un volumen total de 100 µL/pocillo. La concentración final de DMSO en el cultivo celular se mantuvo en todos los casos al 1%. 24 h después, 10 µL de una dilución de MTT recién preparada (2.5 mg/mL) se añadió en cada pocillo y se incubó la placa a 310 K en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Tras 5 h, el medio se eliminó y el producto formazan obtenido se disolvió en 100 µL de DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 595 nm. Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de las curvas obtenidas representando la supervivencia celular (%) frente a la concentración de fármaco (µM). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Citotoxicidad de los ligandos H₂BDP_X (X = H, NO₂, NH₂ y OH).

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela. La línea celular J774 se incubó en el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamax® y 1% de una solución antibiótica antimicótica. La línea celular se cultivó en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ a 310 K. La muerte celular se midió utilizando un sistema basado en el compuesto MTT

[bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio], que se reduce en presencia de células vivas para dar lugar a un producto soluble (formazan) que puede detectarse por colorimetría. Las células se sembraron en placas estériles con 96 pocillos, con una densidad de 10000 células/pocillo y se incubaron durante 24 h. Los ligandos H₂BDP_X se disolvieron en DMSO y se añadieron para obtener medios con diferentes concentraciones, en un volumen total de 200 µL/pocillo. La concentración final de DMSO en el cultivo celular se mantuvo en todos los casos en 0.5%. 24 h después, una dilución de MTT recién preparada (0.5 mg/mL) se añadió en cada pocillo y se incubó la placa a 310 K en una atmosfera húmeda con un 5% de CO₂. Tras 2 h, el medio se eliminó y el producto formazan obtenido se disolvió en 200 µL de DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 540 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

A.6 Resultados adicionales.

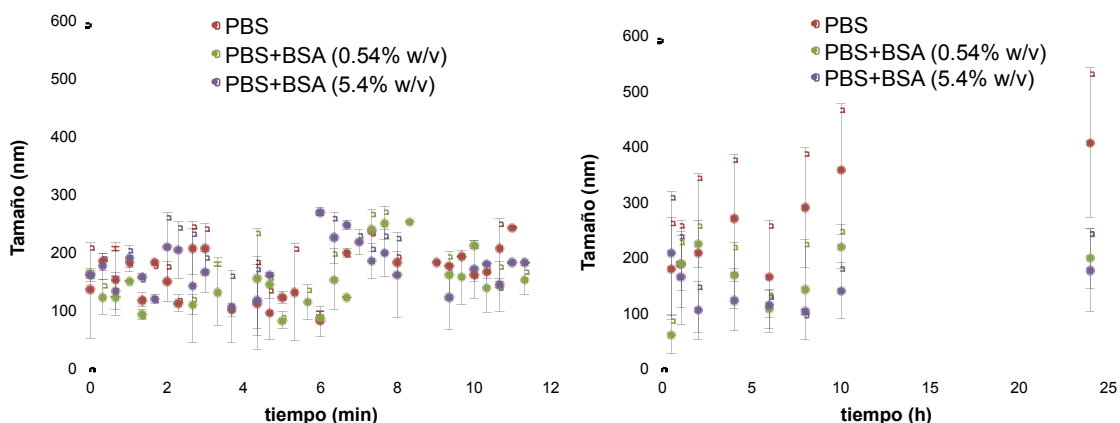


Figura A.5. Cinética de agregación de las nanopartículas de ZnBDP_OH a corto plazo (10 min) (izquierda) y durante un período de tiempo largo (24 h) (derecha) a 310 K en PBS, PBS+BSA (0.54% p/v) y PBS+BSA (5.4% p/v).

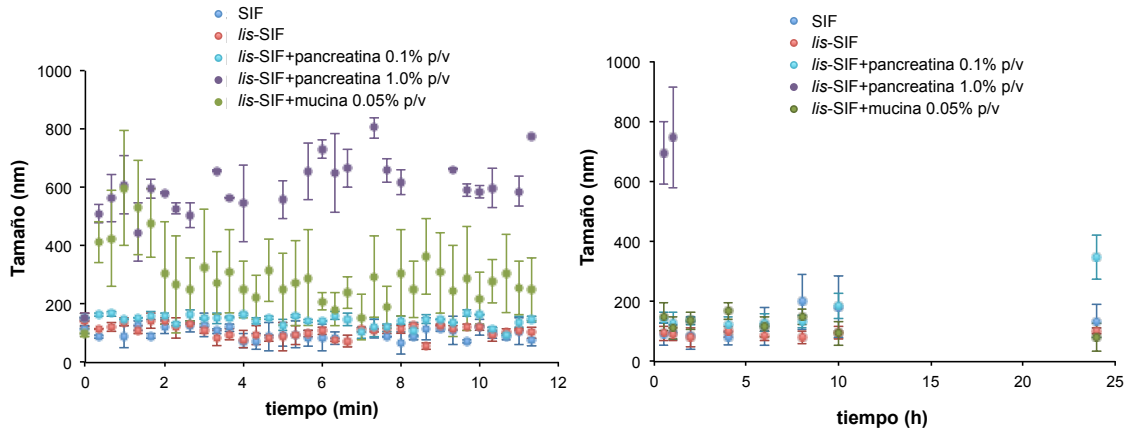


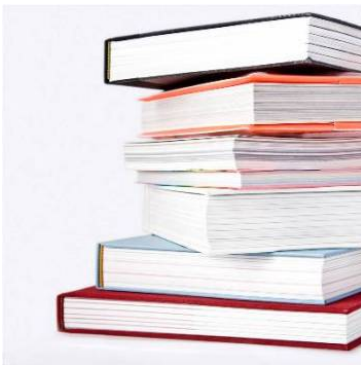
Figura A.6. Cinética de agregación de las nanopartículas de **ZnBDP_OH** a tiempos cortos (10 min, izquierda) y durante un período largo (24 h, derecha) a 310 K en **SIF** , **lis-SIF** (**SIF diluido 1/25**) , **lis-SIF+pancreatina 0.1% p/v** , **lis-SIF+pancreatina 1.0% p/v** y **lis-SIF+mucina 0.05% p/v**.

A.6 Referencias bibliográficas.

- ¹ Arnold Z., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1985**, 30, 2783.
- ² Seo Y. -K., Yoon J. W., Lee J. S., Lee U. -H., Hwang Y. K., Jun C. -H., Horcajada P., Serre C., Chang J. -S., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2012**, 157, 137-145.
- ³ (a) Bennett M. A., Smith A. K., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1974**, 233; (b) Bennett M. A., Huang T. N., Mathewson T. W., Smith A. K., *Inorg. Synth.*, **1981**, 21, 74; (c) Allardyce C. S., Dyson P. J., Ellis D. J., Heath S. L., *Chem. Commun.*, **2001**, 1396.
- ⁴ *European Pharmacopeia 7.0*, **2010**.
- ⁵ Kokubo T., Takadam H., *Biomaterials*, **2006**, 27, 2907.
- ⁶ Bohner M., Lemaitre J., *Biomaterials*, **2009**, 30, 2175.

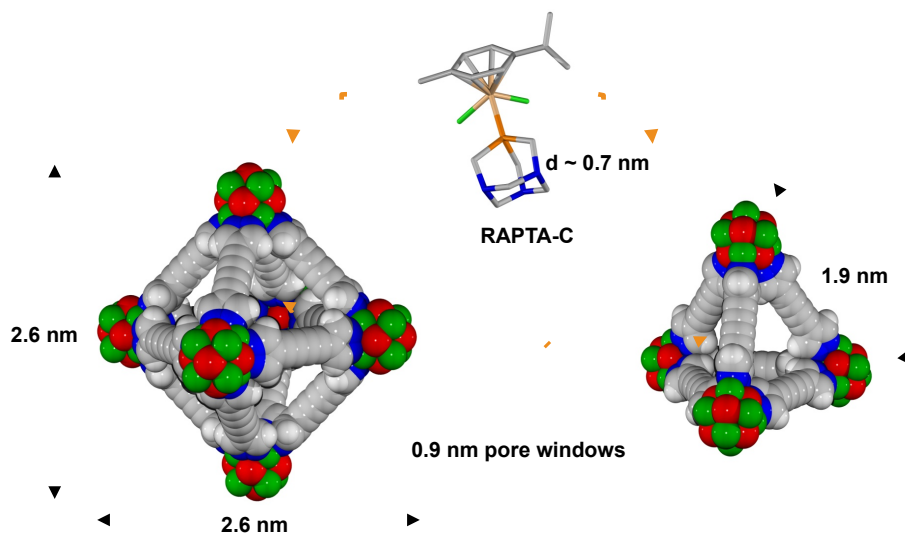
Anexo B

Lista de publicaciones
relacionadas con
esta Tesis Doctoral



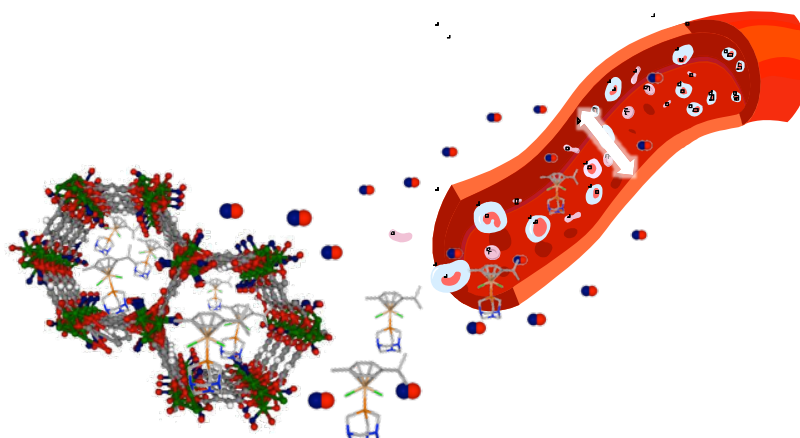
A Robust MOF for the delivery of the non conventional half-sandwich ruthenium(II) metallodrug RAPTA-C

E. Quartapelle Procopio, S. Rojas, N. M. Padial, S. Galli, N. Masciocchi, F. Linares, D. Miguel, J. E. Oltra, J. A. R. Navarro, E. Barea, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 11751-11753.



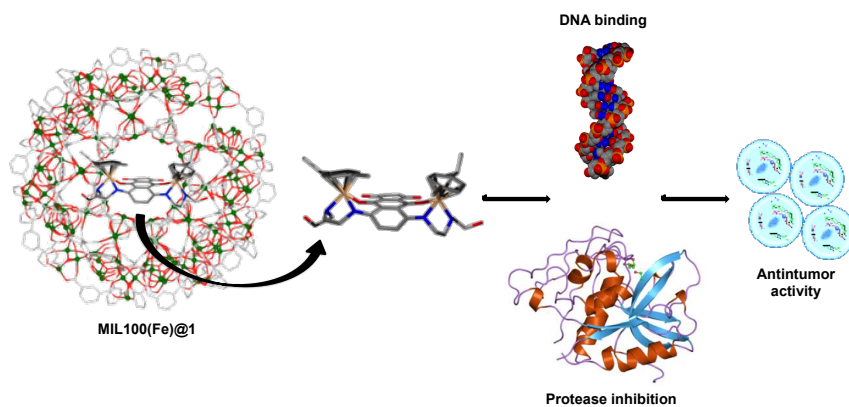
Metal-organic frameworks as potential multi-carriers of drugs

S. Rojas, P. S. Wheatley, E. Quartapelle-Procopio, B. Gil, B. Marszalek, R. E. Morris, E. Barea, *Cryst. Eng. Comm.*, **2013**, 15, 9364.



Biophysical characterisation, antitumor activity and MOF encapsulation of a half-sandwich ruthenium(II) mitoxantronato system

S. Rojas, E. Quartapelle-Procopio, F. J. Carmona, M. A. Romero, J. A. R. Navarro, E. Barea, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 2473.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11751–11753

www.rsc.org/chemcomm

COMMUNICATION

Study of the incorporation and release of the non-conventional half-sandwich ruthenium(II) metallodrug RAPTA-C on a robust MOF†Elsa Quartapelle Procopio,^a Sara Rojas,^a Natalia M. Padial,^b Simona Galli,^c
Norberto Masciocchi,^c Fátima Linares,^a Delia Miguel,^b J. Enrique Oltra,^b
Jorge A. R. Navarro*^a and Elisa Barea*^a

Received 27th July 2011, Accepted 13th September 2011

DOI: 10.1039/c1cc14594k

The highly porous and robust $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diyne-1,4-diyl})\text{bispyrazolato})_6]_n$ MOF can be used as a proof of concept for the incorporation and release of the non-conventional $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ RAPTA-C metallodrug.

In the last few years, the interest in the outperforming adsorptive properties of Metal–Organic Frameworks (MOFs) has been extended from an initial focus on gas storage and purification to the controlled release of bioactive molecules.¹ Depending on pore nature and size, the bioactive species to be delivered can range from small gaseous molecules (*e.g.* NO, CO) coordinated to the open metal sites,² to small organic drugs (ibuprofen,³ doxorubicin)^{4,5} physisorbed in the pore structure, or even to metalloligand pro-drugs used as linkers within the MOF itself.⁶

One of the current major social concerns is to find effective treatments to cure cancer. It is well known that the use of Pt(II)-based cytotoxic metallodrugs is one of the most widespread treatments against cancer.⁷ However, the adverse side effects and the development of resistance are related to the unspecific interactions of Pt(II) metallodrugs with biomolecules, in particular with the desired biological target, DNA.

Consequently, there is much interest in finding new metallodrugs with a different mechanism of action. A number of half-sandwich type organometallic compounds of Ru, Rh, Ir and Os have emerged as alternative anti-tumour and anti-metastatic metallodrugs, exhibiting a different mechanism of action that may lead to fewer adverse side effects. Indeed, it seems that the primary activity of these species does not involve DNA but the inhibition of the exacerbated metabolism of many cancer cell types (*i.e.* inhibition of over-expressed

enzymes like cathepsins),⁸ or the interference with physiological redox processes.⁹ In this sense, a notable example is the non-conventional metallodrug $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (pta = 1,3,5-triaza-7-phospha-adamantane), termed “RAPTA-C” (Fig. 1), which is proved to inhibit lung metastases in mice.¹⁰ Accordingly, it would be highly beneficial for patients to find methods for the controlled delivery of these novel metallodrugs.

In this communication, we present the synthesis and full characterisation of the highly porous and robust $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-OH}_2)_2(\mu_4\text{-}4,4'-(\text{buta-1,3-diyne-1,4-diyl})\text{bispyrazolato})_6]_n$ (**1**) MOF containing a new bispyrazolate type organic linker. Worthy of note, **1** shows a remarkable thermal and chemical stability, even in simulated body fluid (SBF).¹¹ Moreover, we have studied the incorporation and release of RAPTA-C in **1** as a proof of concept of the utility of MOFs for the delivery of this type of non-conventional metallodrugs.

The key step of the synthesis of the novel organic linker adopted in this study was a Pd/Cu-catalyzed homocoupling reaction on the boc-protected 4-ethynyl-pyrazole precursor to achieve the symmetric rod-like species 1,1'-di-Boc-4,4'-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazole (Fig. 1). The posterior reaction of this system with $\text{Ni}(\text{AcO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in boiling aqueous DMF gave rise to the deprotection of the pyrazolate donor groups,

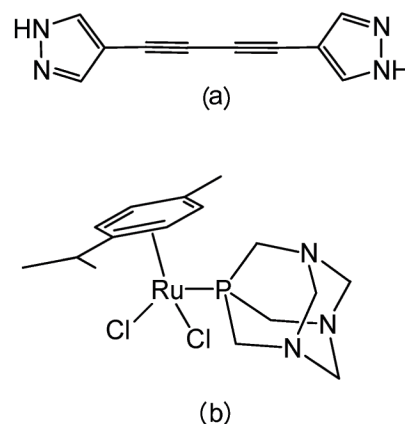


Fig. 1 (a) The 4,4'-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazole linker used in this study; (b) the anti-tumour metallodrug $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (pta = 1,3,5-triaza-7-phospha-adamantane), RAPTA-C, used in the drug delivery process.

^a Universidad de Granada, Departamento de Química Inorganica, 18071 Granada, Spain. E-mail: ebaream@ugr.es; jarn@ugr.es; Fax: +34 958 248526; Tel: +34 958 248093

^b Universidad de Granada, Departamento de Química Organica, 18071 Granada, Spain

^c Dipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali, Università dell'Insubria, 22100 Como, Italy

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental methods, thermal analysis, chemical stability tests, mechanical stress tests, crystallographic data. CCDC 829304. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c1cc14594k

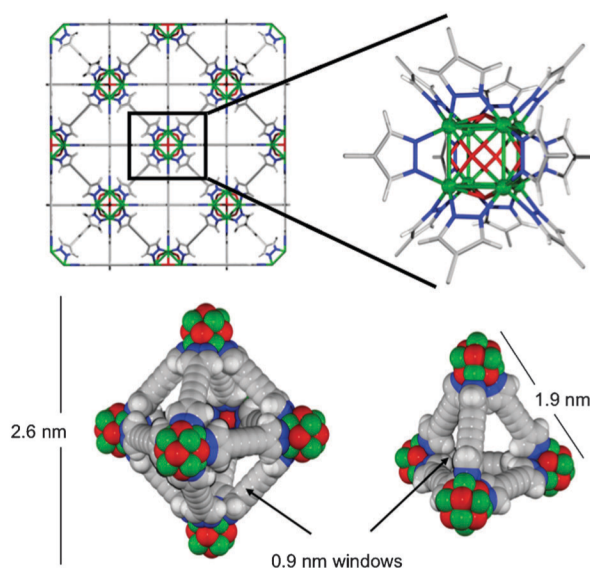


Fig. 2 View of the crystal structure of $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-OH})_2(\mu_4\text{-}4,4'\text{-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazolato})_6]_n$ (**1**) along the [100] direction and the magnified view of the 12-connecting $\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-OH})_2$ nodes (above); view of the octahedral and tetrahedral voids found in the crystal structure of **1** (below). Ni: green, O: red, N: blue, C: grey, H: light grey.

yielding a light green microcrystalline material of $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH})_2(4,4'\text{-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazolato})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 13\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ (**1**· H_2O ·DMF) formulation.

An XRPD structural analysis demonstrated that **1**· H_2O ·DMF is isomorphous to the $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-OH})_2(\mu_4\text{-L})_6]_n \cdot n\text{Solv}$ systems previously reported by us.¹² Accordingly, the structure of **1**· H_2O ·DMF is based on $\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH})_2$ cubic clusters connected to 12 adjacent ones by linear *exo*-tetradentate *N,N,N',N'* 4,4'-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazolato linkers. Noteworthy, this topology, reminiscent of the cubic close packing structure found in many elemental solids, features octahedral and tetrahedral voids of about 1.6 nm and 1.0 nm inner size¹³ respectively (Fig. 2). As a consequence of the large voids and the low steric demand of the diyne residues in the organic linker, the calculated accessible pore volume in the structure is very high, reaching 71% of the total crystal volume.

The thermogravimetric analysis carried out in air on **1**· H_2O ·DMF and on the CH_2Cl_2 exchanged material **1**· CH_2Cl_2 (Fig. S2, ESI†) shows that, upon removal of the guest solvent molecules, the evacuated structure remains stable up to 340 °C, the temperature after which it undergoes a rapid decomposition. Moreover, **1** also shows a high mechanical stability, its crystallinity and porosity remaining almost unaffected when pressed up to 2 Mg cm⁻² (Fig. S4, ESI†).

N_2 adsorption experiments carried out on **1** at 77 K are indicative of a highly porous structure exhibiting a type I isotherm typical of crystalline microporous materials (Fig. 3). The BET surface area of 1920 m² g⁻¹ is remarkably high, as it is the adsorption capacity, which reaches the value of 26 mmol g⁻¹ at $p/p_0 = 0.3$.

Noteworthy, **1** also possesses a remarkably high chemical stability, which is exemplified by the fact that its XRPD remains unaltered up to 24 h in boiling water and in common organic solvents, in basic (NaOH 0.05 M, pH 12.80) and acidic

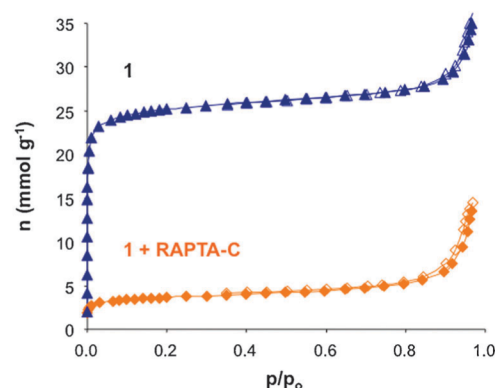


Fig. 3 N_2 (77 K) adsorption isotherms for activated $[\text{Ni}_8(\mu_4\text{-OH})_4(\mu_4\text{-OH})_2(\mu_4\text{-}4,4'\text{-(buta-1,3-diyne-1,4-diyl)bispyrazolato})_6]_n$ (**1**) (blue triangles) and the RAPTA-C loaded **1**-RAPTA-C product (orange diamonds). Empty symbols denote desorption.

(HCl 0.01 M, pH 2.30) aqueous solutions, as well as in simulated body fluid (SBF) at 37 °C (pH 8.05) for 7 days (Fig. S3, ESI†). The robustness of this material in SBF is proved by means of atomic absorption (AA) measurements, indicating very low Ni leaching. Indeed, suspensions of **1** in SBF at 37 °C (20 mg of **1** in 40 mL of SBF) give rise to 0.7 ppm of Ni concentration levels, which indicate that only 0.43% of the MOF material has been degraded. This value corresponds to the liberation of 70 μg of Ni per 100 mL of SBF with suspended **1**. It should be noted that this amount is neatly below the daily average uptake of 170 μg of Ni in food.¹⁴

The stability of **1** under simulated biological conditions, the pore size and non-charged nature of the framework prompted us to explore the possible incorporation and posterior release of the non-conventional RAPTA-C metallodrug (estimated diameter of 0.9 nm)¹⁵ in its porous structure. Indeed, impregnation of **1** with an aqueous solution of RAPTA-C (0.025 M) leads to the rapid incorporation of this metallodrug, the equilibrium being reached after 4 h. The dramatic decrease in N_2 uptake capacity after RAPTA-C loading (Fig. 3) with maintenance of the structural integrity as evidenced by XRPD can be taken as a proof of the occupancy of the cavities by the drug (see ESI†).

After this initial proof of RAPTA-C incorporation, we have studied more in detail the solid-liquid adsorption process at 298 K. The results show a type I adsorption isotherm (Fig. 4), whose data-points have been satisfactorily fitted to the linear form of the Langmuir model (eqn (1)):

$$C/n = C/n_m + 1/(Kn_m) \quad (1)$$

where C is the concentration of RAPTA-C in the aqueous solution (M) at the equilibrium, n is the amount of RAPTA-C incorporated in **1** (mmol g⁻¹), K is the Langmuir equilibrium constant and n_m corresponds to the predicted saturation loading of RAPTA-C in **1** (mmol g⁻¹). The results show a maximum loading n_m value of 2.4 mmol (1.1 g) of RAPTA-C per gram of **1**. Noteworthy, this high loading value corresponds to four RAPTA-C molecules per MOF formula unit. Taking into account the inner size (*ca.* 1.6 and 1.0 nm, respectively) of the octahedral and tetrahedral voids in **1**, as well as the size of the RAPTA-C molecule (0.9 nm), we can tentatively conclude that the octahedral and tetrahedral

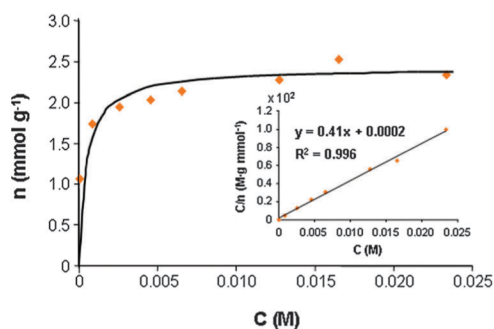


Fig. 4 Solid-liquid adsorption isotherm of an aqueous solution of RAPTA-C by **1** at 298 K. The inset shows the linear fitting of the data to the Langmuir model.

cavities, present in a 1:2 ratio, host two and one RAPTA-C molecules each, respectively, to give rise to **1**-RAPTA-C.

Finally, we have studied the desorption process of the loaded **1**-RAPTA-C into SBF at 37 °C, in order to test the use of this system as a model for drug delivery purposes. The results show that the equilibrium of RAPTA-C release from **1**-RAPTA-C is reached after 5 hours.¹⁶ The desorption data can be satisfactorily fitted with a first order kinetic model according to eqn (2):

$$q_E - q_t = q_E e^{-kt} \quad (2)$$

where q_E and q_t are the amounts of RAPTA-C released *per* gram of MOF (mmol g^{-1}) at the equilibrium and at the time t (h), respectively, and k is the first order kinetic constant (h^{-1}). The fitting of the data gives rise to a k value of 1.63 h^{-1} which corresponds to a $t_{1/2}$ for the release of the metallodrug, of 25 min (Fig. 5). This is indicative of the physisorption of the metallodrug in **1**, ruling out its chemical binding, through ligand exchange reactions, to the extended π -system of diynes provided by the MOF itself. The reversibility of the adsorption process can be further stated by quantifying the amount of released drug after the equilibrium is reached (desorption branch of solid-liquid isotherm at 37 °C). The results show that, when 10 mg of **1**-RAPTA-C are suspended in 20 mL of SBF, 20% of the hosted metallodrug is released leading to a 0.1 mM RAPTA-C solution. Noteworthy, the released amount at the equilibrium increases to 70% when the SBF volume is enlarged to 200 mL, which corresponds to a 0.004 mM RAPTA-C solution.

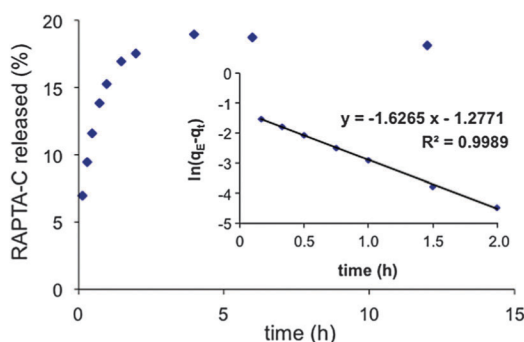


Fig. 5 Desorption process of RAPTA-C from **1**-RAPTA-C (10 mg) into a simulated body fluid (20 mL) at 37 °C. The inset shows the fitting of the data to a first order kinetic model.

In conclusion, we have obtained a novel highly porous MOF with a remarkably high thermal, mechanical and chemical stability. These features make it a model for drug delivery purposes *via* oral administration or transdermal patches, as demonstrated by the loading of a significant quantity of the unconventional metallodrug RAPTA-C, namely 1.1 g of drug *per* gram of MOF. Noteworthy, the adsorption process is reversible as a consequence of physisorption, RAPTA-C being easily released into simulated body fluid. All these features concur in making **1** an outstanding proof of concept for the suitability of MOFs as releasing systems for this type of non-conventional metallodrugs. Work can be anticipated in extending these intriguing results to novel MOFs based on metal ions with lower toxicity.

The authors are grateful for the generous support by the Spanish MCINN (project: CTQ2008-00037/PPQ and E. Q.-P. FPI fellowship) and Junta de Andalucía (projects: P07-FQM-3213, P09-FQM-4981 and S. R. predoctoral fellowship).

Notes and references

- 1 A. C. McKinlay, R. E. Morris, P. Horcajada, G. Férey, R. Gref, P. Couvreur and C. Serre, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6260; S. R. Miller, D. Heurtaux, T. Baati, P. Horcajada, J.-M. Grenèche and C. Serre, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 4526.
- 2 R. E. Morris and P. S. Wheatley, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 4966.
- 3 P. Horcajada, C. Serre, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle and G. Férey, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 5974; P. Horcajada, C. Serre, G. Maurin, N. A. Ramsahye, F. Balas, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle and G. Férey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6774.
- 4 P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 172.
- 5 I. Imaz, M. Rubio-Martínez, M. Peruzzini and P. J. Dyson, *García, D. Ruiz-Molina, J. Hernando, V. Puentes and D. Maspoch, Chem. Commun.*, 2010, **46**, 4737.
- 6 W. J. Rieter, K. M. Pott, K. M. L. Taylor and W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11584.
- 7 *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anti-Cancer Drug*, ed. B. Lippert, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- 8 A. Casini, F. Edafe, M. Erlandsson, L. Gonsalvi, A. Ciancetta, N. Re, A. Ienco, L. Messori, M. Peruzzini and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 5556; H. Amouri, J. Moussa, A. K. Renfrew, P. J. Dyson, M. N. Rager and L.-M. Chamoreau, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 7530.
- 9 Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemarian, A. F. A. Peacock and P. J. Sadler, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, **11**, 483.
- 10 C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161.
- 11 T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka and T. Yamamuro, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1992, **3**, 79.
- 12 N. Masciocchi, S. Galli, V. Colombo, A. Maspero, G. Palmisano, B. Seyyedi, C. Lamberti and S. Bordiga, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 7902.
- 13 The inner size of the cavity has been estimated as twice the distance between the centre of the cavity and the nearest atom, A, decorating its walls. The proper correction for the vdW radius of A has been applied.
- 14 Toxicological Profile for Nickel, August 1995, Draft Update, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, United States Public Health Service.
- 15 The size of RAPTA-C has been estimated as the diameter of the equivalent sphere occupying the same volume occupied by a CCDC-derived model of the metallodrug, as calculated by SMILE (D. Eufri and A. Sironi, *J. Mol. Graphics*, 1989, **7**, 165).
- 16 10 mg of **1**-RAPTA-C were suspended in 20 mL of SBF and the resulting suspension incubated at 37 °C with stirring. Aliquots of the supernatant solution were studied by means of UV-vis at different periods of time in order to determine the amount of released RAPTA-C.

COMMUNICATION

Metal–organic frameworks as potential multi-carriers of drugs†

Cite this: *CrystEngComm*, 2013, 15, 9364

Sara Rojas,^a Paul S. Wheatley,^b Elsa Quartapelle-Procopio,^a Barbara Gil,^c Bartosz Marszalek,^c Russell E. Morris^{*b} and Elisa Barea^{*a}

Received 1st July 2013,
Accepted 3rd September 2013

DOI: 10.1039/c3ce41289j

www.rsc.org/crystengcomm

The metal–organic framework CPO-27-Ni is presented as a proof-of-concept model for the incorporation and release of two non-conventional anticancer drugs: [Ru(*p*-cymene)Cl₂(pta)] (RAPTA-C) and NO.

Nowadays, one of the most important challenges in our society concerns the development of a more effective cancer treatment with reduced secondary effects. Indeed, the effectiveness of drugs in cancer therapy is mainly limited by their inadequate transport within the body and unspecific delivery to the cancer cells. Tumors have tortuous and defective vasculatures, with substantial heterogeneity, and, therefore, the net effects are both an increased flow resistance and hypoxia, which are major obstacles in cancer therapy.¹

In this regard, metal–organic frameworks (MOFs),² which are a new class of synthetic, porous materials, with exceptionally high adsorption performances, have recently been studied as selective drug carriers.³ It is noteworthy that some of these materials exhibit a dual hydrophilic/hydrophobic pore structure, as well as an unusually high concentration of exposed coordinatively unsaturated metal sites, which make them suitable as multicarrier delivering agents. In this regard, the simultaneous adsorption and delivery of a wide range of probe molecules, such as bioactive gases (*e.g.* NO and CO)⁴ or small organic drugs (*e.g.* busulfan and cidofovir),⁵ might be possible.

It has been proven that nitric oxide (NO) is an important species involved in many biological processes.⁶

Indeed, it mediates a number of vital functions, including vasodilatation⁷ and re-epithelization.⁸ The accumulation of high concentrations of nitric oxide in tumours offers the possibility to increase cancer cells' sensitivity to chemo- and radiotherapy or even to suddenly induce their apoptosis.⁹ Remarkably, recent studies described the use of NO to enhance cisplatin cytotoxicity in V79 lung fibroblast cells taking advantage from the direct sensitizing of tumour cells.¹⁰

A number of porous materials have been described as delivering agents for exogenous NO. This is the case for some zeolites¹¹ and the [M₂(C₈H₂O₆)(H₂O)₂](H₂O)₈ (CPO-27-M) coordination polymer series (M = Ni, Zn, Mg, Mn, Fe, and Co; C₈H₂O₆ = 2,5-dihydroxyterephthalic acid). Regarding the latter, the first highly crystalline member of the series based on Co²⁺ cations (CPO-27-Co) was synthesized by Dietzel and co-workers in 2005.¹² Since this initial synthesis, several analogues have been produced containing Ni²⁺,¹³ Zn²⁺,¹⁴ Mg²⁺,¹⁵ Mn²⁺¹⁶ and very recently Fe²⁺.¹⁷ Particularly, the Ni²⁺ derivative presents a high adsorption–delivery capacity for NO.¹⁸ The presence of coordinatively unsaturated metal sites (CUS) on the pore walls has a clear effect on the NO adsorption and release processes. Indeed, during the adsorption process, an adduct Ni–NO is formed which makes possible the incorporation and posterior water-triggered release of up to 7 mmol of NO per g of material. Furthermore, it has been shown that CPO-27-Ni shows a reasonable balance between stability and solubility in bovine serum after an extended period, which is a key issue in biological applications.¹⁹

Therefore, taking into account the exceptional reversibility of the NO adsorption in CPO-27-Ni and its stability in biological conditions, we have studied whether this material can act as a vehicle for multiple drugs, namely, [Ru(*p*-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) (RAPTA-C) and NO. This organometallic ruthenium(II) arene complex has been chosen as it is a non-conventional metallodrug showing significant *in vivo* antitumor activity towards lung metastases in mice.²⁰

^a Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain. E-mail: ebaream@ugr.es; Fax: +34 958 248526; Tel: +34 958 248093

^b EaStCHEM School of Chemistry, University of St Andrews, Purdie Building, St Andrews KY16 9ST, UK. E-mail: rem1@st-andrews.ac.uk; Fax: +44 (0)1334 463808; Tel: +44 (0)1334 463818

^c Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Ingardena 3, 30-060 Kraków, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available: Details of experimental procedures, chemical stability tests, elemental analysis, IR spectra and thermal analysis. See DOI: 10.1039/c3ce41289j

In addition, some of us have previously reported that the incorporation/release of RAPTA-C in the highly porous and robust $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_2(4,4'-(\text{buta-1,3-diyne-1,4-diy})\text{bispyrazolato})_6]_n$ MOF is possible.²¹ In this communication, we report on the incorporation of the non-conventional RAPTA-C metallodrug into the free porous space of CPO-27-Ni and the subsequent uptake of NO (Fig. 1). Then, the release of the loaded bioactive molecules in SBF has also been successfully achieved. The results are a proof of concept of the possibility to load and deliver multiple drugs in MOFs for the development of synergic anticancer therapies with enhanced effectiveness.

Samples of CPO-27-Ni¹³ and RAPTA-C²² were prepared as described in the literature (for experimental details, see the ESI†). Thermal activation of CPO-27-Ni at 423 K removes the water guest molecules, leaving open metal sites ready for NO adsorption. It has been proven that the activated CPO-27-Ni possesses remarkably high chemical stability, which is exemplified by its unchanged powder X-ray diffraction (XRPD) pattern upon stirring for 72 h in anhydrous methanol, tetrahydrofuran and dichloromethane (Fig. S1†). This property let us perform the incorporation of RAPTA-C into the porous matrix by suspending it in an 80% saturated solution of RAPTA-C. The loading of the drug to give CPO-27-Ni@RAPTA was preferentially achieved in CH_2Cl_2 as this solvent led to the highest uptake accounting for ~4 RAPTA-C molecules per unit cell as calculated using elemental analysis and UV-vis (see ESI†). This result is probably due to the major concentration of RAPTA-C in the impregnating solution as the solubility of RAPTA-C in the apolar CH_2Cl_2 is significantly higher than in MeOH or tetrahydrofuran. XRPD of the CPO-27-Ni@RAPTA system reveals that the crystallinity of the original porous matrix is retained (Fig. S2†), indicating that the porous matrix has not changed during the loading process. Furthermore, the actual incorporation of the Ru-metallodrug is proven by i) the dramatic reduction of the adsorption capacity of the MOF (SBET drops from $720 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for the original material to $45 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ after RAPTA-C loading) (Fig. 2a); ii) the presence of the main peaks of the pure RAPTA-C in the IR

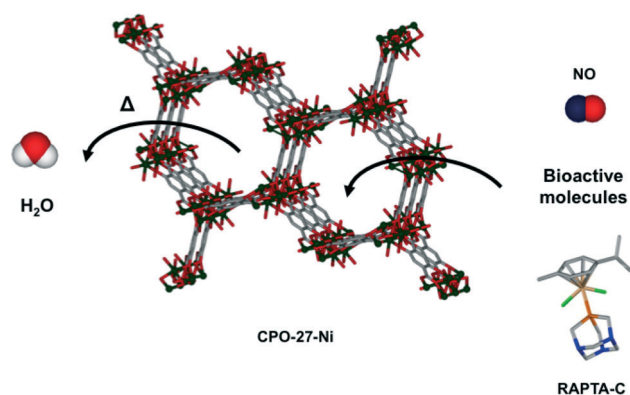


Fig. 1 Thermal activation of the CPO-27-Ni metal-organic framework to remove the solvent guest molecules and the subsequent loading with NO and RAPTA-C. Color code: H: white, C: grey, O: red, N: blue, Ni: dark green, Ru: light orange, P: orange, Cl: bright green.

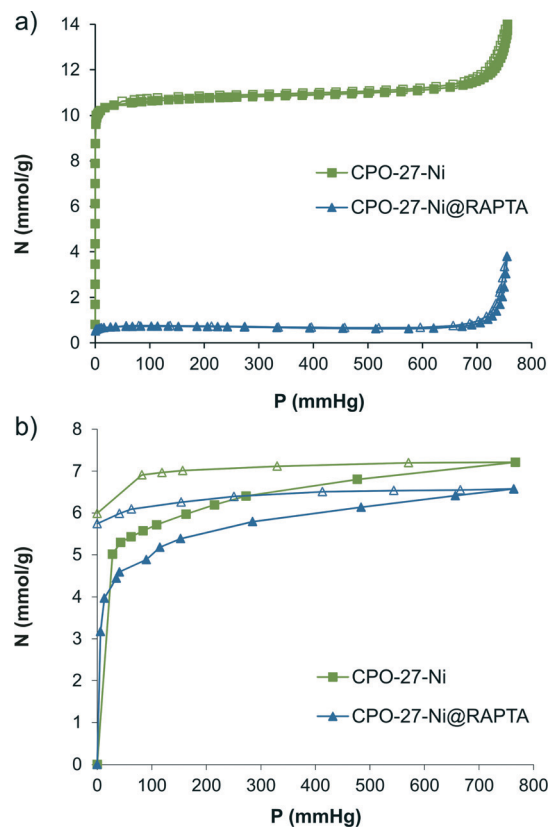


Fig. 2 a) N_2 (77 K) and b) NO (298 K) adsorption isotherms for activated CPO-27-Ni (green squares) and the loaded CPO-27-Ni@RAPTA-C derivative (blue triangles). Empty symbols denote desorption.

spectrum of CPO-27-Ni@RAPTA (Fig. S3†); and iii) the increase of the thermal stability of CPO-27-Ni@RAPTA compared to the unloaded CPO-27-Ni material, together with a less steep weight loss for the decomposition process (Fig. S4†).

Once the porous matrix was loaded with the non-conventional metallodrug RAPTA-C, gravimetric NO adsorption measurements at room temperature revealed that CPO-27-Ni@RAPTA adsorbs 6.0 mmol of NO per g of activated material (Fig. 2b). This value is very close to the one obtained for the original CPO-27-Ni (7 mmol NO per g of MOF), which means that the presence of RAPTA-C in the cavities does not hamper the access of NO to the open metal sites. The adsorbed NO accounts for ~1 NO molecule per CUS, although there will also be a small amount of weakly physisorbed NO interacting with the pore surface. Moreover, the shape of the NO isotherms is maintained showing a hysteresis loop typical of those materials in which the NO molecule strongly binds the metal atom. This fact supports that the main NO incorporation mechanism (chemisorption) is independent from that of the RAPTA-C adsorption process (physisorption). The presence of NO in the porous matrix was confirmed with IR spectroscopy (Fig. S5†). The stretching band at 1839 cm^{-1} is somewhat less intense than the one found for the original CPO-27-Ni material loaded with NO, which further supports the lower amount of adsorbed NO in

comparison with the original porous matrix, as a result of the space occupied by the RAPTA-C molecules inside the cavities. Similar shape of the band and its position confirms adsorption on the CUS sites inside the channels of the material and not only physisorption at the external surface.

As previously reported,¹⁸ water molecules can trigger the delivery of coordinated NO, replacing them from the open metal sites. Fig. 3 shows the releasing profile of NO for CPO-27-Ni@NO and CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO when exposed to a wet gas containing 11% of relative humidity. As previously reported for CPO-27-Ni, CPO-27-Ni@RAPTA also releases physisorbed NO very quickly as a sharp spike appearing within the first few minutes of the kinetic of release (Fig. 3). However, the release of the chemisorbed NO is much slower and seems to be affected by RAPTA-C inclusion into the pores. Indeed, CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO releases NO significantly faster (half life of release = 23 min) than unloaded CPO-27-Ni@NO (half life of release = 40 min), as appreciated by a steeper drop of NO concentration for the former material. The total amount of stored NO is completely released in both cases. Although in the case of CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO, the major quantity of stored gas is recovered within 2 hours, after 12 hours, a significant amount of NO is still being released. These results indicate that the incorporation of RAPTA-C into the pores of the framework does not significantly affect the NO adsorption/desorption processes. Nevertheless, we can appreciate a change in the desorption kinetics, which is faster in the case of the RAPTA-C loaded material.

The further step has been the study of the RAPTA-C delivery process from the CPO-27-Ni@RAPTA-C@NO loaded material and the evaluation of the effects of NO incorporation. For this purpose, we suspended two samples of CPO-27-Ni@RAPTA-C, untreated and NO loaded, into a simulated body fluid (SBF) at 310 K in order to compare RAPTA-C desorption kinetics profiles. As depicted in Fig. 4, there are no significant differences for the NO loaded and unloaded samples, since both samples release about 25% loaded RAPTA-C within 2 h. This behaviour is

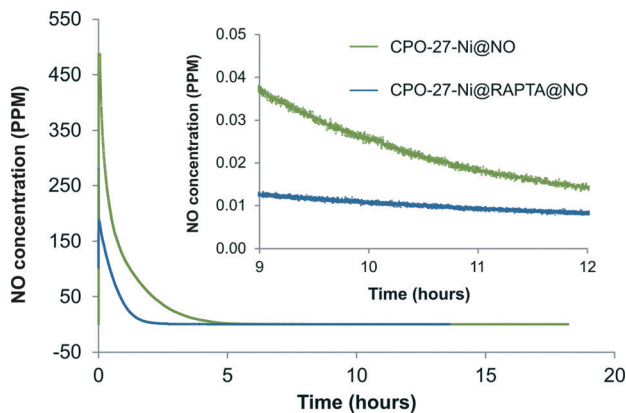


Fig. 3 Delivery of NO on contact with wet gas (11% relative humidity), as measured by chemiluminescence. The materials are still releasing NO at and beyond 12 h under these conditions.

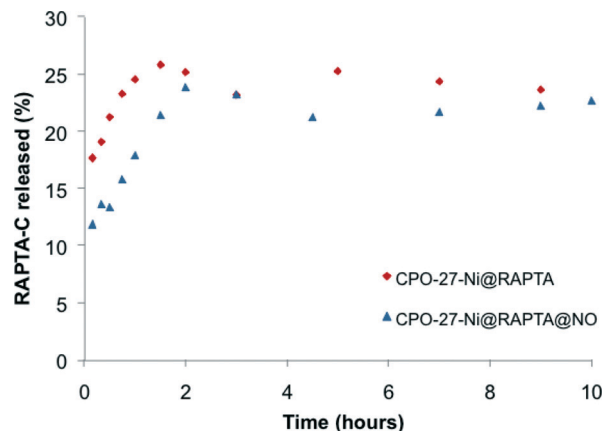


Fig. 4 Desorption kinetics profile of RAPTA-C in SBF at 310 K from the original CPO-27-Ni porous matrix and the one loaded with NO. Both materials behave in a similar manner realising the 25% of RAPTA-C in 2 h.

reasonable as no interactions between adsorbed RAPTA-C and NO take place. Indeed, it is known that the delivery rate of NO from CPO-27-Ni is increased markedly in physiological solutions with the half-life of delivery being reduced from several hours for flowing gas to a few minutes in contact with PBS.¹⁸ Then, considering that the NO release from CPO-27-Ni@RAPTA@NO into SBF is nearly instantaneous, the porous matrix becomes essentially identical to the unloaded CPO-27-Ni@RAPTA, which further supports the results. It should be noted that the prompt release of NO may have a beneficial impact in biological applications due to the vasodilation properties of this signalling molecule, which may help the penetration of RAPTA-C into the cancer cells.

Conclusions

In this study, we proved that the concomitant adsorption of nitric oxide and RAPTA-C into the pores of CPO-27-Ni material is feasible. The adsorption capacity for both species is basically unaffected by the presence of each other. This is attributable to the different interactions taking place between the framework walls and the adsorbate of interest: NO directly interacts with the Ni open metal sites (chemisorption) while RAPTA-C is only physisorbed into the pores. On the other hand, the release of the trapped Ru-metallodrug into SBF does not depend on the previous loading of NO into the framework, substantially, because of the immediate release of NO in an aqueous medium. However, the kinetics of NO desorption in the presence of a humid flowing gas is significantly faster for the CPO-27-Ni@RAPTA-C than for the original CPO-27-Ni.

The investigated system must be considered as a proof of concept of the feasibility of the concurrent adsorption of bioactive molecules into the metal-organic frameworks. Further investigation is envisaged for the development of novel systems in which the concomitant incorporation of two (or more) bioactive species results in the neat improvement of the

delivery performances. It should be noted that the exploitation of the synergic effect of multiple drugs may lead to advanced combined therapies.

Acknowledgements

The authors are grateful for the generous support by the Spanish MCINN (project: CTQ2011-22787 and E. Q.-P. FPI fellowship), Junta de Andalucía (project: P09-FQM-4981 and S. R. pre-doctoral fellowship) and COST Action CM1105. R. E. M. thanks the EPSRC (grant numbers EP/K025112/1 and EP/K005499/1) and the Royal Society for provision of an Industry Fellowship. The IR studies (B. G. and B. M.) were carried out with the equipment purchased thanks to the financial support of the European Regional Development Fund in the framework of the Polish Innovation Economy Operational Program (contract no. POIG.02.01.00-12-023/08).

Notes and references

- 1 P. Sonveaux, B. F. Jordan, B. Gallez and O. Feron, *Int. J. Oncol.*, 2008, **33**, 909.
- 2 O. M. Yaghi and J. R. Long, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1203.
- 3 P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R. E. Morris and C. Serre, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1232; I. Imaz, M. Rubio-Martínez, J. An, I. Solé-Font, N. L. Rosi and D. Maspoch, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7287; A. C. McKinlay, R. E. Morris, P. Horcajada, G. Férey, R. Gref, P. Couvreur and C. Serre, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6260.
- 4 S. R. Miller, E. Alvarez, L. Fradcourt, T. Devic, S. Wuttke, P. S. Wheatley, N. Steunou, C. Bonhomme, C. Gervais, D. Laurencin, R. E. Morris, A. Vimont, M. Daturi, P. Horcajada and C. Serre, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 7773.
- 5 P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J. S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P. N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 172.
- 6 B. E. Mann and R. Motterlini, *Chem. Commun.*, 2007, 4197.
- 7 R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373; R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige and S. Moncada, *Nature*, 1987, **327**, 524.
- 8 H. F. Zhu, B. Ka and F. Murad, *World J. Surg.*, 2007, **31**, 624.
- 9 D. Hirst and T. Robson, *Curr. Pharm. Des.*, 2010, **16**, 411; S. Huerta, S. Chilka and B. Bonavida, *Int. J. Oncol.*, 2008, **33**, 909; L. J. Frederiksen, R. Sullivan, L. R. Maxwell, S. K. Macdonald-Goodfellow, M. A. Adams, B. M. Bennett, D. R. Siemens and C. H. Graham, *Clin. Cancer Res.*, 2007, **13**, 2199.
- 10 D. A. Wink, J. A. Cook, D. Christodoulou, M. C. Krishna, R. Pacelli and S. Kim, *Nitric Oxide*, 1997, **1**, 88.
- 11 S. Fox, T. S. Wilkinson, P. S. Wheatley, B. Xiao, R. E. Morris, A. Sutherland, A. J. Simpson, P. G. Barlow, A. R. Butler, I. L. Megson and A. G. Rossi, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 1515.
- 12 P. D. C. Dietzel, Y. Morita, R. Blom and H. Fjellvag, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 6354.
- 13 P. D. C. Dietzel, B. Panella, M. Hirscher, R. Blom and H. Fjellvag, *Chem. Commun.*, 2006, 959.
- 14 N. L. Rosi, J. Kim, M. Eddaoudi, B. Chen, M. O'Keeffe and O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1504; J. L. C. Rowsell and O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1304; P. D. C. Dietzel, R. E. Johsen, R. Blom and H. Fjellvag, *Chem.-Eur. J.*, 2008, **14**, 2389.
- 15 P. D. C. Dietzel, R. Blom and H. Fjellvag, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, **23**, 3624; S. R. Caskey, A. G. Wong-Foy and A. J. Matzger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10870.
- 16 W. Zhou, H. Wu and T. Yildirim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15268.
- 17 S. Bhattacharjee, J. S. Choi, S. T. Yang, S. B. Choi, J. Kim and W. S. Ahn, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, **10**, 135.
- 18 A. C. McKinlay, B. Xiao, D. S. Wragg, P. S. Wheatley, I. L. Megson and R. E. Morris, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10440.
- 19 N. J. Hinks, A. C. McKinlay, B. Xiao, P. S. Wheatley and R. E. Morris, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, **129**, 330.
- 20 C. Sclaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161.
- 21 E. Quartapelle Procopio, S. Rojas, N. M. Padial, S. Galli, N. Masciocchi, F. Linares, D. Miguel, J. E. Oltra, J. A. R. Navarro and E. Barea, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11751.
- 22 C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis and S. L. Heath, *Chem. Commun.*, 2001, 1396.

Biophysical characterisation, antitumor activity and MOF encapsulation of a half-sandwich ruthenium(II) mitoxantronato system†

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 2473

Received 17th October 2013
Accepted 31st October 2013

DOI: 10.1039/c3tb21455a

www.rsc.org/MaterialsB

S. Rojas, E. Quartapelle-Procopio, F. J. Carmona, M. A. Romero, J. A. R. Navarro* and E. Barea*

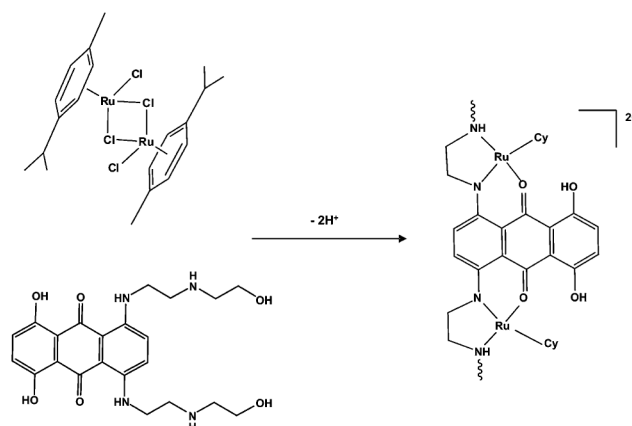
The novel non-conventional metallodrug $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**1**) exhibits redox activity, DNA intercalation ability, cathepsin B and D inhibition and *in vitro* antitumor activity able to circumvent cisplatin resistance. Moreover, **1** can be successfully incorporated into MIL100(Fe) as a proof of concept of the feasibility of metal–organic frameworks as carriers of non-conventional drugs.

Since the clinical application of the leading cisplatin anticancer metallodrug, a great deal of work has been devoted to find new compounds showing a comparable antitumor activity but with reduced side effects. In this context, some half-sandwich organometallic Ru(II) based metallodrugs have attracted the attention of researchers¹ since some of them do not display *in vitro* cytotoxicity but are active against metastasis *in vivo*.² In contrast to platinum based metallodrugs, ruthenium systems display a generally lower cytotoxicity towards primary tumors which might be related to their different chemical properties. In this regard, some researchers have postulated that unlike Pt(II) metallodrugs, DNA binding is not the main mechanism of action of Ru(II) systems but their activity might be related to the inhibition of overexpressed enzymes in tumors (*i.e.* cathepsins)³ or interference with biological redox processes.^{4,5} On the other hand, cancer therapies are not based on the use of a single drug but they usually make use of a drug cocktail in order to assure the highest efficiency. Thus, pure organic molecules, such as anthracyclines of both natural and synthetic nature, are frequently used as anticancer drugs in combination with platinum drugs. The toxicity of anthracyclines is essentially due to the noncovalent binding to DNA double helix.⁶ Among this family of compounds, mitoxantrone (Scheme 1), an

anthraquinone derivative, is one of the most promising compounds. It is noteworthy that this system has been proved to exhibit a reduced cardiotoxicity compared to daunomycin and adriamycin analogues⁷ while being highly active against advanced breast cancer, non-small cell lung cancer as well as non-Hodgkins lymphoma.^{8–10}

On the other hand, a great effort is currently being made to develop methods that achieve the administration of bioactive molecules, specifically, for a long timeframe and at a controlled rate. In particular, improved carriers of anticancer metallodrugs will contribute to develop more efficient treatments with less side effects. In this regard, two main benefits are expected from the use of appropriate delivering systems for these drugs: (i) the prevention of the drug from rapid degradation in a physiological medium and (ii) the targeted drug delivery, thanks to the use of functionalized carriers.¹¹

In this context, metal–organic frameworks (MOFs) – a new class of synthetic porous crystalline materials based on metal ions connected through spacing ligands – can be considered good candidates for the transport and the release of these species.¹² Nowadays, MOFs have demonstrated interesting



Scheme 1 Reaction of $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$ with mitoxantrone to give $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**1**).

Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, Av. Fuentenueva, S/N, 18071, Granada, Spain. E-mail: jarn@ugr.es; ebaream@ugr.es; Tel: +34 958 248 093

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details, ESI-MS, NMR, IR and diffuse reflectance spectra, cathepsin inhibition tests, biological essays, N_2 adsorption isotherms and energy dispersive X-ray spectroscopy data. CCDC 864943. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3tb21455a

applications in diverse fields, such as separation and purification of gases,¹³ heterogeneous catalysis,¹⁴ nanomaterials¹⁵ and biomedicine.^{12,16} Regarding the latter application, the well-known mesoporous MOF, **MIL100(Fe)** ($[\text{Fe}_3\text{O}(\text{H}_2\text{O})_2\text{F}(\text{btc})_2]$, btc = benzene-1,3,5-tricarboxylate), based on non-toxic iron(III) and carboxylate ligands, has been shown to be a potential platform for drug delivery.¹⁷ It should be highlighted that this MOF can be obtained as nanoparticles, which is a key issue for some administration routes in biological applications in order to avoid tissue damage. Moreover, preliminary subacute *in vivo* toxicity assays performed intravenously in rats confirm the lack of severe toxicity of very high doses of **MIL100(Fe)** nanoparticles.¹²

Taking into account the above information, we were interested in finding a novel metallodrug, which may combine the action of half-sandwich Ru(II) systems with mitoxantrone in order to give rise to dual function metal complexes with DNA intercalating properties together with protease inhibition features. Moreover, we were also interested in studying the feasible encapsulation of such metallodrug into the porous structure of **MIL100(Fe)** as a proof of concept of the potential use of MOF-based methods for the delivery of non-conventional anticancer metallodrugs. Indeed, our group has previously reported the incorporation/release of another non-conventional anticancer metallodrug, $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) (RAPTA-C), into the highly porous and robust MOFs $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_2(4,4'(\text{buta-1,3-diyne-1,4-diyl})\text{-bispyrazolato})_6]$ and $[\text{Ni}_2(\text{C}_8\text{H}_2\text{O}_6)]$ (CPO-27-Ni).¹⁸ Then, in this communication, we present the synthesis and biological activity of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**1**) (Scheme 1) as well as its successful incorporation into the porous matrix of **MIL100(Fe)** following a *ship-in-a-bottle* strategy.

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ (**1**) can be easily obtained by reacting the commercial mitoxantrone·HCl drug with one equivalent of $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ in ethanol at room temperature (for experimental details see the ESI†). The formation of the dinuclear complex in **1** is confirmed by single crystal X-ray diffraction data† which show that mitoxantronato coordinates two CyRu moieties acting in a *N,N,O,N',N',O'-exo-hexadentate* bridging mode (Fig. 1). The disposition of both CyRu moieties is above the plane of the aromatic polycyclic system.

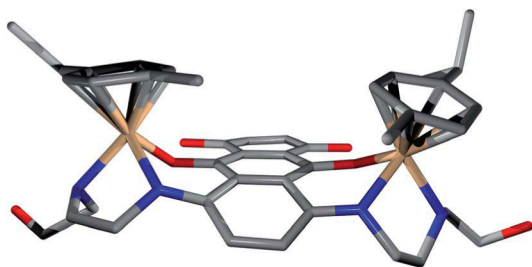


Fig. 1 View of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]^{2+}$ in the crystal structure of **1**. C (grey), N (blue), O (red), and Ru (orange). H-atoms have been omitted for clarity.

The ^1H NMR spectrum of **1** in MeOD is indicative of the existence of a single species in solution with a molecular symmetry analogous to that found in the solid state (Fig. S1†). The ^1H -NMR spectrum shows the splitting of the CH_2 signals of mitoxantrone's side chains confirming its rigid coordination (en-like coordination mode) to the Ru atoms. The exact attribution of all the proton signals has been possible with a HETCOR spectrum. Integration of the ^1H signals corresponding to cymene and mitoxantrone moieties, also agrees with the dinuclear nature of **1**. The MS-ESI⁺ spectrum further confirms the formation of **1**. Indeed the 100% peak found at the *m/z* value of 948.1844 corresponds to the cationic $[(p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}^+$ species.

It is noteworthy that **1** is soluble in both polar solvents (H_2O , MeOH, EtOH, CH_3CN , $(\text{CH}_3)_2\text{O}$, DMF) and low polar solvents (CH_2Cl_2 , CHCl_3) which might be attributed to the presence of both polar (O, OH, NH) as well as apolar residues (Cy) in this system. These characteristics are of interest since they may favor the solubility of **1** in body fluids as well as its internalization inside tumor cells.

In view of all these features we have studied the possible interaction of **1** with relevant biomolecules, its redox activity as well as its cytotoxicity.

Taking into account the DNA-intercalating features of mitoxantrone, we have studied the possible effect of the presence of the (Cy)Ru sides in **1** on its interaction with the DNA structure, by means of different biophysical methods: circular dichroism (CD) and competitive binding with ethidium bromide (EB). The experiments have been performed on both **1** and free mitoxantrone in order to have a reliable comparison between results. It is noteworthy that the results prove that the bulk of the (Cy)Ru residues coordinated to mitoxantrone does not significantly hamper the DNA intercalating ability of the mitoxantrone residue. Indeed, the EB competitive assays reveal that DNA binding constant values show only a slight decrease from $2.85 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for mitoxantrone to $2.18 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for **1** (Fig. 2). The intercalative binding mode is further confirmed by CD measurements showing the diminution of DNA ellipticity for both mitoxantrone and **1** (Fig. S6†).

We have also studied the possible interaction of **1** with additional biological targets, namely, amino acids and proteases. The results (Fig. S7†) show that this system readily reacts with both S-donor (cysteine, glutathione) and N-donor (histidine) amino acids as previously found in related half-sandwich Ru(II) systems which involve coordination to the biorelevant ligands as well as redox processes.¹⁹ Indeed, ^1H NMR studies of the incubation of **1** (MeOD, 37 °C; DMSO- d_6 , 37 °C) with pure amino acids (Fig. S7†) show a rather fast (<4 h) interaction between complex **1** and the corresponding amino acid with the concomitant liberation of free mitoxantrone.

Moreover, **1** is also able to interact with proteases, inhibiting their enzymatic activity. Indeed, the fluorescence binding assay of **1** with cathepsin D proved that a 20 μM solution of **1** can completely inhibit the activity of this protease (Fig. S8†). Furthermore, **1** can also inhibit cathepsin B activity exhibiting an IC_{50} value of 1.5 μM (Fig. S9†) which is below the one reported for RAPTA-C ($\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$)²⁰ and other Ru-based

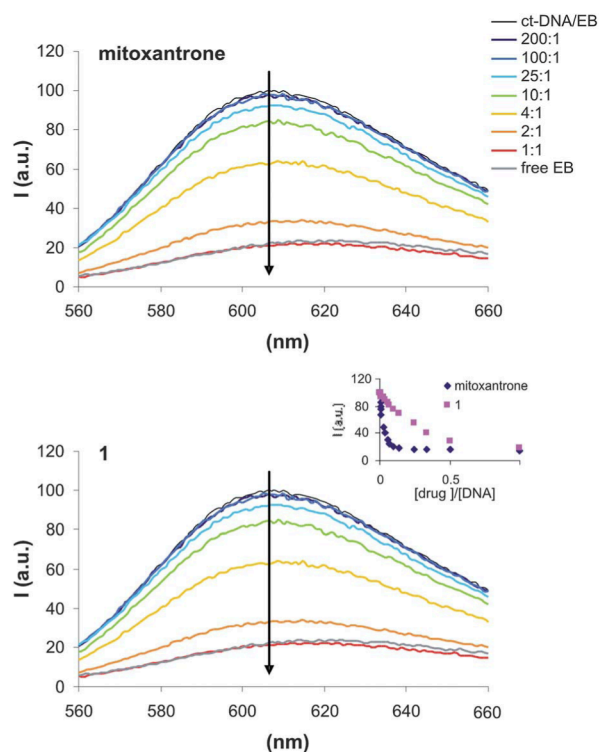


Fig. 2 Competitive binding assays: fluorescence spectra of intercalated ethidium bromide (5 μM) in DNA (4 μM) upon addition of increasing amounts of mitoxantrone (above) and **1** (below) in 1 mM sodium cacodylate buffer and 20 mM NaCl. Inset: relative drug concentration vs. fluorescence intensity.

metallo-drugs.⁴ It is noteworthy that mitoxantrone (200 μM) does not affect the substrate hydrolysis rate for both cathepsin B and D which points that protease inhibition activity should be related to Ru binding ability to amino acids (see above). These results are of interest in view of the exacerbated metabolism of these types of enzymes in cancer cells.³

As above mentioned, the possible biological activity of Ru metallo-drugs can also be related to their involvement in biological redox processes.⁴ In this regard, we have studied the redox activity of **1** as well as mitoxantrone and that of $[\text{Ru}(p\text{-Cy})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ precursors, by means of cyclic voltammetry (Table 1). The results for complex **1** show a shift of mitoxantrone's oxidation waves to higher potentials ($\Delta E = +0.12$ V), indicative of increasing difficulty for mitoxantrone oxidation upon Ru binding, as a consequence of charge withdrawal from metal centres. The first anodic wave corresponds to the partially

Table 1 Summary of redox properties for mitoxantrone, $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ and **1**

Compound	E_{pa} (V)	Attribution	E_{pc} (V)	Attribution
Mitoxantrone	0.44	$2e^-$, 1,4-OH	—	—
	1.17	$2e^-$, aminoalkyl	-0.972	$1e^-$, anthracene
$[\text{RuCyCl}]_2\text{Cl}_2$	1.34	$2e^-$ Ru(π/π)	-1.12	$2e^-$, Ru(π/π)
1	0.56	$1e^-$, 1-OH	-0.90	$1e^-$, anthracene
	0.89	$1e^-$, 4-OH	-1.50	$2e^-$, Ru(π/π)

reversible (Fig. S4[†]) transfer of $1e^-$ (comparison with $\text{Fc}/\text{Fc}^+ 1e^-$ oxidation process) to the OH group in position 1 of the anthracene moiety. The second peak (irreversible) is attributed to the oxidation of the second OH group of mitoxantrone (Fig. S3[†]). Regarding the reduction process of **1**, an irreversible reduction peak is observed in the first place (Fig. S5[†]) which can be attributed to the reduction of the mitoxantrone in **1**. The second peak is again irreversible and is attributed to the simultaneous reduction of the two Ru atoms in the transition Ru π/π . The latter process is more difficult (*i.e.* occurs at more negative potentials) than in the case of the $[\text{RuCyCl}]_2\text{Cl}_2$ complex and this can be easily understood if we consider that the system has already accommodated one electron on the mitoxantrone ligand and consequently the next reduction step is less favourable. As a concluding remark it should be noted that the biologically relevant redox behaviour of **1** is basically ligand centred since the most accessible processes take place at the mitoxantrone moiety.

Finally, we have studied the *in vitro* antitumor activity of **1** towards selected cancer cell lines, namely wild type (A2780) and cisplatin resistant ovarian tumor (A2780cis), breast cancer (MCF-7), and lymphoma (HL-60) cell lines as well as its cytotoxicity towards healthy kidney cells (LLC-PK1). The results are summarised in Table 2 showing a remarkably high antitumor activity for system **1** towards both wild type and cisplatin resistant tumor cell lines. It is noteworthy that the IC_{50} values for **1** and resistance factors are below the ones obtained for the drug cisplatin for three out of the four assayed cell lines, thereby suggesting a high effectiveness of **1** towards these types of tumor cells. Nevertheless, the cytotoxic activity for **1** is slightly below the one exhibited by free mitoxantrone for all the tested cell lines, although it shows a lower resistance factor. It is noteworthy that **1** exhibits a lower cytotoxicity towards healthy kidney cells compared to free mitoxantrone which should be taken as an advantageous feature. It might be concluded that the observed differences in biological activity of **1** compared to free mitoxantrone should be related to the diminution of the intercalating activity of **1** as a consequence of the bulk of the CyRu residues and/or the slow release of the free mitoxantrone drug upon complex degradation in the biological media. It should also be noted that cathepsins inhibition activity of **1**,

Table 2 IC_{50} ^a values (in μM) in ovarian (A2780) and cisplatin resistant (A2780cis), breast cancer (MCF-7) and lymphoma (HL-60) cancer cell lines and healthy kidney cells (LLC-PK1). Resistance factor RF (IC_{50} cisplatin resistant/ IC_{50} cisplatin sensitive)

	Mitoxantrone	1	Cisplatin (control)
MCF-7	0.011(1) μM	28(± 4) ^b %	15(1) μM
A2780	0.043(1) μM	0.58(1) μM	0.91(5) μM
A2780cis	0.032(2) μM	0.25(1) μM	7.37(53) μM
RF	0.74	0.43	8.10
HL-60	0.16(1) μM	1.94(2) μM	8.18(19) μM
LLC-PK1	21(± 5) ^b %	15(± 4) ^b %	12(1) μM

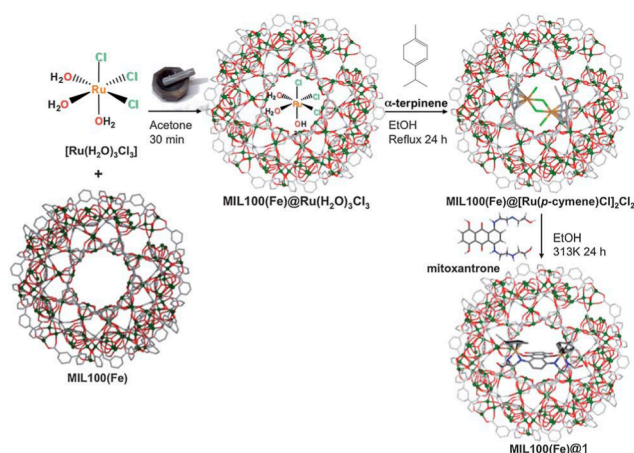
^a IC_{50} : drug concentration necessary for 50% inhibition of cell viability.

^b Growth inhibition at 100 μM drug concentration.

changes the redox activity of mitoxantrone, and slow release of free mitoxantrone may eventually give rise to a different (dual) mechanism of action and/or selectivity *in vivo*.

Taking into account the interesting antitumor activity of **1**, we decided to study its incorporation into the mesoporous metal-organic framework system MIL100(Fe). Nanoparticles of MIL100(Fe) were prepared as described in the literature (for experimental details see ESI†).²¹ Thermal activation of MIL100(Fe) at 383 K removes the coordinated water guest molecules leaving large cavities of 2.9 nm of diameter ready for adsorption of other molecules. As a first attempt we tried to load **1** into the porous matrix by suspending it in saturated solutions of **1** in different solvents (*i.e.* acetone, ethanol). However, the loading of the metallodrug was not achieved by impregnation probably due to the small size of the pore windows (0.86 nm × 0.86 nm). In order to circumvent this problem, we successfully carried out the incorporation of **1** into MIL100(Fe) following a *ship-in-a-bottle* strategy (Scheme 2) as a means of achieving the direct synthesis of **1** inside the pores of MIL100(Fe). For this purpose, a three step reaction was performed (Scheme 2): (i) first, MIL100(Fe) was ground in an acetone solution of [Ru(H₂O)₃Cl₃], which led to its rapid encapsulation; (ii) then, loaded [Ru(H₂O)₃Cl₃] was reacted with α -terpinene in EtOH under reflux for 24 h to form the dinuclear complex [Ru(*p*-cymene)Cl]₂Cl₂ and (iii) in the third step, the latter dinuclear complex was reacted with mitoxantrone in EtOH at 313 K for 24 h to give **1** (Scheme 2). The formation of **1** was confirmed by: (i) the dramatic reduction of the adsorption capacity of the MOF (SBET drops from 1570 m² g⁻¹ for the original material to 20 m² g⁻¹ after **1** loading) (Fig. S12†); (ii) the presence of the main peaks of pure **1** in the IR spectrum of MIL100(Fe)@**1** (Fig. S10†); (iii) the presence of characteristic bands of **1** in the reflectance diffuse spectrum of MIL100(Fe)@**1** (Fig. S11†) and (iv) the content of Ru in MIL100(Fe)@**1** confirmed by energy dispersive X-ray spectroscopy (Fig. S13†).

Some preliminary attempts to deliver the **1** system from MIL100(Fe) in SBF show a rather complex behaviour, in which the degradation of **1** (see above) and MOF nanoparticles¹⁷



Scheme 2 Strategy for the encapsulation of **1** into the porous matrix of MIL100(Fe).

overlap. These facts hamper a clear understanding of the delivery process. Nevertheless, it should be noted that a possible benefit of the encapsulation strategy proposed herein, compared to the encapsulation of free mitoxantrone alone, might be related to the slow and simultaneous release of both species, namely Ru(II) organometallic fragments and mitoxantrone. Ongoing research in our group is being focused on clarifying the potential biological activity of nano-MOF@metallodrug hybrid systems.

Conclusions

In summary, a new mitoxantrono half-sandwich Ru(II) system has been prepared and fully characterized. It is noteworthy that this system can be considered as a multitarget antitumor metallodrug exhibiting redox activity, DNA intercalation, protease inhibition as well as important *in vitro* antitumor activity. Moreover, we have demonstrated that it is possible to load this metallodrug into the porous matrix of MIL100(Fe) following a *ship-in-a-bottle* procedure. The latter result should be taken as a proof of concept of the potential use of metal-organic frameworks as carriers of non-conventional anticancer drugs. The development of delivering strategies may help to circumvent some problems of anticancer therapies related to the stability of the drug in the physiological medium (higher reactivity of Ru(II) vs. Pt(II)) as well as its selective delivery to the cancer cells, which will decrease the undesirable side effects of the treatments.

Acknowledgements

The authors are grateful for the generous support by the Spanish MINECO (project: CTQ2011-22787 and E. Q.-P. FPI pre-doctoral fellowship), Junta de Andalucía (project: P09-FQM-4981 and S. R. pre-doctoral fellowship) and COST Action CM 1105.

Notes and references

† Crystal data for **1**: [(C₁₀H₁₄)₂Ru₂(C₂₂H₂₆N₄O₆)Cl₂·(H₂O)(CH₃OH)₂(Cl₂CH₂)_{0.5}], *M* = 1108.5, monoclinic, space group *P*2₁/*c*, *a* = 20.953(2) Å, *b* = 15.440(1) Å, *c* = 29.153(2) Å, β = 96.570(2)°, *V* = 9370(1) Å³, *Z* = 8, *D*_{calc} = 1.476 g cm⁻³, *T* = 100 K, $\lambda_{\text{MoK}\alpha}$ = 0.71073 Å, *R*_{int} = 0.0961, *R*(*F*, *F*² > 2σ) = 0.0908, *R*_w(*F*², all data) = 0.2766 for 8475 unique reflections, goodness-of-fit = 1.039.

- S. Komeda and A. Casini, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2012, **12**, 219–235; G. Süß-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 1673–1688; S. H. van Rijt and P. J. Sadler, *Drug Discovery Today*, 2009, **14**, 1089–1097; A. Levina, A. Mitra and P. A. Lay, *Metallomics*, 2009, **1**, 458–470.
- J. Ruiz, V. Rodriguez, N. Cutillas, A. Espinosa and M. J. Hannon, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 9164–9171; C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161–4171.
- A. Casini, F. Edefe, M. Erlandsson, L. Gonsalvi, A. Ciancetta, N. Re, A. Ienco, L. Messori, M. Peruzzini and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 5556–5563; A. Casini, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov and P. J. Dyson, *Medicinal*

- Organometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry)*, 2010, vol. 32, pp. 57–80.
- 4 J. Klunj, I. Bratsos, E. Alessio, G. Psomas, U. Repnik, M. Butinar, B. Turk and I. Turel, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 9039–9052.
 - 5 F. Linares, E. Quartapelle, M. A. Galindo, M. A. Romero, J. A. R. Navarro and E. Barea, *CrystEngComm.*, 2010, **12**, 2343–2346.
 - 6 C. Xia, S. Guoli, J. Jianhui and Y. Roquin, *Anal. Lett.*, 1999, **32**, 717–727.
 - 7 C. E. Myers, E. G. Mimnaugh, G. C. Yeh and B. K. Sinha, *Anthracycline and Anthracenedione-Based Anticancer Agents*, ed. J. W. Lown, Elsevier, Amsterdam, 1988, p. 527.
 - 8 K. X. Chen, N. Gresh and B. Pullman, *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 3799–3812.
 - 9 M. A. Cornbleet, R. C. Stuart-Harris, I. E. Smith, R. E. Coleman, R. D. Rubens, M. McDonald, H. T. Mouridsen, H. Rainer, A. T. Van Oosteram and J. F. Smyth, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984, **20**, 1141–1146.
 - 10 A. Feofanov, S. Sharonov, F. Fleury, I. Kudelina and I. Nabiev, *Biophys. J.*, 1997, **73**, 3328–3336.
 - 11 F. Novio, J. Simmchen, N. Vazquez-Mera, L. Amorin-Ferre and D. Ruiz-Molina, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2839–2847.
 - 12 P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Ferey, R. E. Morris and C. Serre, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1232–1268.
 - 13 H. Furukawa, K. E. Cordova, M. O’Keeffe and O. M. Yaghi, *Science*, 2013, **341**, 1230444–1–1230444–12; J.-R. Li, J. Sculley and H.-C. Zhou, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 869–932.
 - 14 M. Yoon, R. Srirambalaji and K. Kim, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1196–1231.
 - 15 A. Carne, C. Cabonell, I. Imaz and D. Maspoch, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 291–305; D. Zacher, O. Shekhah, C. Wöll and R. A. Fischer, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1418–1429.
 - 16 J. Della Rocca, D. M. Liu and W. B. Lin, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 957–968.
 - 17 P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Ferey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 172–178.
 - 18 E. Quartapelle Procopio, S. Rojas, N. Padial, S. Galli, N. Masciocchi, F. Linares, D. Miguel, J. E. Oltra, J. A. R. Navarro and E. Barea, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11751–11753; S. Rojas, E. Quartapelle-Procopio, P. S. Wheatley, B. Gil, B. Marszalek, R. E. Morris and E. Barea, *CrystEngComm*, 2013, **15**, 9364–9367.
 - 19 L. E. H. Paul, B. Therrien and J. Furrer, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 1057–1067.
 - 20 A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Gedbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson and L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6773–6781.
 - 21 Y. Seo, J. Yoon, J. Lee, U. Lee, Y. Hwang, C. Jun, P. Horcajada, C. Serre and J. Chang, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2012, **157**, 137–145.